



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**MECANISMOS DE SENESCENCIA
EN CÉLULAS MESANGIALES
HUMANAS EN LA DIABETES Y EL
ENVEJECIMIENTO**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL NOGAL ÁVILA

2012

A mis padres

A Raquel

A Héctor

La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto a los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces.

Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas. Sé que han sido muchas y, seguramente, no me acordaré de todos pero os tendré siempre en cuenta.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Manuel Rodríguez Puyol por acogerme en su laboratorio y hacer realidad este sueño. Ha sido muy importante su apoyo y su aportación durante estos cuatro años, gracias por dirigir esta tesis y guiarme.

A mi otra directora, la Dr. María Piedad Ruiz Torres, sin la cual esto no hubiese sido posible. Ha sido una persona muy importante durante estos cuatro años. Le agradezco su gran disponibilidad, su apoyo incondicional, por estar siempre ahí para cualquier duda, y sobre todo por guiarme por este camino y darme ánimos siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Diego Rodríguez Puyol, por su orientación en este trabajo y compartir sus conocimientos, que siempre han sido de gran ayuda. A la Dr. María Luisa Díez por sus sabios consejos y estar siempre ahí.

A las dos personas que durante estos cuatro años han sido mis compañeras de laboratorio, Rosa y Nuria. A Rosa por haberme enseñado muchas cosas, compartir tan buenos momentos y saber que siempre tendré una amiga en ti. A Nuria por aguantar mis buenos y malos momentos, por esos ratos divertidos en el laboratorio, los momentos de deliberación y sobre todo por nuestra larga amistad. Nuria, seguro que te saldrá una tesis estupenda.

A Paloma por tu alegría, por haber pasado tantos buenos ratos juntas, por saber que siempre he podido contar contigo para lo que fuera y por una amistad que sé que durará mucho tiempo. A Alicia, Inés y Judith, por estar siempre en los buenos y malos momentos y por esos ratos divertidos. Os agradezco mucho vuestro apoyo. Todo esto no hubiese sido posible sin todas vosotras, os quiero. A Lourdes y Andrea por esos buenos momentos.

A Merce por enseñarme tantas cosas, estar siempre disponible para cualquier cosa y sobre todo por tu amistad. A Sergio por compartir tus conocimientos conmigo, por los momentos de humor aunque también me hayas regañado alguna vez que otra. A José Luis por ser tan amable y dispuesto, y por los ratos divertidos que hemos pasado, te deseo lo mejor en tu tesis.

A Laura, Gema y Malí por estar siempre ahí, resolverme todas las dudas que haya tenido y los buenos momentos en el comedor. Al grupo del hospital Príncipe de Asturias, gracias por vuestra colaboración y a Ana por estar siempre disponible para solucionar cualquier problema. A Susana te deseo lo mejor en tu tesis y en tu futuro.

A Carmen y Angélica gracias por solucionarme rápidamente cualquier problema que haya tenido. A Carlos por los buenos momentos en las prácticas y los cafés que te has tomado con nosotras. A Isabel y el resto de compañeras de la unidad de cultivos por esas tardes de los viernes en el citómetro y vuestra gran disposición.

AGRADECIMIENTOS

A toda la gente que ha pasado por el laboratorio y que emprendieron su camino fuera, por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A toda la gente del departamento de Fisiología por estar siempre disponible para cualquier duda y apoyo, en especial a Carol e Irene con las que he compartido laboratorio durante tres años. A David por compartir muchos buenos momentos en el comedor.

Al grupo del Dr. Jorge Cannata por haber colaborado con vosotros y haber sido parte de este trabajo.

Al Dr. Kuro-o por su gran disposición, por haber colaborado en este proyecto pero sobre todo por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme sus conocimientos. A la gente de su laboratorio, en especial a Johanne y Kazu, por enseñarme tantas cosas y hacer mi estancia allí mucho más llevadera.

A las profesoras del master de Dianas Terapéuticas Nieves e Inés por descubrirme el fascinante mundo de la investigación.

A todos mis amigos que sé que sois muchos, os agradezco vuestro gran apoyo en este duro camino. Espero compensaros algún día. En especial a Carmen, por estar siempre ahí en los buenos y malos momentos durante tantos años.

A mis padres, por educarme y enseñarme a ser la persona que soy. Por apoyarme en todas las decisiones que he tomado y por vuestra admiración. A Raquel, por enseñarme tantas cosas y estar siempre ahí. A Marco, al pequeño Jorge, a mis abuelos y al resto de mi familia, por ser también parte de esto. Sé que siempre puedo contar con vosotros.

A Héctor que sé que es el que más ha sufrido con todo esto. Por aguantar mis buenos y malos momentos, por apoyarme, por estar siempre disponible, por tu aportación en este trabajo y a toda tu familia por su gran apoyo.

Muchísimas gracias a todos.

ABREVIATURAS

ACC: Acetil coenzimaA-carboxilasa

ADH: Hormona antidiurética

ADNc: ADN copia

ADP: Adenosín difosfato (*Adenosine diphosphate*)

AG: Albúmina glicosilada

AGEs: Productos de glicosilación avanzada (*Advanced glycation end products*)

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)

ANG: Albúmina no glicosilada

AP-1: Proteína activadora 1 (*Activator protein 1*)

AQP2: Aquoporina-2

AR: Aldosa reductasa

ARF: *Alternate-Reading-Frame protein*

ARNds: ARN de doble cadena

ARNi: interferencia de ARN

ATP: Adenosín trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

BSA: Albúmina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

C₁₂FDG: 5-dodecanoilaminofluoresceína Di-β-D-Galactopiranosido

CAT: Catalasa

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinases*)

CKI: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*)

CML: N-(carboxymetil)lisina

CMH: Células mesangiales humanas

CMHKL: Células mesangiales humanas transfectadas con Klotho membrana

CMHvacío: Células mesangiales humanas transfectadas con plásmido vacío

DAB: Diaminobencidina

DCFH-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DDR: Respuesta de daño a ADN (*DNA damage response*)

DN-RAS: Dominante negativo de Ras

DNA-SCARS: Segmentos de ADN alterados que refuerzan la senescencia (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*)

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMT: Transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-to-mesenchymal transition*)

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

FGF23: Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (*Fibroblast growth factor 23*)

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor receptor*)

ABREVIATURAS

FoxO: *Forkhead box transcription factor*.

GAPs: Proteínas activadoras de GTPasas
(*GTPase-activating proteins*)

GDP: Guanosín difosfato (*Guanosine diphosphate*)

GEFs: Factores intercambiadores de nucleótidos (*Guanine nucleotide exchange factors*)

GPx: Glutation peroxidasa

GR: Glutation reductasa

Grb2: *Growth factor Receptor-Bound protein 2*

GSH: Glutation

GST: Glutation sefarosa transferasa

GTP: Guanosín trifosfato (*Guanosine triphosphate*)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDAC: Histona desacetilasa

HDM2: *Human Doble Minute 2*

HG: Altas concentraciones de glucosa
(*High glucose*)

HOCL: Radical hipoclorito

HSP70: *Heat shock protein 70*

HuVEC; *Human umbilical vein endothelial cells*

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1
(*Insulin-like growth factor 1*)

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (*IGF-1 receptor*)

IGFBP: Proteínas que se unen a IGF
(*Insulin-like growth factor binding proteins*)

IL-6: Interleuquina 6

IR: Receptor de insulina (*Insulin receptor*)

IRS-1: Sustrato del receptor de insulina 1
(*Insulin receptor substrate 1*)

JAK: Janus quinasa (*Janus kinase*)

JNK: *Jun-N-terminal kinase*

M6P/IGF-2R: Receptor manosa 6 fosfato/IGF-2 (*Mannose-6-phosphate/IGF-2 receptor*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*)

MnSOD: Manganese superóxido dismutasa

MPO: Mieloperoxidasa

MST1: Mammalian ortholog of the Ste20-like protein kinase)

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

NAC: N-acetil-L-cisteína

NFκB: Factor nuclear κB (*Nuclear factor κB*)

NKCC: Cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻

NO: Óxido nítrico

NOX: NADPH oxidasa

O₂⁻: Anión superóxido

¹O₂: Oxígeno singlete

OH: Radical hidroxilo

OONO: Radical peroxinitrilo

ORE: Elemento de respuesta osmótica
(*Osmotic response element*)

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa
(*Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PTH: Hormona paratiroidea
(*Parathormone*)

PTHR: Receptor de PTH (*PTH receptor*)

qPCR: *Quantitative PCR*

RAGE: Receptor de productos de glicosilación avanzada (*Receptor of advanced glycation end products*)

RNS: Especies reactivas del nitrógeno
(*Radical nitrogen species*)

RB: Proteína del retinoblastoma

RBD: Dominio de unión a Ras (*Ras-binding domain*)

RVI: Regulación del incremento de volumen (*Regulatory volumen increase*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno
(*Reactive oxygen species*)

SA-β-gal: Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (*Senescence associated β-Galactosidase activity*)

SAHF: Regiones citológicamente detectables de heterocromatina asociada a

senescencia (*Senescence associated heterocromatin foci*)

SASP: Fenotipo secretor asociado a senescencia (*Secretory-associated senescence phenotype*)

SH: Grupos sulfhidrilo

SH2: *Src homology 2*

siRNA: ARN de interferencia (*small interference RNA*)

Sirt1: Sirtuína 1

SOD: Superóxido dismutasa

STAT: Activador de transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription)

STZ: Estreptozotocina

sRAGE: RAGE soluble (*soluble RAGE*)

TGF-β1: Factor de crecimiento transformante β1 (*Transforming growth factor β1*)

TNFα: Factor de necrosis tumoral α
(*Tumor necrosis factor α*)

TonE: Elevador de la respuesta a tonicidad (*Tonicity-responsive enhancer*)

TrxR: Tioredoxina reductasa

TTBS: Tampón tween-tris salino (*Tween-tris buffer saline*)

UT-A1: Vasopresin-activated urea transporters

VDR: Receptor de Vitamina D (*Vitamine D receptor*)

ABREVIATURAS

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactósido

XO: Xantina oxidasa

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE | i |
| ABSTRACT/RESUMEN | vii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. SENESCENCIA CELULAR | 3 |
| 1.1. El ciclo celular | 3 |
| 1.2. Características de la célula senescente | 6 |
| 1.2.1. Parada de crecimiento | 6 |
| 1.2.2. Resistencia a la apoptosis | 6 |
| 1.2.3. Hipertrofia celular | 6 |
| 1.2.4. Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) | 6 |
| 1.2.5. Estrés (epi) genético | 7 |
| 1.2.6. Expresión de p16 ^{INK4a} | 8 |
| 1.2.7. Fenotipo secretor asociado a senescencia | 8 |
| 1.3. Vías celulares reguladoras de senescencia | 8 |
| 1.3.1. Vía p53 | 9 |
| 1.3.2. Vía p16 ^{INK4a} | 10 |
| 1.4. Mecanismos inductores de senescencia celular | 10 |
| 1.4.1. Senescencia dependiente de telómeros | 10 |
| 1.4.2. Daño en el ADN | 12 |
| 1.4.3. Estrés oxidativo | 12 |
| 1.4.4. Oncogenes | 12 |
| 1.4.5. Perturbación de cromatina | 13 |
| 2. MECANISMOS Y VÍAS CELULARES IMPLICADAS EN EL ENVEJECIMIENTO | 14 |
| 2.1. Factor de crecimiento insulínico (IGF-1) | 15 |
| 2.2. Proteína Klotho | 18 |
| 2.3. Factor de transcripción FoxO | 21 |
| 2.4. Proteína Ras | 23 |
| 2.5. Restricción calórica | 25 |
| 2.6. Estrés oxidativo | 27 |
| 2.6.1. Especies reactivas de oxígeno | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.6.2. Sistemas antioxidantes | 28 |
| 2.6.3. Catalasa y envejecimiento | 29 |
| 3. ENVEJECIMIENTO RENAL Y SENESCENCIA EN LA DIABETES | 31 |
| 3.1. La enfermedad renal en la diabetes | 31 |
| 3.2. Osmolaridad | 32 |
| 3.2.1. Regulación de la osmolaridad sanguínea | 34 |
| 3.2.2. Mecanismos de respuesta celular a hiperosmolaridad e hipertonicidad | 35 |
| 3.2.3. Estrés osmótico y diabetes | 32 |
| 3.3. Los productos de glicosilación avanzada | 39 |
| 3.3.1. El receptor de productos de glicosilación avanzada | 40 |
| 3.3.2. Vías de señalización mediadas por el receptor de productos de glicosilación avanzada | 41 |
| 3.3.3. Los productos de glicosilación avanzada y envejecimiento | 43 |
| OBJETIVOS | 45 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |
| 1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 51 |
| 2. MATERIAL EMPLEADO | 54 |
| 2.1. Reactivos | 54 |
| 2.2. Cultivo de células mesangiales humanas | 54 |
| 2.3. Línea de células mesangiales humanas transfectadas establemente con klotho | 55 |
| 2.4. Estudios en animales | 55 |
| 3. MÉTODOS | 57 |
| 3.1. Análisis de la actividad β -galactosidasa | 57 |
| 3.1.1. Detección citoquímica con tinción SA- β -gal | 57 |
| 3.1.2. Medida de actividad β -galactosidasa por citometría de flujo | 58 |
| 3.1.3. Medida de actividad β -galactosidasa por microscopía confocal | 59 |
| 3.2. Extracción de proteínas de cultivo celular y tejido | 60 |
| 3.2.1. Cultivo celular | 60 |
| 3.2.2. Tejido renal | 60 |
| 3.3. Análisis de proteínas por western-blot | 60 |
| 3.4. Medida del estado oxidativo | 63 |
| | 64 |

| | |
|--|----------|
| 3.5. Ensayo de pull-down | 65 |
| 3.6. Inmunohistoquímica | 65 |
| 3.7. Transfección con ARN de interferencia | 66 |
| 3.8. Medida de expresión de IGF-1 por ELISA | |
| 3.9. Ensayo de inmunoprecipitación del receptor de IGF-1 | 67 68 |
| 3.10. Medida de la expresión del ARNm de klotho | 69 |
| 3.11. Transfección con dominante negativo de Ras | 70 |
| 4. Análisis estadístico | 71 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 1. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y LOS PEQUEÑOS CAMBIOS EN LA OSMOLARIDAD EXTRACELULAR SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS Y EN LA CORTEZA RENAL | 73 |
| 1.1. Las altas concentraciones de glucosa indujeron senescencia celular en células mesangiales humanas mediante la activación de las vías p53 y p16 ^{INK4a} | 73 |
| 1.2. El tratamiento de células mesangiales humanas con diferentes sustancias osmóticamente activas indujo senescencia celular mediante la activación de p53 y p16 | 75 |
| 1.3. El tratamiento de CMH con el osmolito compatible <i>myo</i> -inositol previno la senescencia celular mediada por la HG y el manitol | 80 |
| 1.4. La senescencia celular en células mesangiales humanas inducida por las altas concentraciones de glucosa y el manitol fue dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno | 82 |
| 1.5. El tratamiento con alta glucosa y manitol indujo la activación constitutiva de Ras en células mesangiales humanas | 85 |
| 1.6. La senescencia celular inducida por HG y manitol fue dependiente de la activación de las MAPK Erk1/2 y p38 | 88 |
| 1.7. Las ratas diabéticas y las ratas tratadas con manitol presentan un aumento en la osmolaridad plasmática y una elevación en los niveles de p53 y p16 en la corteza renal | 93 |
| 2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE GLICOSILACIÓN AVANZADA SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS: MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS | 99 |

| | |
|--|-----|
| 2.1. La albúmina glicosilada indujo senescencia celular en células mesangiales humanas a través de la vía de p53 | 99 |
| 2.2. La albúmina glicosilada indujo senescencia celular a través de su interacción con el receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE) | 102 |
| 2.3. El aumento en p53 inducido por la albúmina glicosilada fue debido a la producción de especies reactivas de oxígeno | 103 |
| 2.4. La senescencia producida por la albúmina glicosilada fue dependiente de un descenso en la expresión de catalasa | 105 |
| 2.5. La albúmina glicosilada indujo senescencia celular mediante la activación del receptor del factor de crecimiento insulínico | 107 |
| 2.6. La senescencia celular inducida por la albúmina glicosilada fue mediada por la activación de la vía Ras-Erk | 112 |
| DISCUSIÓN | 117 |
| 1. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA INDUCEN SENESCENCIA CELULAR MEDIANTE CAMBIOS EN LA OSMOLARIDAD | 122 |
| 2. LA ALBÚMINA GLICOSILADA PROMUEVE SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS A TRAVÉS DE UN DESCENSO EN CATALASA | 128 |
| CONCLUSIONES | 133 |
| BIBLIOGRAFÍA | 137 |

Renal aging is associated with alterations in renal morphology and a decline in renal function, which could be accelerated and/or accentuated by diseases such as diabetes mellitus and hypertension. The diabetic nephropathy is one of the major microvascular complications in diabetes. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate that mesangial cells are intimately involved in glomerulosclerosis, a manifestation of end stage renal disease in diabetic nephropathy. Mesangial cells hypertrophy, basement membrane thickening and mesangial matrix expansion are among the earliest pathological features of diabetic nephropathy. Cellular senescence was first used to describe the phenotype of permanent and irreversible growth arrest in *in vitro* studies of human fibroblast. Senescent cells remain viable but show altered morphology, greater heterogeneity, developed hypertrophy, expression of SA- β -gal, accumulation of lipofuscin granules, and lack of response to mitogenic stimuli. Cellular senescence is accompanied in humans by loss of telomeres and DNA repeats at the ends of the chromosomes as a result of lack of telomerase activity. However, cellular senescence can also be induced prematurely in response to various physiologic stressors independent of the number of cell divisions through the p16^{INK4a} or p53-p21 signaling pathways. Some features of senescence in aging kidney, such as the appearance of SA- β -gal and p16^{INK4a}, are present even without morphologic changes, suggesting that some aspects of cell senescence are common in the aging kidney. The senescent cell shows some similarities with hypertrophy cell, and one of the major morphological changes in diabetic kidney is the glomerular hypertrophy. Moreover, in experimental models of diabetic nephropathy is common the presence of glomerular hypertrophy with a p21 protein increases. We propose that cellular senescence could have an important role in the development of kidney complications in diabetes and aging.

High glucose concentration and advanced glycation end products are two of the main factors in diabetes eliciting pathological responses of mesangial cells and contributing to the development of renal complications in diabetes. Thereby, our aim was determinate the contribution of high glucose concentracion and advanced glycation end products to cellular senescence in human mesangial cells and analyze the intracellular mechanism involved in this process.

In our experiments we demonstrate that both high glucose and glycated albumin induced cellular senescence in human mesangial cells. Nevertheless, the

ABSTRACT

mechanisms of the cellular senescence were different. We show that high glucose induced cellular senescence by a hyperosmolar stress response through p53-p21 and p16^{INK4a} signaling pathways. These effects were depending on reactive oxygen species production, oncogenic Ras and the mitogen-activated protein kinases ERk1/2 and p38 activation. Diabetic and mannitol-treated rats show an increase in both p53 and p16^{INK4a} in glomeruli even without renal failure. These results suggest that cellular senescence could be an important factor in the development of diabetic nephropathy through a mild increment in extracellular osmolarity.

Glycated albumin is one of the major advanced glycation end products in serum and it has been shown to accumulate during aging and related pathologies, such as Alzheimer disease and diabetes mellitus. We demonstrated that glycated albumin binds to the receptor of advanced glycation end products and induces cellular senescence in human mesangial cells through p53-p21 signal pathway. The release of the insulin-like growth factor 1 induced by glycated albumin and the autophosphorylation of its receptor promote the Ras-Erk1/2 pathway activation. This event induces the downregulation of the antioxidant enzyme catalase and the increase of reactive oxygen species which is responsible of the p53 increment and the senescence induction.

In summary, high glucose concentrations and glycated albumin induces cellular senescence in human mesangial cells which in part could contribute to the development of diabetic nephropathy.

El envejecimiento renal se asocia con alteraciones en la morfología del riñón y un descenso en su función, que puede acelerarse y/o acentuarse por enfermedades como la diabetes mellitus y la hipertensión. La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones microvasculares en la diabetes. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la célula mesangial está íntimamente involucrada en la glomeruloesclerosis, una manifestación de la etapa final de la enfermedad renal en la nefropatía diabética. Además la hipertrofia de la célula mesangial, engrosamiento de la membrana basal y expansión de la matriz mesangial son algunos de las características patológicas tempranas que se desarrollan en la nefropatía diabética. La senescencia celular fue descrita por primera vez como un fenotipo de parada de crecimiento permanente e irreversible en estudios realizados *in vitro* en fibroblastos humanos. Las células senescentes se mantienen viables pero muestran una morfología alterada, gran heterogeneidad, desarrollan hipertrofia, expresión de SA- β -galactosidas, acumulación de gránulos de lipofucsina y pérdida de respuesta a estímulos mitogénicos. En humanos, la senescencia celular se acompaña con una pérdida de telómeros y repeticiones de ADN al final de los cromosomas como resultado de la pérdida de la actividad telomerasa. Sin embargo, la senescencia celular puede también inducirse de manera prematura en respuesta a diversos tipos de estrés fisiológico, independientemente del número de divisiones celulares, a través de las vías celulares p16^{INK4a} y p53-p21. Algunas de las características de la senescencia, como la aparición de SA- β -gal y p16^{INK4a}, están presentes en el riñón envejecido aún sin presentar cambios morfológicos, sugiriendo que algunos aspectos de la senescencia celular pueden ser el inicio del envejecimiento renal. La célula senescente muestra algunas similitudes con la célula hipertrófica, y uno de los principales cambios morfológicos en el riñón diabético es la hipertrofia celular. Además, en modelos experimentales de nefropatía diabética es común la presencia de hipertrofia glomerular con un incremento en p21. Nosotros proponemos que la senescencia celular podría tener un papel importante en el desarrollo de las complicaciones renales asociadas con la diabetes y el envejecimiento.

Las altas concentraciones de glucosa y los productos de glicosilación avanzada son dos de los muchos factores que en diabetes podrían originar respuestas patológicas en la célula mesangial y contribuir al desarrollo de complicaciones renales en la diabetes. Por ello, nuestro objetivo fue determinar la implicación de las altas concentraciones de glucosa y los productos de glicosilación avanzada en la

senescencia en células mesangiales humanas y analizar los mecanismos intracelulares involucrados en este proceso.

Nuestros resultados han demostrado que tanto las altas concentraciones de glucosa como la albúmina glicosilada inducen senescencia en células mesangiales humanas. Sin embargo, los mecanismos intracelulares implicados son diferentes. Observamos que las altas concentraciones de glucosa inducen senescencia causando un ligero estrés hiperosmolar a través de las vías p53-p21 y p16^{INK4a}. Estos efectos son dependientes de la producción de especies reactivas de oxígeno, y la activación del oncogen Ras y las proteínas quinasas activadas por mitógenos Erk1/2 y p38. Las ratas diabéticas y tratadas con manitol muestran un incremento tanto en p53 como p16^{INK4a} en el glomérulo aún sin presentar fallo renal. Estos resultados sugieren que la senescencia celular podría ser un factor importante en el desarrollo de la nefropatía diabética a través de un ligero incremento en la osmolaridad extracelular.

La albúmina glicosilada es uno de los principales productos de glicosilación avanzada en suero y se ha visto acumulado durante el envejecimiento y en algunas patologías relacionadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus. Hemos demostrado que la albúmina glicosilada se une al receptor de los productos de glicosilación avanzada e induce senescencia en células mesangiales humanas a través de la vía p53-p21. La liberación del factor de crecimiento insulínico 1 por la albúmina glicosilada y la autofosforilación de su receptor induce la activación de la vía Ras-Erk1/2. Este evento induce la disminución de la enzima antioxidante catalasa y el incremento en especies reactivas de oxígeno que es responsable del incremento en p53 y la inducción de senescencia.

En resumen, las altas concentraciones de glucosa y la albúmina glicosilada inducen senescencia en células mesangiales humanas, contribuyendo al posible desarrollo de la nefropatía diabética.

INTRODUCCIÓN

1. SENESCENCIA CELULAR

La palabra senescencia proviene de la latina *senex*, que significa hombre viejo o de avanzada edad. En biología, la senescencia se describe como un proceso degenerativo que acompaña al desarrollo y la maduración (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007).

La senescencia celular se definió por primera vez como un fenotipo de parada de crecimiento permanente e irreversible en estudios realizados *in vitro* en fibroblastos humanos. Las células senescentes continúan siendo viables aunque presentan una morfología alterada, gran heterogeneidad, expresión de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), acumulación de gránulos de lipofucsina y pérdida de respuesta a estímulos mitogénicos (Hayflick, L. 1965; Wright, W.E. y Shay, J.W. 2002).

La senescencia se denomina *senescencia replicativa* si está acompañada con acortamiento de telómeros (repeticiones de ADN en los extremos de los cromosomas) en las sucesivas divisiones celulares, como resultado de la pérdida de la actividad de la enzima telomerasa (Blackburn, E.H. 2001; Yang, H. y Fogo, A.B. 2010).

La senescencia celular también puede inducirse de forma prematura en respuesta a diferentes situaciones de estrés fisiológico, independientemente del número de divisiones celulares. Este tipo de senescencia es la denominada como *senescencia prematuramente inducida* (Lloyd, A.C. 2002). Ésta puede desencadenarse en respuesta a estrés oxidativo, daño en el ADN, inducción de Ras y depleción de nutrientes (Melk, A. 2003). Sin embargo, también hay resultados que sugieren que el estrés oxidativo crónico contribuye al acortamiento telomérico dando lugar al fenotipo senescente (Houben, J.M. y col 2008).

1.1. EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso mediante el cual una célula da lugar a dos células hijas. En las células eucariotas el ciclo celular consiste fundamentalmente en dos procesos básicos: síntesis de ADN (fase S) y mitosis (Fase M) (Tyson, J.J. y col 2002). Durante la fase S, la doble cadena de ADN se replica dando lugar a un par cromátidas

INTRODUCCIÓN

hermanas unidas mediante unas proteínas llamadas *cohesinas* (Nasmyth, K. y col 2000). Las fases S y M están separadas por dos “lapsos” de tiempo G_1 y G_2 , constituyendo el ciclo celular genérico: G_1 -S- G_2 -M (Figura 1).

La adecuada progresión a través del ciclo celular, es salvaguardada por puntos de control (en inglés, *checkpoints*). Los puntos de control de fase G_1 controlan la entrada en fase S, asegurándose de que la célula sea lo suficientemente grande para albergar un nuevo ciclo de síntesis de ADN, de que cualquier daño en el ADN haya sido reparado y de que las condiciones externas sean favorables para la división celular (Elledge, S.J. 1996). Los puntos de control de fase G_2 controlan la entrada en mitosis asegurando que el ADN está completamente replicado, que cualquier nuevo daño en el ADN haya sido reparado y que la célula sea lo suficientemente grande para dividirse (Gardner, R.D. y Burke, D.J. 2000).

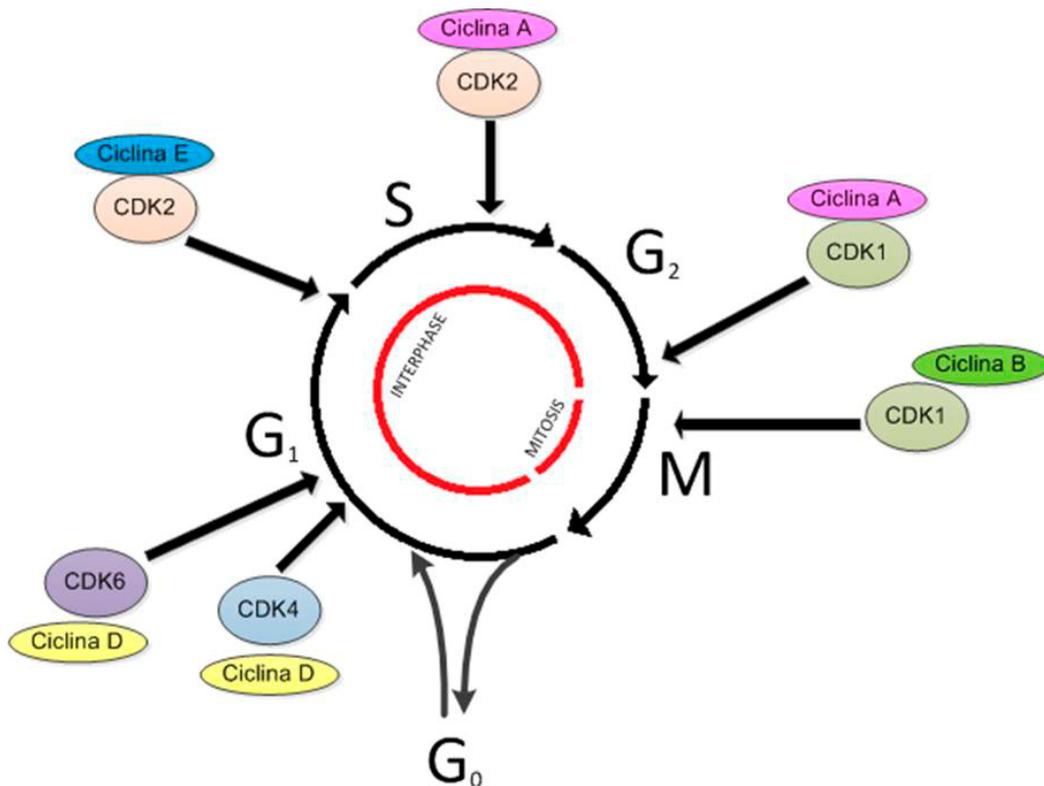


Figura 1. Fases del ciclo celular. En el esquema se muestran las diferentes fases que componen el ciclo celular así como las ciclinas y las CDK responsables de la regulación de cada fase del ciclo. Fuente: Vermeulen, K. y col 2003.

Antes de iniciar la replicación del ADN, las células que se encuentran en fase G_1 del ciclo pueden entrar en una fase de reposo conocida como G_0 . Las células en G_0

constituyen la mayor parte de las células que no están en estado de crecimiento o proliferación (Vermeulen, K. y col 2003). Cuando las células se encuentran en fase G₀ se denominan *quiescentes* (Blagosklonny, M.V. 2011) Esta parada de ciclo celular es reversible y estas células en presencia de las señales adecuadas pueden continuar su proliferación.

La progresión del ciclo celular está regulada principalmente por las quinasas dependientes de ciclina (CDK; del inglés, *cyclin-dependent kinases*). Se trata de una familia de serina/treonina quinasas que se activan en puntos específicos del ciclo celular mediante la unión a su ciclina correspondiente. Cuando se activa, la CDK induce una serie de procesos gracias a su actividad quinasa. (Pines, J. 1991; Morgan, D.O. 1995) Los niveles de proteína de las CDK permanecen estables durante la progresión del ciclo celular, al contrario que las ciclinas cuyos niveles aumentan o disminuyen durante el ciclo celular, regulando la actividad CDK (Evans, T. y col 1983; Pines, J. 1995). Cada fase del ciclo celular está regulada por diferentes ciclinas y CDK (Figura 1).

La actividad de las CDK puede verse impedida mediante proteínas inhibidoras del ciclo celular, conocidas como inhibidores de CDK (CKI; del inglés, *cyclin-dependent kinase inhibitor*), que se unen a la CDK o al complejo CDK-ciclina y regulan así su actividad. Pueden diferenciarse dos familias de CKI: la familia INK4 y la Cip/Kip, con funciones diferentes (Tabla 1) (Sherr, C.J. y Roberts, J.M. 1995).

| Familia CKI | Función | Miembros de la familia |
|-------------|---|--|
| INK4 | Inactivación de CKD de G1 (CDK4, CDK6) | p15 (INK4b) p16 (INK4a) p18 (INK4c) p19 (INK4d) |
| Cip/Kip | Inactivación de complejos ciclina-CDK de G1 y ciclina B-CDK | p21 (Waf1, Cip1) p27 (Cip2) p57 (Kip2) |

Tabla 1. Familias de CKI, funciones y miembros.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA SENESCENTE

Experimentos *in vitro* han identificado una serie de características de las células senescentes que se resumen a continuación:

1.2.1. Parada de crecimiento: Las células senescentes presentan parada de crecimiento, normalmente en fase G1 del ciclo celular, manteniendo un contenido normal de ADN y continúan siendo metabólicamente activas. Una vez paradas, no consiguen iniciar la replicación del ADN a pesar de presentar las condiciones de crecimiento adecuadas para ello, principalmente debido a la expresión de inhibidores del ciclo celular. Al contrario que la célula *quiescente*, la parada de ciclo de la célula senescente es permanente porque no consigue proliferar frente a ningún estímulo fisiológico conocido (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007).

1.2.2. Resistencia a la apoptosis: La apoptosis es un proceso de destrucción celular controlado (Ellis, R.E. y col 1991) que, como la senescencia, es una respuesta extrema al estrés celular. La mayor parte de las células adquieren resistencia a ciertos signos apoptóticos cuando entran en senescencia pero no está claro qué determina que una célula entre en senescencia o en apoptosis. Uno de los factores a tener en cuenta es el tipo celular ya que hay células que tienden a entrar en senescencia frente a un estrés celular, como los fibroblastos o las células epiteliales, mientras que otras son más susceptibles a la apoptosis, como los linfocitos. Otro factor importante es la naturaleza e intensidad del daño o estrés. Los sistemas reguladores de senescencia y apoptosis están comunicados por un regulador común, p53. Se ha postulado que en las células senescentes se da una regulación post-traducciona de p53 que impide la activación de vías que inducen apoptosis (Seluanov, A. y col 2001).

1.2.3. Hipertrofia celular: Las células senescentes presentan un incremento en su tamaño que algunas veces puede llegar al doble de las células no senescentes (Hayflick, L.1965).

1.2.4. Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal): Las células senescentes generalmente adoptan una morfología alargada (Hayflick, L. 1965) y expresan SA- β -gal que es citológicamente detectable en células y tejidos. La enzima β -galactosidasa es una enzima hidrolasa lisosomal cuya función es la de cortar los extremos β -glicosídicos de una gran variedad de sustratos como gangliósidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. En células quiescentes es

detectada a pH 4.0 mientras que en la célula senescente se observa una actividad β -galactosidasa presente a pH 6.0. Existen diversas teorías para justificar su presencia. Una de ellas es que podría ser debida a un aumento de la actividad lisosomal en la célula senescente, incrementando su presencia a pH 6.0 aunque hay estudios que indican que algunas células senescentes pueden expresar una forma alternativa de la β -galactosidasa que presenta actividad a pH 6.0, o bien puede cambiar su localización variando el pH óptimo de actuación de la β -galactosidasa ácida (Morreau, H. y col 1989; Dimri, G.P. y col 1995).

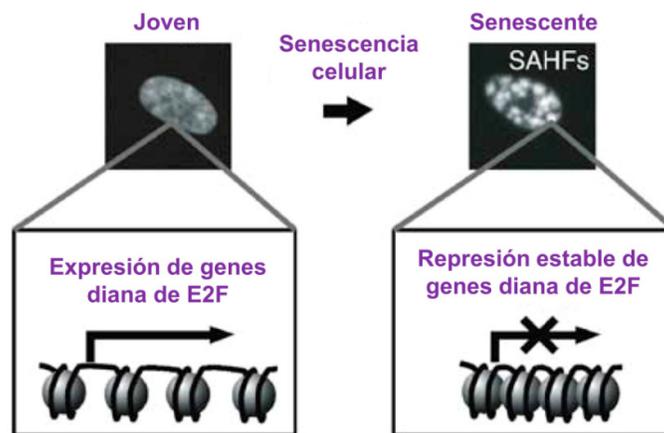


Figura 2. Regiones de heterocromatina asociada a senescencia (SAHFs). La formación de las regiones SAHFs contribuye a la parada de ciclo celular estable a través de la represión de genes diana del factor de transcripción E2F que son necesarios para la transición de fase G1 a fase S de ciclo celular. Fuente: Funayama, R. e Ishikawa, F. 2007.

1.2.5. Estrés (epi) genético. El estrés genético puede deberse a daño directo en el ADN, telómeros disfuncionales, disrupción de cromatina, o fuertes estímulos mitogénicos, como los causados por determinados oncogenes. Este tipo de estrés puede generar una persistente señal de respuesta a daño al ADN (DDR; del inglés *DNA damage response*), dando lugar a una región de daño citológicamente detectable en el núcleo denominada DNA-SCARS (Segmentos de cromatina alterada que refuerza la senescencia; del inglés *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). La DDR mantiene la actividad de p53 que a su vez, mantiene la parada de crecimiento característica de la senescencia mediante la estimulación de la transcripción de genes implicados en la inhibición del ciclo celular (Campisi, J. 2011; Rodier, F. y Campisi, J. 2011).

1.2.6. Expresión de p16^{INK4a}. Muchas células senescentes expresan el CKI p16^{INK4a}, activando la proteína de retinoblastoma (RB), que en algunas células, organiza la formación de regiones citológicamente detectables de heterocromatina asociada a senescencia (SAHF; del inglés, *senescence associated heterocromatin foci*) (Figura 2). Esta región silencia la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Narita, M. y col 2003; Ohtani, N. y col 2004).

1.2.7. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Las células senescentes que albergan DNA-SCARS liberan numerosas citoquinas, factores de crecimiento y proteasas que presentan un amplio rango de actividades endocrinas y paracrinas (Young, A.R. y Narita, M. 2009).

1.3. VÍAS CELULARES REGULADORAS DE SENESCENCIA

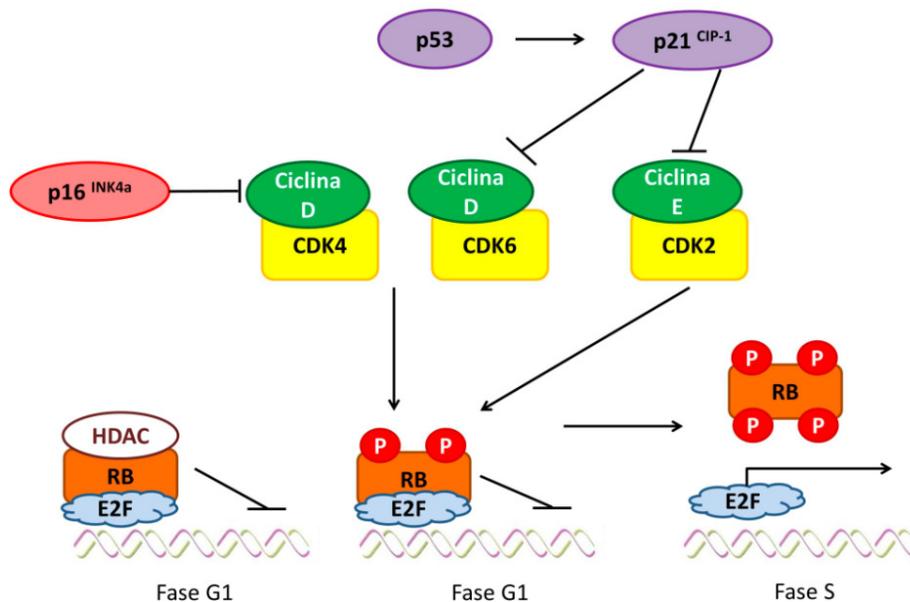


Figura 3. Esquema de regulación de la proteína RB y la progresión de ciclo celular. p16^{INK4a} es capaz de inhibir al complejo Ciclina D/CDK4 y p53, que activa al CKI p21, inhibe los complejos Ciclina D/CDK6 y Ciclina E/CDK2. La proteína RB en fase G1 se encuentra inhibida por histonas desacetilasas (HDAC), encontrándose unida al factor de transcripción E2F. Cuando se inhibe la HDAC, la RB es susceptible de fosforilación por parte de los complejos Ciclina/CDK permitiendo así la liberación de E2F, favoreciendo la progresión de ciclo celular. Fuente: Ohtani, N. y col 2004.

La parada de crecimiento en la célula senescente está estabilizada y mantenida por las vías de p53 y p16^{INK4a}. Estas vías pueden interactuar entre sí, pero también pueden controlar la progresión del ciclo celular de manera

independiente, respondiendo a estímulos diferentes y de forma distinta en función del tipo celular. Por lo general, la mayoría de las células entran en senescencia a través de la activación de la vía p53, p16^{INK4a} o ambas, aunque también se han visto algunos ejemplos de presencia de senescencia independiente de estas vías (Olsen, C. L y col 2002, Michaloglou, C y col 2005; Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007).

Ambas vías tienen en común la regulación de la actividad de la proteína del retinoblastoma (RB). La actividad de esta proteína está estrechamente regulada por varias modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación y ubiquitinación. RB actúa bloqueando la progresión de fase G1 del ciclo celular a fase S, impidiendo la activación del factor de transcripción E2F, implicado en la expresión de genes involucrados en la replicación de ADN. Diferentes complejos ciclina-CDK actúan fosforilando a RB, que pierde su función y libera a E2F, iniciándose la síntesis de ADN (Figura 3) (Ohtani, N. y col 2004).

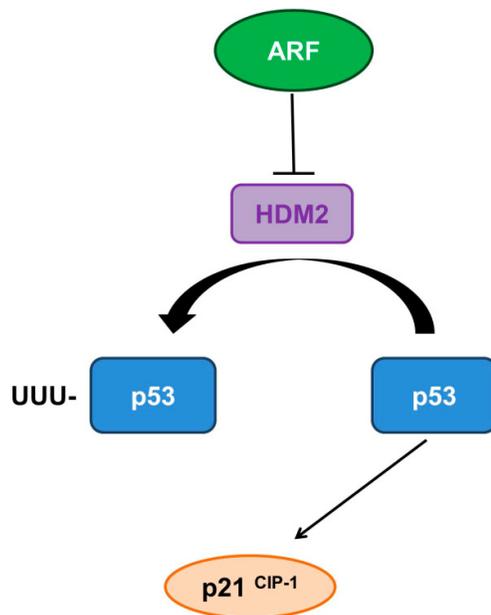


Figura 4. Esquema de regulación de la actividad de p53. p53 es regulada negativamente por HDM2 que la ubiquitina para su degradación por proteosoma, impidiendo la expresión del CKI p21. ARF es capaz de inhibir a HDM2, permitiendo que p53 active la expresión de p21. Fuente: Campisi, J. y col 2007.

1.3.1. Vía p53: Numerosos estudios han descrito que p53 es un factor de transcripción que actúa sobre varios genes diana en respuesta a estrés celular. Sus principales funciones son bloquear el progreso del ciclo celular y/o inducir apoptosis. p53 puede inducir parada en fase G1 a través de la activación transcripcional del CKI p21, aunque p53 también puede regular la transición G2/M de ciclo celular. (Suzuki, K. y Matsubara, H. 2011). La senescencia mediada por p53 está regulada por la E3 ubiquitín ligasa HDM2 (del inglés, *human doble minute 2*) (MDM2 en ratón). Ésta es capaz de ubiquitinar a p53, transportarlo del núcleo al citoplasma y promover su degradación por proteosoma. Sin embargo, HDM2 no sólo puede ubiquitinar a p53 si no que también se puede ubiquitinar a sí misma.

La exposición de la célula a un determinado estrés puede aumentar la “auto-ubiquitinación” de HDM2 y su degradación, estabilizando por tanto a p53, siendo así susceptible de activación por diferentes moléculas (Alarcon-Vargas, D. y Ronai, Z. 2002). HDM2 está a su vez regulado negativamente por ARF (del inglés, *alternate-reading-frame protein*). (Sherr, C.J. y McCormick, F. 2002) (Figura 4). Como se ha comentado antes, p53 actúa como factor de transcripción del gen p21 (también conocido como p21^{CIP}), que es un CKI y es el mediador de la senescencia dependiente de p53 (Brown, J.P. y col 1997). Sin embargo, p21 también puede mediar una parada de crecimiento transitoria como respuesta a daño en el ADN, de tal modo que la parada en ciclo celular mediada por p53-p21^{CIP} también puede ser reversible (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007).

1.3.2. Vía p16: p16^{INK4a} es un gen que forma parte del locus INK4a/ARF, que codifica para dos proteínas: p16^{INK4a}, inhibidor de las CDK4 y CDK6, y la proteína ARF que es un potente regulador de la actividad de p53. p16^{INK4a} actúa uniéndose a CDK4/6 induciendo así un cambio conformacional alostérico que interrumpe la interacción con la ciclina D y como consecuencia se antagoniza la activación de la CDK (Vandenberk, B. y col 2011).

1.4. MECANISMOS INDUCTORES DE SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular puede inducirse por diferentes tipos de estrés celular:

1.4.1. Senescencia dependiente de telómeros: Los telómeros son secuencias repetidas del ADN (5'-TTAGGG-3' en vertebrados) y se encuentran asociadas a proteínas que cubren los extremos lineales de los cromosomas protegiéndolos de su degradación o fusión (d'Adda di Fagagna, F. y col 2004).

Debido a que las ADN polimerasas no pueden replicar completamente los extremos del ADN, las células pierden entre 50-200 pares de bases de su región telomérica en cada fase S del ciclo celular (Harley, C.B., y col 1990) (Figura 5). La mayor parte de las células somáticas no presentan actividad detectable de la enzima telomerasa, que es la encargada de la síntesis *de novo* de repeticiones teloméricas. El acortamiento progresivo de los extremos teloméricos es el responsable de la activación de la senescencia (Zhang, H. 2007).

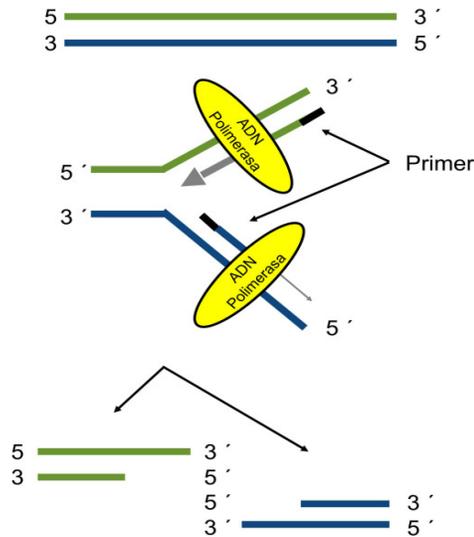


Figura 5. El problema del final de replicación. Los primers de ARN sirven como puntos de inicio de la transcripción y pueden ser reemplazados por ADN en cualquier lugar excepto en el extremo 5'-terminal. De este modo, la nueva cadena de ADN que se sintetice será ligeramente más corta que la anterior. Fuente: Klapper, W., R. y col 2001.

La actividad telomerasa está presente en líneas celulares inmortales *in vitro* y también en tumores celulares y células germinales *in vivo*. Asimismo, la telomerasa se expresa en células que presentan un potencial replicativo extendido en el tiempo, como las células embrionarias, linfocitos T y B y células de las regiones proliferativas de los tejidos regenerables (Dhaene, K., E. y col 2000; Klapper, W., R. y col 2001) (Figura 6). El acortamiento de los telómeros da lugar a la activación de mecanismos de reparación de ADN (DDR) que en función del daño será un mecanismo de reparación transitorio o persistente (Campisi, J. 2011).

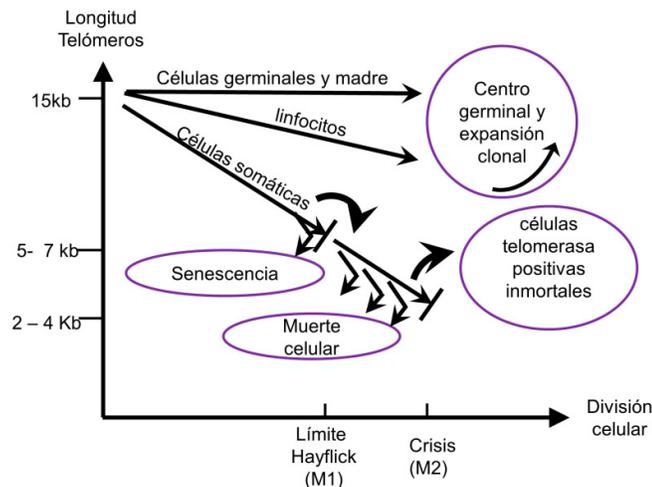


Figura 6. La longitud de los telómeros se mantiene constante en células de la línea germinal y células madre. Los telómeros, en las células somáticas telomerasa negativas se van acortando con las replications. Estas células cuando llegan al límite de Hayflick (M1) entran en senescencia irreversible. A partir del límite M2 las células necesitan actividad telomerasa para mantenerse viables. Fuente: Klapper, W.R. y col 2001.

1.4.2. Daño en el ADN: Un daño en el ADN puede inducir senescencia en diversos tipos celulares. La senescencia celular iniciada tanto por daño en el ADN como por acortamiento telomérico es dependiente de p53 y p21 (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007). Sin embargo, la senescencia no es la principal respuesta celular al daño en el ADN ya que éste también puede inducir muerte celular o una parada de crecimiento reversible. No está claro qué determina una respuesta celular u otra. Parece que la senescencia es usualmente inducida por niveles bajos de daño (Vandenberk, B. y col 2011). La senescencia celular mediada por el daño en el ADN, también puede activar la vía de p16^{INK4a}. Mientras que la actividad de p53 y p21 es inducida inmediatamente después del daño y sus niveles pueden disminuir después de algunos días. Por el contrario, los niveles de p16^{INK4a} pueden aumentar de manera gradual durante este periodo. Esto sugiere que mientras p53 y p21 inician la senescencia, p16^{INK4a} actúa manteniendo este estado (Ben-Porath, I. y Weinberg, R.A. 2005).

1.4.3. Estrés oxidativo: El estrés oxidativo y la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) juegan un papel importante en la inducción de senescencia. El cultivo de fibroblastos humanos en condiciones de oxígeno superiores a un 50% induce senescencia. Asimismo, estas células presentan una mayor esperanza de vida cuando crecen en un ambiente bajo en oxígeno (3%). Además, cuando se inhibe alguna enzima antioxidante, los niveles intracelulares de ROS aumentan y dan lugar a senescencia prematura. Los ROS pueden producir daño en diferentes componentes celulares a través de la oxidación del ADN, proteínas y lípidos, pero también pueden actuar como segundo mensajero en rutas de señalización específicas. Se ha visto que la vía principal de senescencia activada por ROS es la vía p53-p21 aunque también p16^{INK4a} puede activarse en respuesta a estrés oxidativo, principalmente a través de la acción de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) p38 (Ben-Porath, I. y Weinberg, R.A. 2005; Vandenberk, B. y col 2011).

1.4.4. Oncogenes: Los oncogenes son versiones mutantes de genes normales que tienen un potencial transformante (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007). Células normales pueden volverse senescentes en respuesta a la activación constitutiva de diversos oncogenes. Este fenómeno fue descrito por primera vez cuando la forma oncogénica de Ras, una molécula de transducción celular que responde a estímulos mitogénicos, se vio expresada en fibroblastos

humanos normales (Serrano, M. y col 1997). Asimismo, otros miembros de la vía de señalización de Ras (RAF, MEK, MOS y BRAF) se ha visto que inducen senescencia cuando están sobreexpresados o se expresan sus versiones oncogénicas (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007). La senescencia inducida por Ras en células humanas implica tanto a p53 como a p16^{INK4a}, aunque se ha visto un papel predominante de p16^{INK4a} puesto que su inactivación es suficiente en algunos tipos celulares para prevenir este tipo de senescencia (Brookes S. y col 2002). También la proteína MAPK p38 tiene un papel importante en la senescencia mediada por Ras y en la activación de p16^{INK4a} y p53 (Iwasa H. y col 2003).

1.4.5. Perturbación de cromatina: El estado de la cromatina determina cómo los genes que alberga una determinada región están activos (eucromatina) o silentes (heterocromatina), y esto depende principalmente de las modificaciones de histonas, como acetilación o metilación. La inhibición química de la actividad histona desacetilasa, que promueve la formación de eucromatina, induce senescencia. Se trata de un mecanismo poco conocido y que puede diferir en función de las especies y el tipo celular. Por ejemplo, en fibroblastos humanos, la inhibición de la actividad histona desacetilasa induce la expresión de p21 y p16^{INK4a} (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007).

2. MECANISMOS Y VÍAS CELULARES IMPLICADAS EN EL ENVEJECIMIENTO

Los primeros estudios sobre senescencia celular *in vivo* mostraron que hay un incremento en el número de células senescentes con la edad. Asimismo, las células senescentes han sido identificadas en lugares severamente dañados en patologías relacionadas con la edad como la arterioesclerosis, la fibrosis túbulointersticial renal y glomerulosclerosis, osteoartritis y discos intervertebrales degenerados (Campisi, J. 2011).

Debido a que los tejidos presentan una determinada cantidad de células, la acumulación de células senescentes que no se dividen puede comprometer la capacidad de renovación y reparación del tejido. Además, ciertos genes que se encuentran sobreexpresados por la respuesta senescente pueden codificar para proteínas solubles que pueden alterar el microambiente del tejido, alterando así su estructura y función (Campisi, J. 2005).

Los factores liberados por las células senescentes varían en función del tipo celular. El fenotipo senescente más estudiado es el de los fibroblastos humanos. Los fibroblastos senescentes liberan altos niveles de diferentes metaloproteinasas de matriz, factores de crecimiento epitelial y citoquinas inflamatorias (Krtolica, A, y Campisi, J. 2001). De algún modo, el fenotipo secretor de los fibroblastos senescentes se asemeja a una respuesta al daño, dando lugar a la remodelación local de la estructura del tejido. La respuesta local al daño tisular también implica inflamación, siendo un factor que aparece con frecuencia en los tejidos envejecidos y en diversas enfermedades relacionadas con la edad como la arterioesclerosis y el cáncer. Por tanto, las células senescentes podrían estar contribuyendo al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Campisi, J. 2005).

Por otro lado, la senescencia celular puede comprometer la cantidad de células madre, progenitoras y sus nichos. En el organismo adulto, muchas células madre y progenitoras pueden entrar en senescencia al perder la capacidad telomerasa e impedir la regeneración tisular. Se ha descrito un incremento en la expresión de p16^{INK4a} durante el envejecimiento en células progenitoras de cerebro, médula ósea y páncreas, que suprimen la proliferación de estas células y por tanto, la regeneración del tejido (Campisi, J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007). Además, el microambiente

senescente podría alterar la capacidad de proliferación, diferenciación y/o movilización de las células madre residentes (Campisi, J. 2005).

2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO (IGF-1)

La primera vía celular que se implicó en el envejecimiento fue la del factor de crecimiento insulínico (IGF-1; del inglés *insulin like growth factor 1*). En *Caenorhabditis elegans*, mutaciones que disminuyen la actividad de *daf-2*, que codifica para un receptor hormonal similar al receptor de IGF-1 (IGF-1R), dan lugar a animales con el doble de esperanza de vida (Kimura, K.D. y col 1997). El ratón deficiente en IGF-1R también es más longevo y dispone de una mayor resistencia a estrés oxidativo (Holzenberger, M. y col 2003).

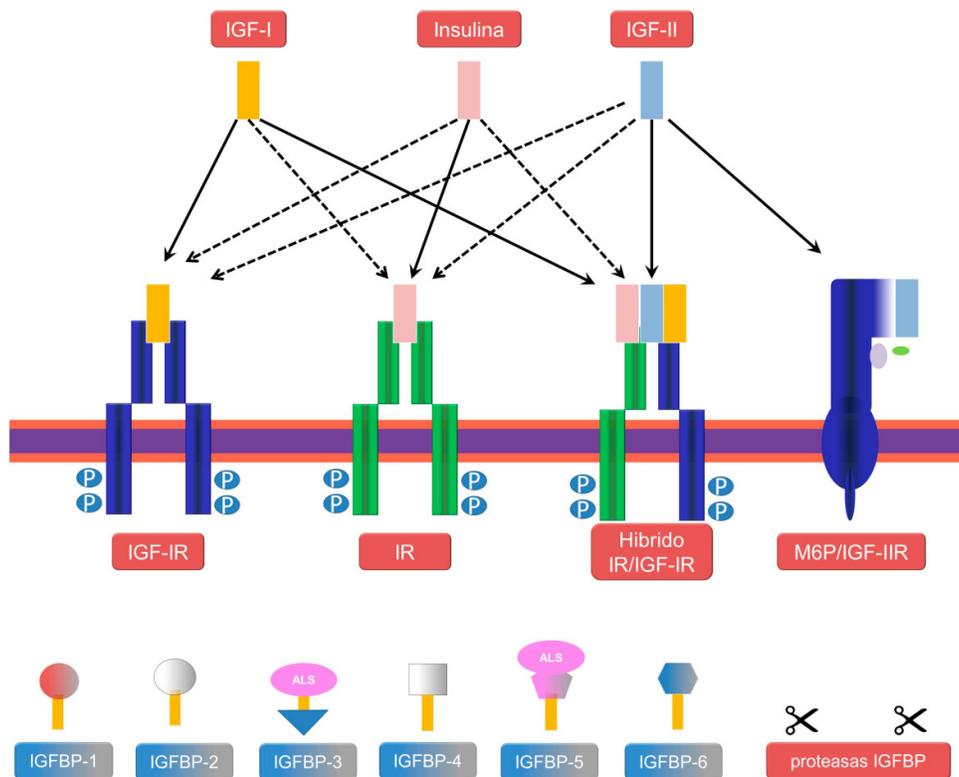


Figura 7. El sistema IGF. El sistema IGF está constituido por ligandos (IGF-1, insulina e IGF-2), sus receptores (Receptor IGF-1, IGF-1R; receptor de insulina, IR; el híbrido IR/IGF-1R y el receptor manosa 6-fosfato/IGF-2, M6P/IGF-2R), seis proteínas de unión a IGF y sus proteasas. Las flechas enteras y las discontinuas indican alta y baja afinidad de la unión del ligando, respectivamente Fuente: Annunziata, M. y col 2011

En mamíferos, el sistema de señalización de IGF alberga una familia de péptidos filogenéticamente muy conservados, involucrados en el crecimiento, desarrollo y metabolismo, así como en diversos procesos celulares como proliferación, supervivencia, migración celular y diferenciación (Figura 7) (Annunziata, M. y col 2011).

El IGF-1 es sintetizado principalmente en el hígado bajo la influencia de la hormona de crecimiento, siendo el mayor promotor del crecimiento postnatal (Scharf, J.G. y col 2001), sin embargo, IGF-1 también es producido en otros órganos como el riñón, el músculo y el hueso pudiendo actuar de manera autocrina, paracrina o como factor de crecimiento endocrino (Wu, J y Zhu, A.X. 2011).

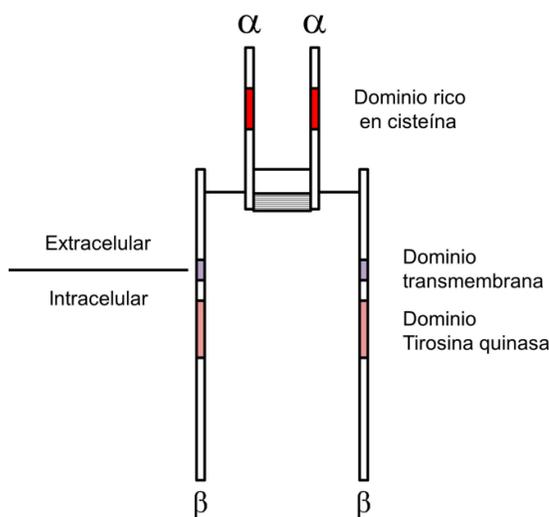


Figura 8. Estructura del receptor de IGF-1. El IGF-1R es un receptor tipo tirosina quinasa, con múltiples lugares intracelulares para autofosforilación. Fuente: Steele-Perkins G y col 1988.

En la circulación así como en los fluidos extravasculares, IGF-1 se encuentra unido a proteínas que se unen a IGF (IGFBP; del inglés *insulin-like growth factor binding proteins*), prolongando su vida media y modulando su biodisponibilidad y actividad (Rapp, R. y col 1988). Por un lado, las IGFBP pueden aumentar la activación del IGF-1R aumentando la vida media del IGF-1, pero por otro, pueden reducirlo por competitividad, inhibiendo la unión de IGF-1 a su receptor (Le Roith D, 2003).

IGF-1 se une con una alta afinidad a su receptor, IGF-1R. El IGF-1R también tiene cierta afinidad a IGF-2 e insulina pero con una afinidad más baja (Le Roith, D. 2003). El gen de IGF-1R codifica para una proteína precursora de 180 KDa y 1367 aminoácidos. Su ruptura genera las subunidades α y β que son glicosiladas y procesadas proteolíticamente para dar lugar al receptor maduro formado por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por enlaces covalentes. Las dos subunidades α son extracelulares y contienen los lugares de unión a IGF-1, mientras que las subunidades β atraviesan la membrana celular y en la región intracelular presentan los dominios tirosina quinasa (Steele-Perkins G y col 1988) (Figura 8).

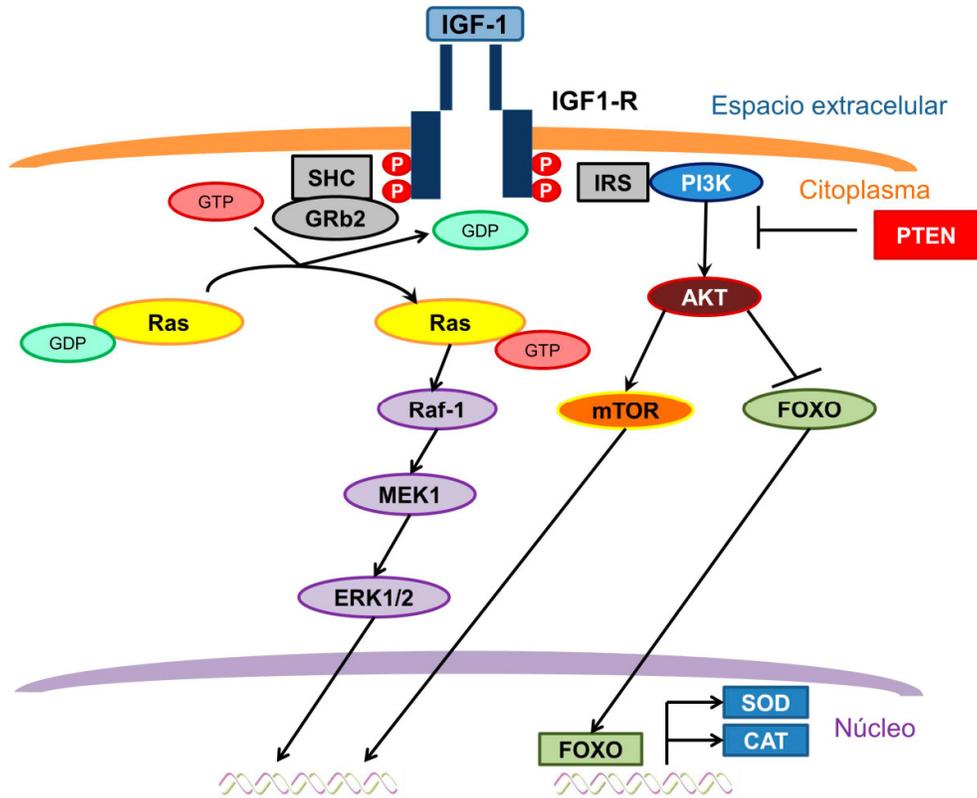


Figura 9. Esquema señalización IGF-1R con las principales vías intracelulares implicadas.

Fuente: Avogaro, A. y col 2010.

La unión de IGF-1 al IGF-1R induce la autofosforilación de sus subunidades β . El IGF-1R activado puede activar a su vez múltiples cascadas de señalización intracelular, incluyendo la cascada de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K; del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*)-Akt y la cascada de Raf-Mek-Erk1/2, a través de moléculas adaptadoras. La más conocida de ellas, IRS-1 (sustrato del receptor de insulina 1; del inglés, *insulin receptor substrate 1*), presenta múltiples residuos de tirosina que son utilizados como lugares de reconocimiento para activar diferentes moléculas de señalización. Por ejemplo, ciertos residuos de tirosina fosforilados pueden ser reconocidos por dominios SH2 (del inglés *src homology 2*) de diversas proteínas citoplasmáticas como PI3K o Grb2 (del inglés *growth factor receptor-bound protein 2*). Grb2 puede a su vez reconocer a otra molécula adaptadora del IGF-1R, Shc. Grb2 es una proteína intercambiadora de nucleótidos que cataliza el intercambio de guanósín difosfato (GDP; del inglés, *guanosine diphosphate*) a guanósín trifosfato (GTP; del inglés, *guanosine triphosphate*) en la proteína Ras. Esto da lugar a su activación y posterior activación de la cascada Raf-1-MEK1-Erk1/2. Erk1/2 una vez

activos se translocan al núcleo para actuar como factores de transcripción (Duan, C. y col 2010; Avogaro, A. y col 2010).

Por otro lado, la activación de PI3K daría lugar a la fosforilación de Akt, activándolo. Akt es capaz de regular diversas vías celulares implicadas en el envejecimiento como mTOR (del inglés; *mammalian target of rapamycin*) o la familia FoxO (del inglés; *forkhead box transcription factor*). FoxO es una familia de factores de transcripción que entre otras funciones, facilita la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa o la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). Akt activo fosforila a FoxO impidiendo su translocación al núcleo, y por tanto impidiendo la expresión de las enzimas antioxidantes (Avogaro, A. y col 2010) (Figura 9).

2.2. PROTEÍNA KLOTHO

El gen *klotho* codifica para una proteína de membrana que se expresa principalmente en el riñón y en las células del plexo coroideo del cerebro. El ratón que presenta una deficiencia en la expresión de *klotho* desarrolla un síndrome de envejecimiento (Kuro-o, M y col, 1997), mientras que la sobreexpresión de *klotho* en ratón aumenta su esperanza de vida (Kurosu, H y col 2005). La proteína *klotho* está compuesta por un dominio extracelular largo (130 KDa), un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto (10 aminoácidos). El dominio extracelular presenta homología con la familia 1 de glucosidasas (enzimas que hidrolizan los extremos glucosídicos en azúcares, glucoproteínas y glucolípidos) y es sujeto de ruptura proteolítica por diversas metaloproteinasas. Como resultado, todo el dominio extracelular puede liberarse al espacio extracelular y detectarse en sangre, orina y líquido cerebroespinal (Imura, A. y col 2004; Kurosu, H. y col 2005; Chen, C.D. y col 2007; Bloch, L. y col 2009). Esto da lugar a la existencia de dos isoformas de *klotho*: *klotho* membrana y *klotho* soluble, con funciones diferentes que se resumen a continuación:

La isoforma de membrana actúa como co-receptor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR; del inglés, *fibroblast growth factor receptor*) para la hormona FGF23 (del inglés; *fibroblast growth factor 23*) que regula la excreción de fosfato y la síntesis de la vitamina D activa en el riñón (Kurosu, H. y col 2006; Urakawa, I. y col 2006; Kuro-o, M. 2006). (Figura 10)

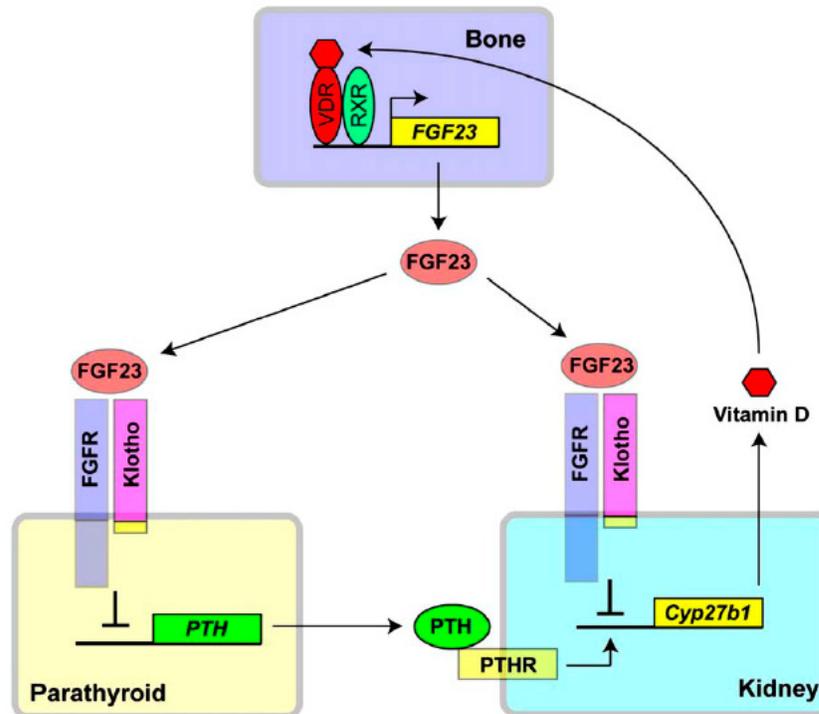


Figura 10. Regulación endocrina del metabolismo de la vitamina D por klotho y FGF23. La vitamina D activa (1,23-dihidroxitamina D3) se une al receptor de vitamina D (VDR) en los osteocitos, favoreciendo la liberación de FGF23 al espacio extracelular. FGF23 puede reconocer el complejo klotho-FGFR en el riñón y en la glándula paratiroide. En el riñón FGF23 inhibe la expresión del gen *Cyp27b1* que codifica para la 1 α -hidroxilasa, responsable de la activación de la vitamina D. En la glándula paratiroide, FGF23 inhibe la expresión de la hormona paratiroidea (PTH). La PTH puede unirse al receptor de PTH (PTHR) en riñón, favoreciendo la expresión del gen *Cyp27b1*. Fuente: Kuro-o, M. 2009.

Cuando se desarrolló un ratón deficiente en FGF23 se observó un fenotipo idéntico al ratón deficiente en klotho, lo que hace indicar la estrecha relación entre FGF23 y klotho. Una de las anomalías encontradas en ambos ratones es la presencia de hiperfosfatemia e hipervitaminosis D, sugiriendo que los fenotipos relacionados con envejecimiento que se desarrollan en estos animales pudieran ser debidos a la retención de fosfato y/o vitamina D. Diversos laboratorios han recuperado el fenotipo de envejecimiento del ratón deficiente en klotho o FGF23 resolviendo la hiperfosfatemia y/o la hipervitaminosis D (Kuro-o, M. 2011). También se ha visto en estudios epidemiológicos que pacientes con altos niveles de fosfato presentan un índice de mortalidad un 70% superior a los individuos con niveles bajos de fosfato. (Kuro-o, M. 2010) (Figura 11).

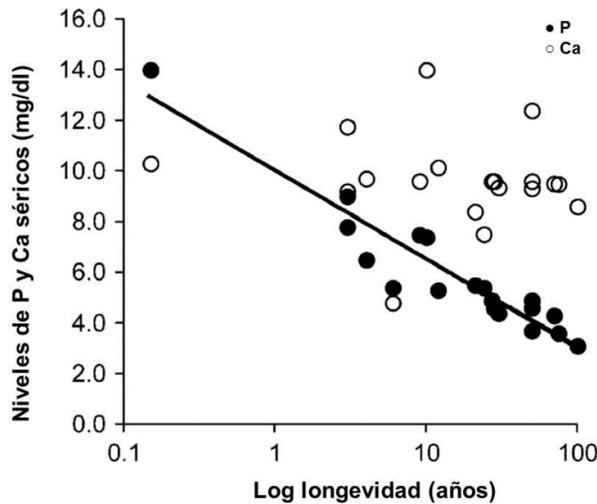


Figura 11. Relación entre la longevidad de diferentes especies de mamíferos y los niveles de calcio y fosfato séricos. La longevidad está inversamente correlacionada con los niveles de fosfato en sangre, sin embargo, no existe una correlación significativa entre la longevidad y los niveles de Ca. Fuente: Kuro-o, M. 2010.

En cuanto a la isoforma soluble de klotho, presenta funciones pleiotrópicas como factor humoral independientemente de FGF23 (Tabla 2).

| | Glucoproteínas reguladas por Klotho soluble | Efectos de Klotho |
|------------------------|--|-------------------------------|
| Canales iónicos | Isoforma 5 del receptor transitorio tipo vaniloide (TRPV5) | ↑ Entrada de Ca ²⁺ |
| Transportadores | Canal de potasio de médula renal 1 (ROMK1) | ↑ Entrada de K+ |
| | Cotransportador Na-dependiente de fosfato tipo IIa (Npt2a) | ↓ Entrada Pi |
| | Cotransportador de fosfato Na-dependiente tipo III (Pit-1,2) | ↓ Entrada Pi |
| Receptores | Receptores insulina/IGF-1 | Inhibición |
| | Receptor TGF-β1 (tipo II) | Inhibición |

Tabla 2. Funciones de la isoforma soluble de Klotho. Fuente: Kuro-o, M. 2011

Klotho soluble regula la actividad de múltiples factores de crecimiento, incluyendo a insulina/IGF-1, Wnt y el factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1; del inglés; *transforming growth factor β1*) (Kuro-o, M. 2011). Se postula que debido a que la vía de insulina/IGF-1 está relacionada con el envejecimiento, la inhibición de ésta, por parte de klotho pudiera estar relacionada en parte con las propiedades anti-envejecimiento de klotho. El ratón transgénico que sobreexpresa klotho presenta una mayor esperanza de vida y desarrolla una ligera resistencia a insulina e IGF-1 sin desarrollar diabetes (Kurosui, H y col, 2005). El mecanismo por el cual klotho soluble

inhibe la señalización de insulina/IGF-1 está todavía por determinar. klotho, al actuar como inhibidor de la señalización de IGF-1 favorecería la expresión de enzimas antioxidantes como la MnSOD y la catalasa. La deficiencia en klotho, por tanto favorecería la presencia de ROS intracelular al disminuir la expresión de enzimas antioxidantes. Por otro lado, klotho inhibe la señalización de Wnt, por unión directa a los ligandos de Wnt y previniendo su unión a su receptor. (Liu, H. y col 2007).

Recientemente se ha descrito que klotho soluble puede inhibir la señalización de TGF- β 1 mediante la unión al receptor de membrana de TGF- β tipo 2 (TGF β T2), previniendo la unión a TGF- β 1. TGF- β 1 es el más potente inductor de transición epitelio-mesénquima (EMT; del inglés, *epithelial-to-mesenchymal transition*). EMT es un proceso celular por el cual células epiteliales pierden sus características epiteliales y dan lugar a un fenotipo de transición para adquirir caracteres mesenquimales, incluyendo la habilidad de migrar y proliferar. EMT es esencial para la reparación tisular en respuesta al daño pero que puede dar lugar a fibrosis bajo condiciones patológicas en el riñón y otros tejidos, incluyendo el hígado, pulmón y corazón. La habilidad de klotho de inhibir la actividad de TGF- β 1 interfiere en EMT previniendo la fibrosis tisular y la metástasis. Por otro lado, la inyección de la forma soluble de klotho previene la fibrosis renal inducida por obstrucción ureteral unilateral y la metástasis en ratón (Doi, S. y col 2011). Todas estas actividades de la forma soluble de klotho podrían también contribuir al alargamiento de la vida en el ratón que sobreexpresa esta proteína.

2.3. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXO

FoxO (del inglés; *forkhead box transcription factor*) es una familia de factores de transcripción que juegan un papel importante en vías mediadas por factores de crecimiento e insulina. El descubrimiento de la funciones de FoxO comenzó con la identificación del gen DAF-16 en *C. elegans*. Éste gen, estaría regulado por el receptor DAF-2, homólogo al IGF-1R/receptor de insulina de mamíferos. Diversos estudios han conectado esta vía con la longevidad de *C. elegans*, observando que mutaciones en DAF-2 promueven la activación de DAF-16, dando lugar a animales que vivían durante más tiempo que los controles (Kenyon, C. y col 1993; Tzivion, G. y col 2011).

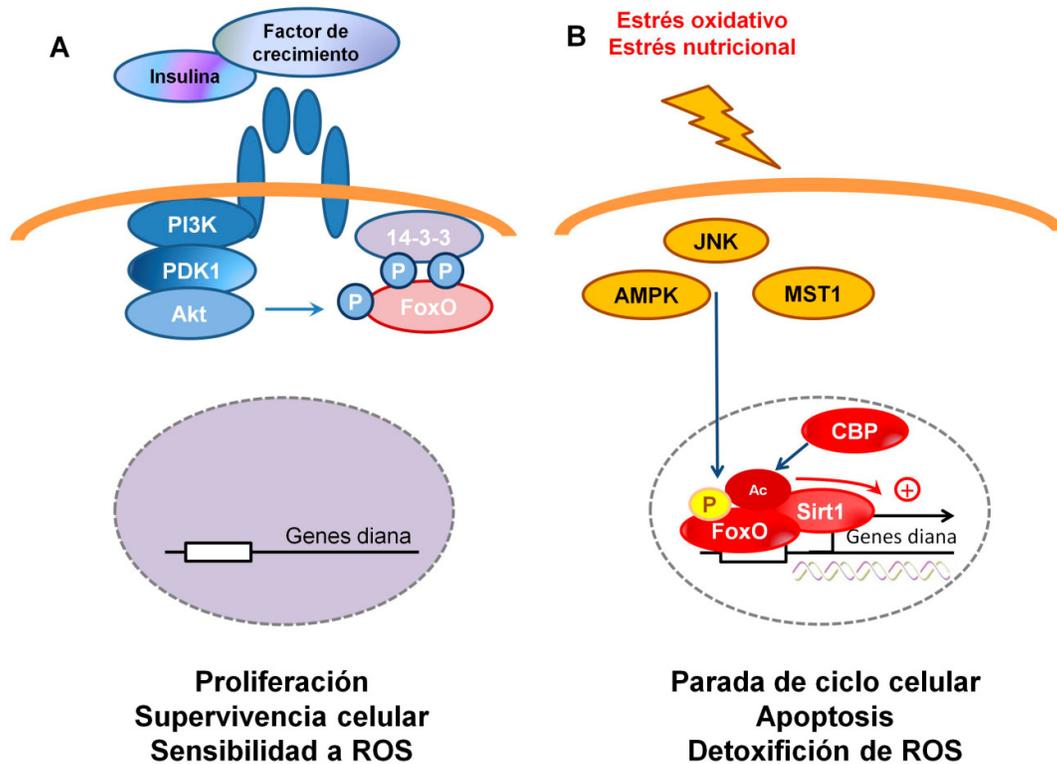


Figura 12. Regulación negativa de FoxO por factores de crecimiento y positiva por estrés oxidativo. (A) Tras la estimulación por factores de crecimiento, se induce la activación de Akt que fosforila a FoxO en tres residuos, promoviendo su salida del núcleo y unión a la chaperona 14-3-3, inhibiéndolo. (B) El estrés oxidativo induce la fosforilación, acetilación y monoubiquitinación de FoxO en diferentes lugares, a través de factores como AMPK, JNK, MST1 y CBP. En respuesta a estrés oxidativo, FoxO se transloca al núcleo uniéndose a la desacetilasa Sirt1, promoviendo la expresión de genes involucrados en la parada de ciclo celular y la respuesta a estrés.

Fuente: Salih, D.A. y Brunet, A. 2008

En mamíferos, la familia FoxO está formada por cuatro isoformas: FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6. Tres de los miembros de esta familia, FoxO1, FoxO3, FoxO4, están estrechamente regulados mediante fosforilación por Akt, en tres residuos específicos en respuesta a factores de crecimiento y a la estimulación de la insulina. La fosforilación de FoxO por parte de Akt promueve su transporte del núcleo al citoplasma inhibiendo así su función como factor de transcripción (Brunet, A. y col 1999; Kops, G.J. y col 1999; Brunet, A. y col 2001).

FoxO presenta una posición común de señalización en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y estrés oxidativo. La insulina y los factores de crecimiento inhiben FoxO a través de PI3K/Akt, aunque otras vías pueden regular la actividad de FoxO de manera directa, como JNK (del inglés, *jun-N-terminal kinase*)

activada por estrés, MST1 (del inglés, *mammalian ortholog of the Ste20-like protein kinase*) y la desacetilasa sirtuína 1 (Sirt1). FoxO integra estas señales divergentes mediante modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación y mono/poli-ubiquitinación, dando lugar a una alterada localización subcelular, estabilidad de la proteína, propiedades de unión a ADN y actividad transcripcional. La transcripción dependiente de FoxO juega un papel importante en una gran variedad de funciones celulares como el metabolismo de la glucosa, la parada de ciclo celular, diferenciación, detoxificación de ROS, reparación de daño a DNA y apoptosis (Salih, D.A. y Brunet, A. 2008) (Figura 12).

2.4. PROTEÍNA RAS

Las proteínas Ras están englobadas en la superfamilia de las proteínas G monoméricas pequeñas, que a su vez está compuesta por las subfamilias Rho, Ran, Rab, Rac, Rheb, Arf y Kir/Rem/Ras. La subfamilia p21^{Ras} está compuesta por tres miembros estrechamente relacionados con un peso molecular de 21KDa: H-Ras, K-Ras y N-Ras (Takai, Y. y col 2001). Entre las funciones de las proteínas Ras estaría el control del crecimiento y proliferación celular así como otros aspectos de la biología celular como la senescencia o parada en ciclo celular, diferenciación y supervivencia (Martínez Salgado, C. y col 2008).

Las proteínas Ras presentan dos estados conformacionales, uno de ellos unido a guanosin difosfato (GDP), que representa el estado inactivo y otro unido a guanosin trifosfato (GTP), que sería la forma activa. La actividad de Ras está regulada por GEFs (del inglés, *guanine nucleotide exchange factors*) y GAPs (del inglés, *GTPase-activating proteins*) cuya activación está inducida por una gran variedad de señales extracelulares, siendo notable la activación por parte de receptores tirosina quinasa. Los residuos de tirosina fosforilados sirven de lugares de reconocimiento para proteínas adaptadoras como Grb2 y el complejo Shc/Grb2, que reclutan a SOS, el más caracterizado GEF de Ras. Éste activa a Ras, que está anclado en la membrana plasmática, intercambiado el dominio GDP por uno de GTP (Takai, Y. y col 2001). Tras la unión del dominio GTP a Ras se activan diferentes moléculas de señalización celular (Martínez Salgado, C. y col 2008). Por otro lado, para que Ras se ancle en la membrana y pueda ejercer su función, son necesarias diferentes modificaciones post-traduccionales. Una modificación lipídica indispensable para el anclaje de Ras en la

membrana plasmática es la incorporación de un grupo prenil, farnesil o geranilgeranil en el extremo C-terminal. (Hancock, J. F. 2003).

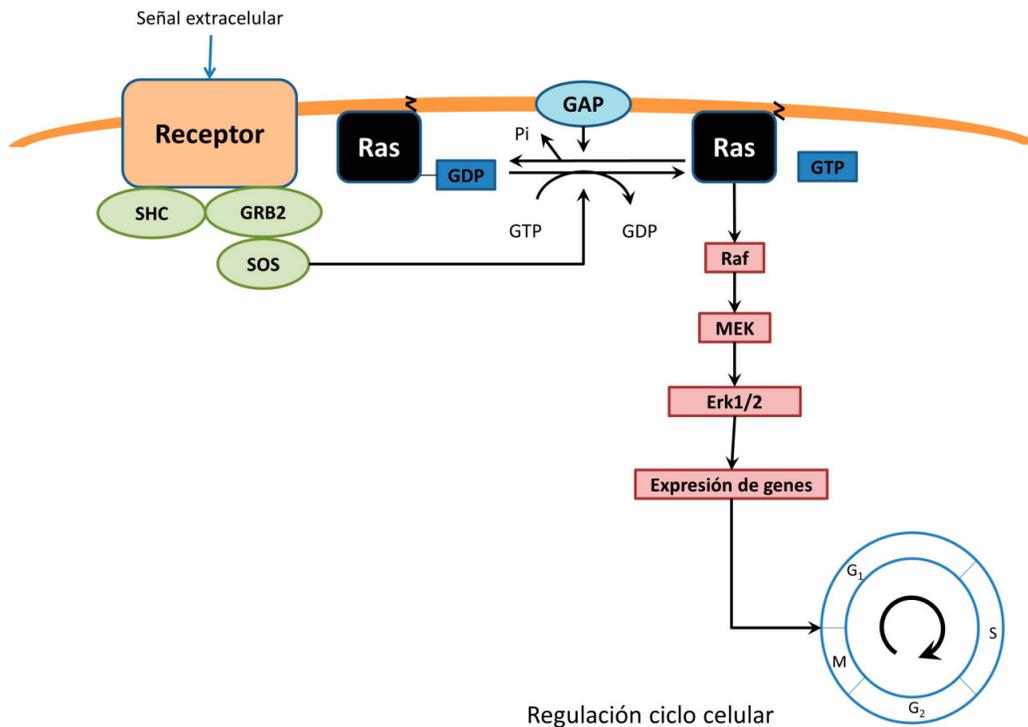


Figura 13. Mecanismo de acción de las proteínas Ras en la expresión génica. Fuente: Takai, Y. y col 2001.

Ras activo (Ras-GTP) se une a la familia Raf de serina/treonina quinasas citoplasmáticas, que la recluta y la activa. Esto se produce gracias a que Raf presenta un dominio de unión a Ras (RBD; del inglés *Ras-binding domain*) mediante el cual Ras-GTP se une directamente para activarlo. Raf activo fosforila a la MAPK intermedia MEK1 y MEK2, que a su vez fosforilan a Erk1 y Erk2 respectivamente. Erk1/2 fosforilado se dimeriza y se transloca al núcleo, estimulando la actividad de diferentes proteínas a través de fosforilación directa (Martínez Salgado, C. y col 2008) (Figura 13).

Cuando Ras está constitutivamente activo puede actuar como un oncogen. Se ha descrito su presencia en un 30% de los tumores humanos. Sin embargo, la expresión de Ras oncogénico en cultivo primario induce una parada de crecimiento irreversible conocida como senescencia inducida por oncogenes, a través de la activación de p53 y p16^{INK4a} (Serrano, M. y col 1997). Los mecanismos moleculares por los que Ras oncogénico puede inducir senescencia en cultivos primarios no están

aún bien definidos. Diversos estudios han indicado que la inducción de senescencia por parte de Ras podría ser a través de las vías Raf/Mek/Erk1/2 y la MAPK p38, acompañado por el aumento en la actividad de p14^{INK4a}, p53, p14/p19^{ARF} y/o p21 y silenciando los genes diana del factor de transcripción E2F (DeNicola, G.M. y Tuveson, D.A. 2009). Uno de los posibles mecanismos a través del cual Ras puede inducir senescencia es mediante la activación de respuesta celular de daño al ADN (DDR) puesto que se ha visto que la inactivación de DDR puede bloquear la senescencia inducida por Ras (Di Micco, R. y col 2006). Por otro lado, se ha reportado que la senescencia inducida por Ras puede ser dependiente de la producción de ROS como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Lee, A.C. y col 1999).

2.5. RESTRICCIÓN CALÓRICA

Diversos estudios han demostrado que la restricción calórica presenta efectos anti-envejecimiento, pudiendo retrasar la senescencia celular y atenuar el declive fisiológico en la función orgánica. Se conoce que un alto contenido calórico induce acortamiento de la esperanza de vida y acelera enfermedades relacionadas con el envejecimiento como la diabetes, el síndrome metabólico, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Éste efecto es mediado por las vías celulares sensibles a nutrientes insulina/IGF-1, sirtuínas, TOR y AMP que se regulan coordinadamente entre sí, así como una gran variedad de vías de respuesta a estrés (Kenyon, C.J., 2010; Haigi, M.C. y Yankner, B.A. 2010). A continuación se resumen las principales funciones de las vías celulares sensibles a nutrientes.

Las sirtuínas forman parte de una familia de proteínas altamente conservada que conecta el estado metabólico con la regulación del envejecimiento (Haigis, M.C. y Sinclair, D.A. 2010). Las sirtuínas poseen actividad desacetilasa NAD-dependiente y/o ADP-ribosiltransferasa. Diversos estudios han sugerido que la sobreexpresión de sirtuínas puede aumentar la esperanza de vida (Kenyon, J.C., 2005). En mamíferos se han descrito siete sirtuínas (Sirt1-7) que juegan diversas funciones de la regulación en la resistencia al estrés, metabolismo y supervivencia celular. La sirtuína mejor estudiada es Sirt1. Su actividad está regulada por el estatus nutricional celular induciendo vías de respuesta a estrés y cambios en el metabolismo energético. Su función se ha visto aumentada en periodos de restricción nutricional como el ayuno y la restricción calórica. Cuando está activa, Sirt1 es capaz de desacetilar diferentes

sustratos proteicos que están involucrados en el envejecimiento, respuesta a estrés y regulación metabólica, como PGC-1 α , Ku70, NF- κ B, AceCS1, MEF2 y p53. Además Sirt1 es capaz de desacetilar y activar a FoxO (Haigis, M.C. y Sinclair, D.A. 2010).

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK; del inglés, *AMP-activated protein kinase*) es activada bajo condiciones de alto adenosín monofosfato (AMP) intracelular o bajo adenosín trifosfato (ATP). Algunas situaciones como la privación de glucosa, isquemia, hipoxia o el ejercicio implican una disminución de los niveles de ATP y la consecuente activación de AMPK (Kahn, B.B. y col 2005). La activación de AMPK da lugar a diferentes respuestas transcripcionales y post-traduccionales que incrementan las vías metabólicas catabólicas en respuesta a estrés y a un nivel bajo en energía. Por ejemplo, AMPK es capaz de promover oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación e inhibición de la enzima acetil coenzimaA-carboxilasa (ACC), enzima encargada de la síntesis de malonil CoA a partir de acetil-CoA. La regulación de la actividad de ACC es primordial en la decisión entre procesos anabólicos o catabólicos (Haigi, M.C. y Yankner, B.A. 2010). La disminución de la actividad de AMPK durante el envejecimiento podría contribuir a la resistencia a la insulina y al síndrome metabólico. Estas observaciones sugieren que AMPK es una potencial diana terapéutica para desórdenes metabólicos relacionados con la edad (McCarty, M.F. 2004).

La vía de TOR es un conservado sensor de nutrientes que está relacionado con la regulación de la esperanza de vida. TOR está regulado por factores de crecimiento y nutrientes, controlando así el crecimiento, metabolismo y división celular en eucariotas. La actividad de TOR está inhibida en condiciones de limitación de nutrientes y se ha visto inhibida su señalización en modelos animales de longevidad. Asimismo, la inhibición de TOR aumenta la esperanza de vida en varios modelos animales y puede aumentarla cuando TOR es inhibido durante un periodo limitado de tiempo de la vida del ratón adulto (Harrison, D.E. y col 2009). La señalización de TOR relaciona el metabolismo, la respuesta a estrés y el envejecimiento, y puede ser potencialmente importante en la patogénesis y el tratamiento de desórdenes metabólicos relacionados con el envejecimiento (Haigi, M.C. y Yankner, B.A. 2010).

2.6. ESTRÉS OXIDATIVO

Todos los sistemas biológicos que funcionan en condiciones aeróbicas están expuestos a sustancias oxidantes, bien generados intencionadamente o como subproductos de la respiración y el metabolismo celular. Entre los diferentes oxidantes que se pueden generar, se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS; del inglés, *radical nitrogen species*). El incremento en oxidantes puede producirse bien por un aumento en la producción de los mismos y/o la inadecuada respuesta de los procesos antioxidantes. Cuando el balance oxidación/antioxidación está a favor de los oxidantes se habla de estrés oxidativo (Bashan, N. y col 2009).

Existen diferentes fuentes de ROS en la célula. Una de las más importantes es la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Ésta, es la fuente tanto de adenosin 5'-trifosfato (ATP) como de ROS. En particular, la mitocondria es la principal fuente de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La tasa de producción de ROS en la mitocondria es altamente dependiente de la presión parcial de oxígeno de tal modo que un incremento en la presión parcial de oxígeno daría lugar a rápido incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 14).

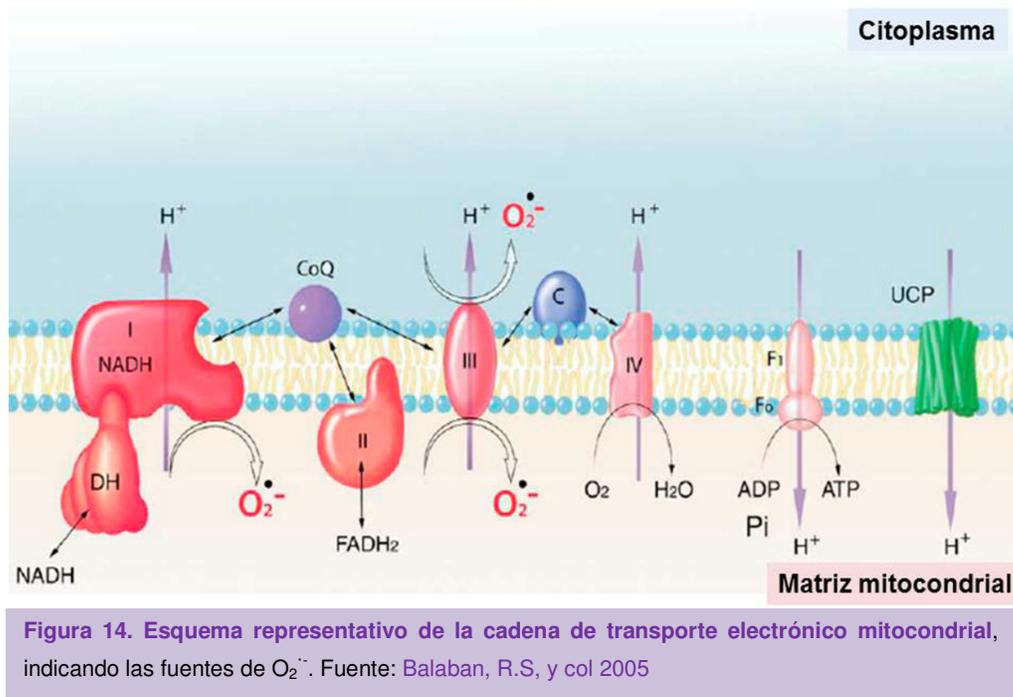


Figura 14. Esquema representativo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, indicando las fuentes de $O_2^{\cdot-}$. Fuente: Balaban, R.S. y col 2005

Las reacciones inflamatorias, en particular las crónicas, pueden constituir una fuente de daño oxidativo. Macrófagos activados o neutrófilos pueden incrementar ROS, como H_2O_2 , óxido nítrico ($\cdot NO$), $O_2^{\cdot -}$, hidroxilo ($\cdot OH$) e hipoclorito ($HOCl$), que pueden dañar el ADN de las células cercanas.

También las radiaciones ionizantes pueden provocar daño celular a través de daño directo a ADN, o indirecto a través de la producción de ROS procedente del H_2O (Shackelford R.E. y col 2000).

Por otro lado, la enzima NADPH oxidasa, complejo enzimático unido a la membrana celular, es capaz de transferir electrones a partir de NADPH a $O_2^{\cdot -}$, y otros sistemas de generación de ROS intracelular como los productos de glicosilación avanzada (AGEs) y la enzima Xantina oxidasa, que cataliza el paso final de la degradación de nucleótidos (Bashan, N. y col 2009).

2.6.1. Especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno: Las principales están reflejadas en la figura 15. Entre ellas, cabe destacar en primer lugar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste es producido en diversas reacciones intracelulares, particularmente por la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Presenta un papel importante en el metabolismo y es requerido por numerosos procesos celulares. Por sí mismo, el H_2O_2 no reacciona con el ADN, pero sí lo hace a través de la producción de $\cdot OH$ mediante eventos como la reacción de Fenton. El anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) es considerablemente menos reactivo que $\cdot OH$ pero es capaz también de generar daño en el ADN. El óxido nítrico ($\cdot NO$) es producido de forma constitutiva en células endoteliales vasculares, en algunos tipos de neuronas y en macrófagos activados y actúa como mediador pro-inflamatorio. $\cdot NO$ puede producir daño en el ADN mediante la reacción con $O_2^{\cdot -}$ que da lugar a la producción del radical peroxinitrilo ($OONO^{\cdot}$) que presenta una reactividad similar al $\cdot OH$ (Shackelford, R.E. y col 2000).

2.6.2. Sistemas antioxidantes: Como se ha descrito, son las sustancias endógenas o exógenas que detoxifican los oxidantes. Una de las fuentes de antioxidantes se encuentra en la dieta. En mamíferos, el consumo en la dieta de vitamina C hidrosoluble y vitamina E liposoluble contribuye al sistema antioxidante.

Entre los antioxidantes endógenos, la célula contiene glutatión (GSH) que es un tripéptido que actúa junto con la acción de enzimas en diversos procesos de oxidación-reducción. GSH participa en la detoxificación de peróxidos y en el

mantenimiento de grupos sulfhidrilo de proteínas (SH). Tras su participación en reacciones redox, GSH es regenerado por la enzima glutation reductasa utilizando NADPH como cofactor. Por otro lado, las tioredoxinas y glutaredoxinas tienen como función principal la preservación en estado reducido de grupos SH de proteínas. También actúan como detoxificadores de H₂O₂.

Finalmente, las enzimas antioxidantes son aquellas que actúan directamente con los oxidantes, transformándolos en moléculas no oxidantes (Como la catalasa) o menos oxidantes (como la superóxido dismutasa (SOD)) (Bashan N. y col 2009) (Figura 15).

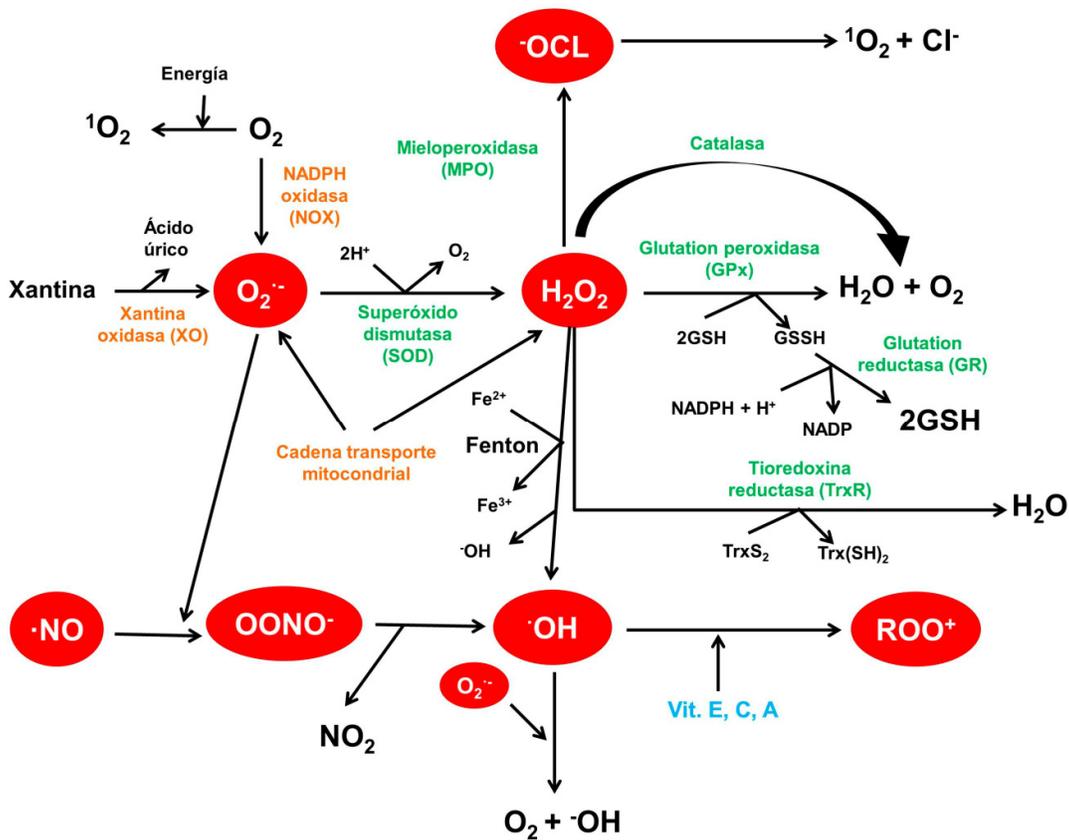


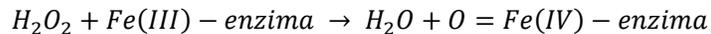
Figura 15. Esquema representativo de la formación de ROS y los mecanismos antioxidantes. En rojo se representan los radicales libres, en naranja los sistemas productores de ROS, en verde las enzimas antioxidantes y en azul las moléculas antioxidantes. Fuente: Oliveira, B.F. y col 2010

2.6.3. Catalasa y envejecimiento

La catalasa es una enzima que se describió por primera vez en el año 1900 y es la responsable de la conversión de H₂O₂ a O₂ y H₂O (Loew, O. 1900). Se trata de

un homotetrámero, cuyas subunidades presentan un peso molecular de unos 60 kDa y contienen un grupo hemo, ferroprotoporfirina IX, situado en su centro activo.

La catalasa transforma el H₂O₂ mediante dos reacciones



El principal papel de la enzima catalasa es el control de la concentración celular de H₂O₂ y otros derivados citotóxicos del oxígeno. Presenta una estructura tetramérica muy estable y rígida que la hace resistente al pH, la desnaturalización térmica y la proteólisis.

La catalasa protege a la hemoglobina mediante el aclaramiento del peróxido de hidrógeno generado en los glóbulos rojos humanos que están expuestos a altas concentraciones de oxígeno. Es un factor importante en la inflamación, mutagénesis, prevención frente a la apoptosis y estimulación de un amplio espectro de tumores. Por tanto, el papel de la catalasa en la defensa antioxidante es dependiente del tejido y del tipo de daño oxidativo.

La administración exógena de catalasa es utilizada para atenuar la apoptosis así como la toxicidad de algunos fármacos antitumorales. La catalasa protege a las células β del páncreas del daño por H₂O₂ sugiriendo que la deficiencia en catalasa y el daño oxidativo puede contribuir al desarrollo de diabetes. Se ha visto una disminución en la actividad catalasa en enfermos de esquizofrenia y en la arterioesclerosis. La catalasa también juega un papel importante en la supervivencia de los espermatozoides en el tracto femenino. La pérdida de catalasa da lugar a una enfermedad genética humana denominada *acatalasemia* o *enfermedad de Takahara* (Goyal, M.M. y Basak, A. 2010).

La relación entre los niveles de catalasa y la senescencia se han puesto de manifiesto en ratones que sobreexpresan catalasa en la mitocondria, que presentan un aumento de un 20% en la esperanza de vida (Schriner, S.E y col 2005).

3. ENVEJECIMIENTO RENAL Y SENESCENCIA CELULAR EN LA DIABETES

El riñón viejo se caracteriza por cambios histológicos como la glomeruloesclerosis, la atrofia tubular, la fibrosis intersticial y la fibrosis de la íntima arterial, que van a condicionar una pérdida progresiva de la función renal. Sin embargo, diversas patologías relacionadas con la edad como la hipertensión y la diabetes, pueden acelerar el proceso natural de envejecimiento renal. La pérdida de la autorregulación de las arteriolas aferentes y eferentes del glomérulo, puede incrementar el flujo plasmático glomerular, incrementando la presión intracapilar y la consecuente hiperperfusión, así como a la acumulación de matriz extracelular en el mesangio. Se ha descrito que las adaptaciones vasculares originadas por la pérdida de funcionalidad de nefronas, característica de la edad, debería ayudar a preservar la tasa de filtración glomerular produciendo hiperperfusión e hiperfiltración en las nefronas funcionales. Esta hipertensión glomerular local e hipertrofia podrían dar lugar a la expansión de la matriz mesangial y a la glomerulosclerosis.

Las bases moleculares del fenómeno del envejecimiento renal se encuentran aún bajo estudio. Entre ellos se podría encontrar la senescencia celular que incluye inestabilidad genómica, pérdida de telómeros, daño oxidativo, programación genética y muerte celular. La senescencia celular podría jugar un papel importante en el deterioro de la función renal presente en el envejecimiento, ya que el riñón envejecido presenta SA- β -gal y expresión de p16^{INK4a}, aún antes de aparecer cambios morfológicos, sugiriendo que algunos aspectos de la senescencia celular son comunes con el envejecimiento renal. (Zhou, X.J. y col 2008; Yang, H. y Fogo, A.B. 2010).

3.1. LA ENFERMEDAD RENAL EN LA DIABETES

La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones microvasculares de la diabetes. Las lesiones renales aparecen tanto en pacientes con diabetes tipo 1 (insulino-dependiente) como tipo 2 (no insulino-dependiente). Diversos tipos celulares están involucrados en el daño renal, como los podocitos, células mesangiales y endoteliales glomerulares, el epitelio tubular y los fibroblastos intersticiales y el endotelio vascular. Los cambios fisiológicos en la nefropatía

diabética incluyen hiperfiltración y microalbuminuria seguido del deterioro de las funciones renales asociado con degeneración de los compartimentos glomerular y túbulo-intersticial. Esto incluye hiperplasia/hipertrofia de diversos tipos celulares del glomérulo y los túbulos (Wolf, G. 2000; Kanwar, Y. S. y col 2008).

Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que las células mesangiales tienen una estrecha relación con la glomerulosclerosis en la nefropatía diabética. La hipertrofia de la célula mesangial, el engrosamiento de la membrana basal y la expansión de la matriz extracelular del mesangio son unas de las principales características patológicas de la nefropatía diabética. Las concentraciones altas de glucosa, angiotensina II, productos de Amadori y productos de glicosilación avanzada, endotelina, fuerzas hemodinámicas y mecánicas, alteraciones en los transportadores de glucosa, exceso de ácidos grasos, lipoproteínas de baja densidad oxidadas son algunos de los muchos factores que, en la diabetes, pueden dar lugar a respuestas patológicas en células mesangiales. El exceso en la acumulación de proteínas de matriz y algunos factores de crecimiento y citoquinas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento de tejido conectivo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés; *epidermal growth factor*), heparina unida a EGF y el IGF-1 producen un efecto directo sobre la célula mesangial y pueden mediar los efectos de muchos de los metabolitos anteriormente comentados (Abboud, H. E. 2012).

A continuación, se describen brevemente dos fenómenos muy comunes en pacientes diabéticos: los cambios en la osmolaridad plasmática que puede generar la hiperglucemia y los productos de glicosilación avanzada.

3.2. OSMOLARIDAD

La concentración de agua en una solución depende del número de partículas de soluto en dicha solución. El número total de partículas en una solución, se mide en *osmoles*, de tal modo que un osmol (osm) es igual a 1 mol ($6,02 \times 10^{23}$) de partículas de soluto. Cuando una molécula se disocia en dos iones, como el cloruro sódico que se ioniza en iones cloro y sodio, una solución que contenga 1 mol/l tendrá una concentración osmolar de 2 osm/l.

La concentración osmolar de una solución se denomina *osmolalidad* cuando la concentración se expresa en *osmoles por kilogramo de agua*; se llama *osmolaridad* cuando se expresa en *osmoles por litro de solución*

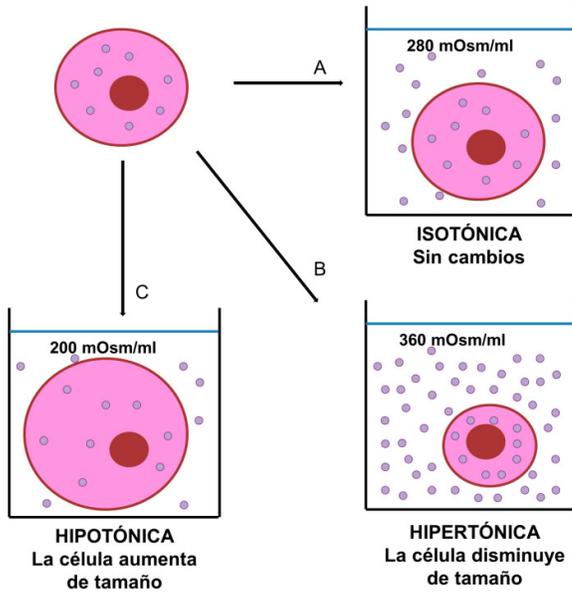


Tabla 16. Efecto de las soluciones isotónicas (A), hipertónicas (B) e hipotónicas (C) sobre el volumen celular.

Debido a que las membranas celulares son relativamente impermeables a la mayoría de los solutos pero muy permeables al agua, cuando existe una mayor concentración de soluto a un lado de la membrana celular, el agua difundirá por ósmosis a través de la membrana hacia la región de mayor concentración de soluto.

El paso de moléculas de agua a través de una membrana con una permeabilidad selectiva puede entorpecerse aplicando presión en la dirección opuesta a la de la ósmosis. La cantidad precisa de presión

necesaria para impedir la ósmosis se llama *presión osmótica*. De tal modo que la presión osmótica es la medida indirecta de las concentraciones de agua y solutos de una solución. Cuanto mayor es la presión osmótica de una solución, menor es la concentración de agua y mayor la concentración de soluto en la solución. La presión osmótica de una solución es directamente proporcional a la concentración de partículas con actividad osmótica en esa solución.

Cuando una solución presenta una osmolaridad igual a la del espacio intracelular se denomina *isosmótica*. Si esta solución presenta una osmolaridad mayor o inferior se denomina *hiperosmótica* e *hipoosmótica*, respectivamente.

Si una célula se coloca en una solución isosmótica constituida por solutos no difusibles, las células no sufrirán cambios en su volumen celular. Se dice que este tipo de solución es *isotónica* porque la célula no experimenta variaciones de volumen. Si se coloca una célula en una solución *hipotónica* que tiene una menor concentración de solutos no difusibles (menos de 282 mOsm/l), el agua difundirá al interior de la célula

aumentando su volumen; diluyendo el líquido intracelular mientras concentra el líquido extracelular hasta que ambas soluciones tengan la misma osmolaridad. Si se coloca la célula en una solución *hipertónica* con una concentración mayor de solutos no difusibles, el agua saldrá de la célula hacia el líquido extracelular concentrando el líquido intracelular y diluyendo el líquido extracelular (Figura 16).

Algunos solutos pueden atravesar la membrana celular sin problemas, no siendo necesaria la entrada o salida de agua de la célula. Las sustancias que atraviesan fácilmente las membranas, como la urea, pueden causar desplazamientos transitorios del volumen líquido entre los líquidos intracelular y extracelular, pero con suficiente tiempo, las concentraciones de estas sustancias se igualarán en los dos compartimentos y ejercerán un escaso efecto sobre el volumen intracelular en condiciones normales. De este modo una solución hiperosmótica de urea no será hipertónica pero una solución hiperosmótica de cloruro sódico sí lo será, puesto que su permeabilidad celular es más baja.

3.2.1. Regulación de la osmolaridad sanguínea

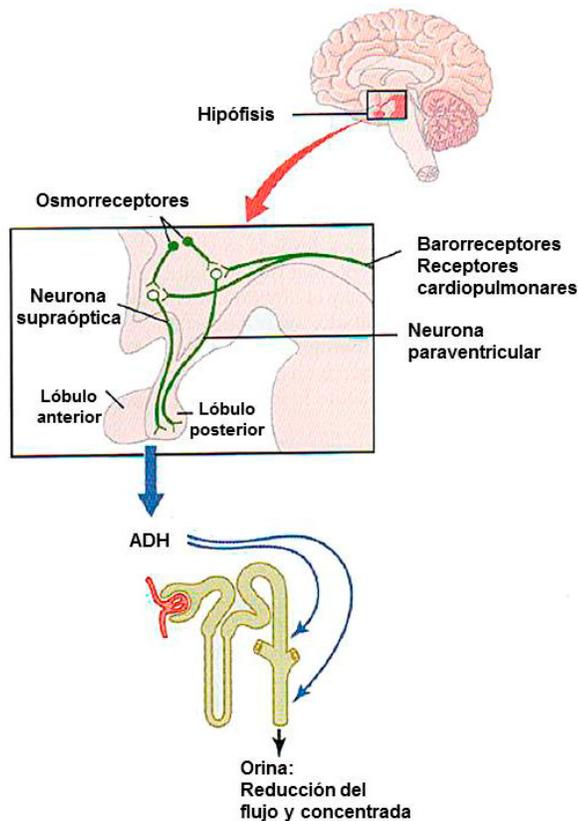


Figura 17. Esquema regulación osmolaridad sanguínea.

La osmolalidad del plasma sanguíneo se mantiene normalmente entre límites muy estrechos mediante diversos mecanismos reguladores. El aumento de la osmolalidad sanguínea y de la presión osmótica estimulan los *osmorreceptores*, que se sitúan en el hipotálamo.

Como resultado del aumento de la estimulación de los osmorreceptores, la persona experimenta sed, y si dispone de agua, bebe. Junto con este aumento del aporte de agua, una persona deshidratada excreta un volumen de orina menor. Esto ocurre debido a la

secuencia de sucesos siguiente: El aumento de la osmolaridad plasmática estimula los osmorreceptores del hipotálamo del cerebro; éstos a su vez un haz de axones que termina en la neurohipófisis; lo que hace que la neurohipófisis secrete a la sangre la hormona antidiurética (ADH). La ADH actúa sobre los riñones para promover la retención de agua, de forma que se excreta un volumen menor de orina más concentrada (Figura 17).

3.2.2. Mecanismos de respuesta celular a hiperosmolaridad e hipertonicidad

Los mecanismos de respuesta celular a hiperosmolaridad e hipertonicidad han sido bien estudiados en células tubulares de riñón. Estas células se someten de manera natural a estrés osmótico, llegando a soportar osmolalidades muy superiores a la osmolalidad fisiológica (280-300 mOsm/kg). A continuación se explican los mecanismos de respuesta celular a estrés osmótico en células tubulares renales a altas osmolalidades. Los mecanismos de respuesta a osmolalidades menores y en otros tipos celulares que toleran menos el estrés osmótico no son bien conocidos.

La mayor parte de las células en mamíferos pueden sobrevivir a un moderado ambiente de hipertonicidad a través de un mecanismo de adaptación específico que resulta en la acumulación de *osmolitos compatibles*. Este proceso de adaptación, comienza con una respuesta temprana, que ocurre entre unos mili-segundos a minutos, y otra respuesta tardía que requiere horas o días. La virtual e instantánea reducción del volumen celular debido a la salida de agua de la célula por ósmosis, es rápidamente corregida mediante un mecanismo regulador del incremento de volumen (RVI; del inglés, *regulatory volumen increase*). Esta respuesta temprana está mediada por la existencia de sistemas de transporte de iones, incluyendo el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC), el intercambiador Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. La activación de estos canales induce un aumento de las concentraciones intracelulares de potasio, sodio y cloro, junto con la entrada de agua al interior de la célula, provocando el RVI. La fase tardía está caracterizada por la síntesis y la acumulación intracelular de osmolitos compatibles. La explicación a este fenómeno es la necesidad de intercambiar el acúmulo de iones inorgánicos con pequeñas moléculas orgánicas que no afecten la función celular (Alfieri, R.R, y Petronini, P.G. 2007) (Figura 18).

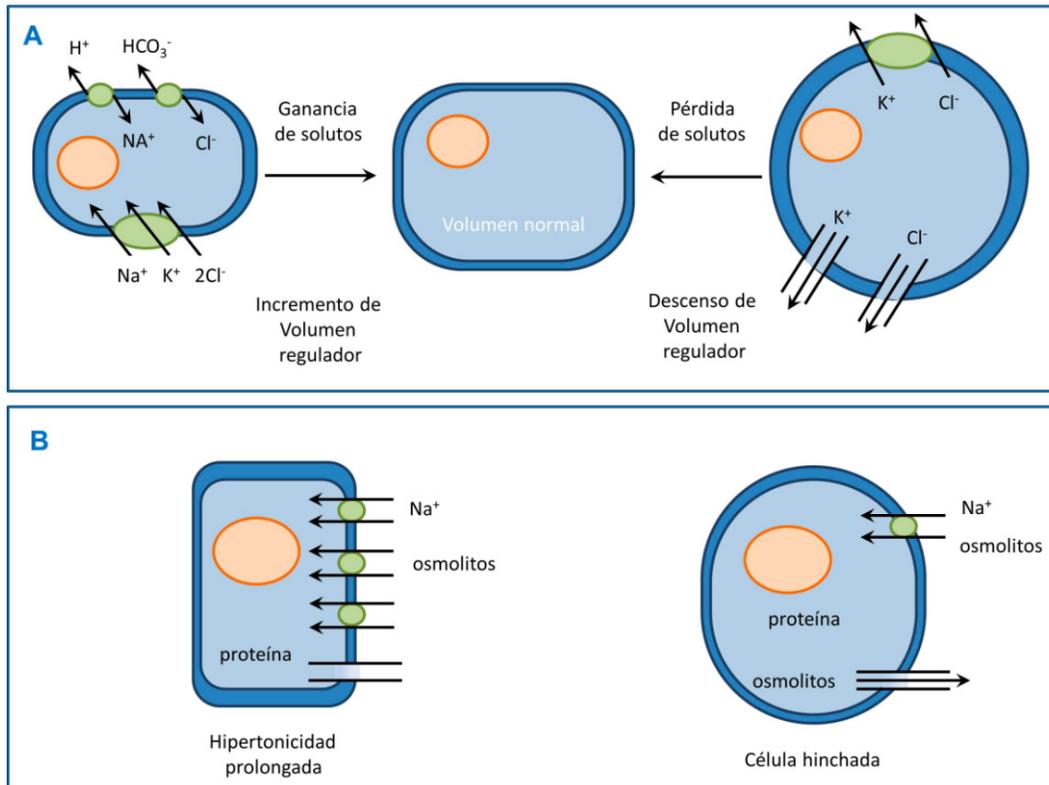


Figura 18. Mecanismos de regulación del volumen celular. En el cuadro superior, se representa la respuesta temprana a estrés osmótico que implica la entrada o salida de solutos de naturaleza iónica. En el cuadro inferior, se muestra la respuesta tardía a hipertonicidad donde hay una entrada de osmolitos compatibles y proteínas debido a una mayor expresión de transportadores. Fuente: McManus, M.L. y col 1995

Los principales osmolitos orgánicos compatibles en mámiíferos son el sorbitol, la betaína, el myo-inositol, taurina y glicerofosfocolina (GPC; del inglés *glycerophosphocholine*). Algunos de estos osmolitos son captados del espacio extracelular mediante la expresión de su correspondiente transportador de membrana, como el myo-inositol, la betaína y la taurina. Frente a una situación de hipertonicidad, la célula aumenta la expresión de estos transportadores a través de la actuación del factor de transcripción TonEBP/OREBP o NFAT-5 (Burg, M.B. y col 2007).

Otros osmolitos son sintetizados en el interior de la célula, como el sorbitol y el GPC. La expresión de las enzimas encargadas de su síntesis también están reguladas por el factor de transcripción TonEBP/OREBP.

El sorbitol es un polialcohol que es sintetizado a partir de glucosa, a través de una reacción catalizada por la enzima *aldosa reductasa* (AR), y es metabolizado a

fructosa, por la *sorbitol deshidrogenasa*. Ante una situación de hipertonicidad, se ha visto un incremento en la expresión de la enzima AR y un descenso en la sorbitol deshidrogenasa, dando lugar a la acumulación de sorbitol intracelular. La activación de AR no siempre tiene una acción protectora. En diabetes su actividad es alta y está implicada en algunas de las complicaciones asociadas a esta enfermedad. Se ha visto que inhibidores de la AR reducen dichas complicaciones. La transformación de glucosa a sorbitol da lugar a la oxidación de NADPH a NADP⁺, favoreciendo el estrés oxidativo por la actividad NADPH oxidasa (Rosas-Rodríguez, J.A. y Valenzuela-Soto, E.M. 2010).

Los mecanismos que inducen la acumulación de osmolitos compatibles en el interior de la célula están regulados por un factor de transcripción común, TonEBP/OREBP o NFAT5. Se trata de un miembro de activadores transcripcionales de la familia Rel. Todos los genes diana de TonEBP/OREBP presentan un motivo de ADN denominado elemento de respuesta osmótica (ORE; del inglés *osmotic response element*) o elevador de la respuesta a tonicidad (TonE; del inglés, *tonicity-responsive enhancer*) (Burg, M.B. y col 2007). Además de los genes que regulan la entrada de osmolitos compatibles a la célula, TonEBP/OREBP también regula la expresión de la proteína HSP70 (del inglés; *heat shock protein 70*), UT-A1 (del inglés; *vasopressin-activated urea transporters*) y la aquoporina-2 (AQP2) (Nakayama, Y. y col 2000; Woo, S.K. y col 2002; Hasler, U. y col 2006),

En mamíferos la respuesta adaptativa a estrés osmótico incluye diferentes vías celulares. La vía de la MAPK p38 es un componente importante pero también se ha visto la implicación de Erk1/2, JNK, PKC, PKA y ATM (Sheikh-Hamad, D. y Gustin, M.C. 2004).

Los efectos celulares de la hiperosmolaridad descritos en células tubulares renales a altas osmolalidades se pueden resumir en:

- **Parada de ciclo celular:** Una elevación aguda tanto de NaCl como de Urea inducen una parada rápida en cualquiera de las fases del ciclo celular. La duración de la parada de ciclo depende de la cantidad de NaCl o urea a la que estén sometidas las células. Una vez que la parada termina, las células están lo suficientemente adaptadas y pueden proliferar durante algunos pases bajo la elevada osmolaridad. El ratio de proliferación celular depende directamente de la osmolaridad en células tubulares (Michea, L. y col 2000).

- **Apoptosis:** La muerte celular sucede cuando la hipertonicidad aguda excede ciertos niveles. La exposición aguda de células tubulares a niveles muy elevados de osmolalidad (700 mosm/Kg) induce una rápida despolarización de la membrana mitocondrial desencadenando apoptosis (Bortner, C.D y Cidlowski, J.A. 1996; Michea, L. y col 2000; Galvez, A. y col 2001).
- **Daño en el ADN.** La elevación aguda de osmolaridad de 300 a 500-600 mOsm/KgH₂O añadiendo NaCl induce ruptura de ADN en células tubulares acompañada por parada de ciclo celular. Sin embargo, las altas concentraciones de urea promueven ruptura de ADN cuando las células se exponen de manera tanto aguda como crónica. (Dmitrieva, N.I. 2004; Kultz, D. 2001).
- **Estrés oxidativo:** El incremento en NaCl o urea induce estrés oxidativo mediante el incremento de ROS. Sin embargo a pesar del efecto dañino de los ROS sobre las estructuras celulares, diversos estudios apuntan a que los ROS tienen un papel importante en la respuesta osmoprotectora celular. Los antioxidantes que reducen superóxido suprimen tanto el aumento en la actividad transcripcional de TonEBP/OREBP como la expresión de BGT1 (Zhou, X. y col 2005; Zhou, X. y col 2006). El antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) previene el incremento del ARNm y la proteína del factor de respuesta a estrés oxidativo Gadd153/CHOP y la fosforilación de Erk1/2 y p38 inducida por altas concentraciones de NaCl, así como el incremento en la expresión de la proteína COX-2 (Zhang, Z. y col 1999; Yang, T. y col 2005).
- **Inhibición de la transcripción y la traducción:** Las altas concentraciones de NaCl inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas en cultivo celular (Burg, M.B. y col 2007).

3.2.3. Estrés osmótico y diabetes

Las altas concentraciones de glucosa sanguínea dan lugar a una mayor permeabilidad celular por la misma, incrementando la síntesis de sorbitol. La acumulación de sorbitol en el citoplasma de diversos tipos celulares se ha visto directamente asociado con diversas complicaciones asociadas a la diabetes (McManus, M.L. y col 1995).

Al igual que las altas concentraciones de NaCl, la glucosa es capaz de aumentar la captación de *myo*-inositol. Además, se ha observado una disminución de los niveles intracelulares de *myo*-inositol en diversos tejidos durante la diabetes

y parece ser un factor importante en la patogénesis de las complicaciones de esta enfermedad. Hay estudios que sugieren que esto es debido a que la glucosa y el *myo-inositol* presentan una estructura estereoquímica muy similar y la glucosa puede competir con la captación de *myo-inositol* por parte de la célula aunque también se ha visto que existe un aumento en la actividad de la enzima *myo-inositol* oxidasa, encargada de la degradación del *myo-inositol*. Por otro lado, se ha visto que el transportador de *myo-inositol* aumenta en las células glomerulares en presencia de alta glucosa. Éste efecto se piensa que puede ser debido en parte a un efecto de hiperosmolaridad (Burg, M. B y col 1988; Miyai, A y col 1995; Arner, R. J. 2006).

3.3. LOS PRODUCTOS DE GLICOSILACIÓN AVANZADA

Los productos de glicosilación avanzada (AGEs; del inglés, *advanced glycation end products*) son un grupo heterogéneo de macromoléculas formadas por la modificación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mediante una reacción no enzimática de glicosilación y oxidación tras el contacto con azúcares de tipo aldosa. Este proceso fue descrito en el año 1912 por Maillard cuando observó que el calentamiento de aminoácidos en presencia de alta glucosa desarrolla un característico color amarillo-marrón (Singh, R. y col, 2001).

El ser humano está expuesto a dos fuentes de AGEs: una exógena mediante la ingesta de alimentos y otra endógena que se forma en el organismo (Semba, R.D. y col, 2010), mayoritariamente en un ambiente de hiperglucemia y durante el envejecimiento, contribuyendo al desarrollo de diferentes patologías relacionadas con la edad y la diabetes (Goldin, A, y col 2006).

Los factores cruciales para la formación de AGEs incluyen el intercambio de proteínas para glicoxidación, el grado de hiperglucemia y el estrés oxidativo. Si una o varias de estas condiciones se dan, tanto las proteínas intracelulares como las extracelulares son susceptibles a glicosilación y oxidación (Figura 19).

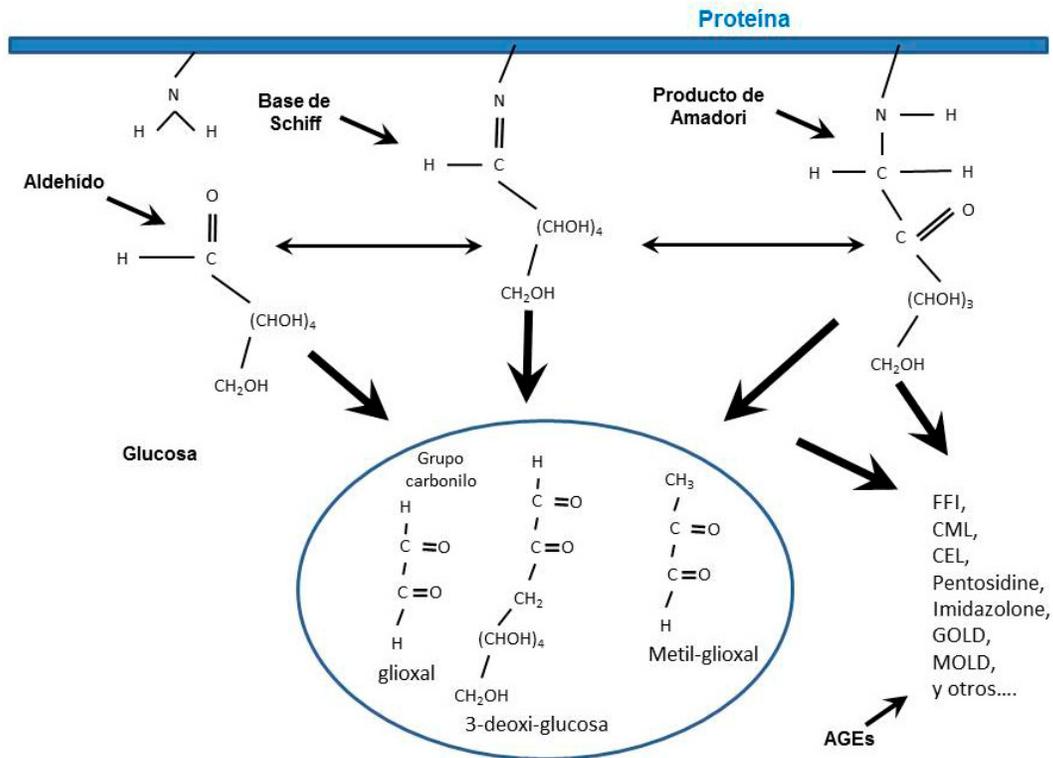


Figura 19. Posibles vías de formación de AGEs. La interacción inicial entre los grupos aldehído de azúcares altamente reactivos, como la glucosa con grupos amino libres de proteína dan lugar a la base de Schiff, que de forma espontánea reacciona consigo misma generando un producto de Amadori. Estas reacciones dan lugar a la formación de grupos carbonilos altamente reactivos como el 3-deoxy-glucosona, glioxal o metil-glioxal. Éstos, tienen la habilidad de reaccionar con grupos amino, sulfidrilo y guanidina funcionales en proteínas así como con lisinas o argininas funcionales dando lugar a AGEs estables, como las N-(carboxymetil)lisina (CML). (Basta, G. y col 2004; Goldin, B.A. y col 2006)

3.3.1. El receptor de los productos de glicosilación avanzada

Los AGEs mediante la unión a receptores de membrana pueden activar diferentes vías de señalización celular. Entre los receptores identificados están AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, los receptores “aclaradores” ScR-II y CD-36, y el receptor de los productos de glicosilación avanzada (RAGE; del inglés, *receptor of advanced glycation end products*), siendo este último el más caracterizado (Zong, H y col. 2011). El resto de receptores que se unen a AGEs no parecen transducir ningún tipo de señalización intracelular, actuando posiblemente como aclaradores y detoxificadores de AGEs (Goldin A. y col 2006)

RAGE está compuesto por 404 aminoácidos que dan lugar a una proteína de un peso molecular de entre 45 y 55 KDa. La estructura completa de RAGE consta de 5 dominios, uno N-terminal responsable de la señal de transducción, uno tipo V, dos tipo C homólogos a la familia de la inmunoglobulinas, una región transmembrana y una cola corta C-terminal intracelular. El dominio V es la región de unión a ligando (Schmitz AM.y col1992) (Figura 20).

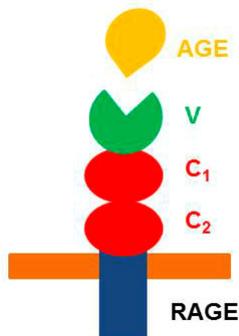


Figura 20. Esquema representativo de la estructura de RAGE.

Fuente: Zong, H. y col 2011.

El gen de RAGE humano está localizado en la región del complejo mayor de histocompatibilidad III del cromosoma 6. Mediante “splicing” alternativo se generan diversas variantes de RAGE, algunas de ellas son isoformas de membrana y otras son isoformas solubles. RAGE soluble (sRAGE) puede generarse mediante ruptura proteolítica de RAGE y actuar como cebador del receptor de membrana mediante unión competitiva al ligando. La desregulación de las diferentes isoformas de RAGE parece tener un impacto importante en algunas enfermedades. Un ejemplo es la expresión anormal de las isoformas solubles sRAGE y esRAGE que se han descrito en diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer, arterioesclerosis, artritis reumatoide, enfermedades vasculares, diabetes tipo 1 y 2 y sus complicaciones (Zong H. y col, 2011).

El promotor de RAGE presenta motivos de unión para el factor nuclear κ B (NF κ B), interferón γ e interleuquina 6 (IL-6). NF κ B controla la expresión celular de RAGE durante la respuesta inflamatoria. RAGE está mínimamente expresado en los tejidos normales pero cuando hay un cúmulo de AGEs se incrementa mediante un mecanismo de retroalimentación positivo (Goldin, A. y col 2006).

3.3.2. Vías de señalización mediadas por el receptor de productos de glicosilación avanzada.

La vía de señalización de RAGE puede ser iniciada por diversos ligandos proinflamatorios como AGEs, S100/calgranulinas, amfoterina y el péptido β -amiloide. La unión de ligando a RAGE incrementa la presencia de especies reactivas de oxígeno, activa a la enzima NADPH oxidasa, aumenta la expresión de

moléculas de adhesión, incrementa el proceso inflamatorio mediado por NFκB y otras vías de señalización. Entre los mediadores inflamatorios aumentados a través de AGE y NFκB, incluye al factor de necrosis tumoral α (TNFα), IL-6 y la proteína C reactiva (Semba, R.D. y col 2010).

Se han visto cuatro vías de señalización mediadas por RAGE en función de los diferentes ligandos, dando lugar a diferentes respuestas celulares.

- Vía janus quinasa (JAK) y el activador de transcripción (STAT).
- MAPK como Erk1/2, p38 y quinasas N-terminales c-Jun (JNK).
- Ras-Rac-Cdc42.
- PI3K-Akt-PKB.

La activación de estas vías va a dar lugar a la activación de diferentes factores de transcripción como NFκB, STAT1/STAT3/STAT5, y la proteína activadora 1 (AP-1; del inglés *activator protein 1*) (Zong H. y col 2011) (Figura 21).

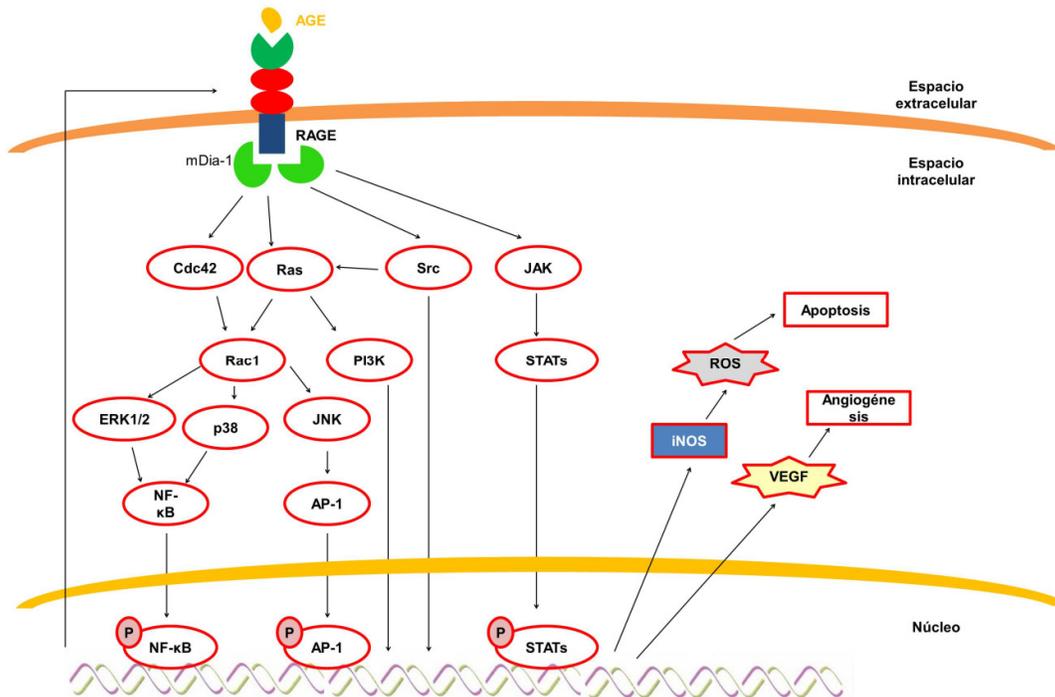


Figura 21. Esquema representativo de algunas de las vías celulares descritas reguladas por RAGE. Fuente: Zong, H. y col 2011.

3.3.3. Los productos de glicosilación avanzada y envejecimiento.

Existen evidencias que soportan la idea de que los AGEs pueden contribuir a la degeneración multisistémica que ocurre durante el envejecimiento. Los AGEs contribuyen a la inflamación y daño en el tejido a través de la interacción con RAGE. La reacción de los AGEs con colágeno u otras proteínas de matriz, incrementa la rigidez de tejidos como las arterias, corazón, hueso y músculo. Estudios histopatológicos han visto que AGE y RAGE están asociados con lesiones de la enfermedad de Alzheimer, degeneración macular relacionada con la edad, arterioesclerosis, glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial en el riñón, osteoporosis y sarcopenia. El efecto dañino de los AGEs sobre diferentes órganos ha sido demostrado a través de modelos animales.

Estudios epidemiológicos han demostrado que los niveles elevados de AGEs están asociados con diferentes patologías relacionadas con la edad. (Tabla 3). Se han realizado estudios clínicos con inhibidores de AGEs que ralentizan el descenso en la función renal y mejora las funciones cardiovasculares (Semba, R.D. y col 2010).

| TEJIDO | EFFECTO DE LOS AGES | ENFERMEDADES ASOCIADAS |
|---------------------------|--|--|
| Cerebro | Deposición de AGE Inflamación | Enfermedad de Alzheimer |
| Ojo | Deposición de AGE Alteración de la membrana de Bruch | Cataratas Degeneración Macular |
| Arterias y corazón | Deposición de AGE, Reacción con colágeno Rigidez arterial Arterioesclerosis Inflamación Rigidez miocardio | Hipertensión Enfermedad coronaria Fallo del corazón Enfermedad de arteria periférica Infarto |
| Glóbulos rojos | Reacciones cruzadas con AGE Disminución en la deformidad celular | Anemia |

| TEJIDO | EFECTO DE LOS AGES | ENFERMEDADES ASOCIADAS |
|----------------------------|--|--|
| Riñón | Deposición de AGE Glomeruloesclerosis Fibrosis intersticial | Enfermedad renal crónica Fallo renal |
| Hueso | Deposición de AGE Reacciones con colágeno Aumento de la rigidez del hueso | Osteoporosis Fracturas |
| Músculos y tendones | Deposición de AGE Reacciones con colágeno Aumento de rigidez muscular Disminución de viscoelasticidad | Sarcopenia Pérdida de la fuerza muscular Bajo rendimiento físico |

Tabla 3. Resumen de los efectos de los AGES sobre diferentes tejidos y sus implicaciones fisiopatológicas. Fuente: Semba, R.D. y col 2010.

Los AGEs son aclarados y metabolizados por el riñón, aunque éste también puede actuar como un lugar de acumulación de AGEs, habiendo sido descrito un daño asociado a la nefropatía diabética.

Los AGEs están marcadamente elevados en el suero y tejidos de pacientes con enfermedad renal avanzada. Éstos pacientes presentan unos niveles dos veces superiores comparado con pacientes diabéticos sin enfermedad renal, y unos niveles de CML séricos cinco veces superiores a pacientes sanos (Semba, R.D. y col 2010).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de senescencia prematura en células mesangiales humanas en la diabetes y el envejecimiento. Específicamente:

- Estudiar los mecanismos implicados en la senescencia celular inducida por altas concentraciones de glucosa y los cambios en la osmolaridad del medio extracelular en células mesangiales humanas y en corteza renal, analizando:
 - Las vías de senescencia implicadas en el proceso La implicación de la producción de ROS en este proceso
 - La importancia de la vía de Ras y MAP quinasa.
 - El efecto del uso de osmolitos compatibles sobre la senescencia celular.
 - La senescencia celular y la función renal en un modelo animal de diabetes e hiperosmolaridad plasmática.

- Estudiar el efecto de los productos de glicosilación avanzada sobre la senescencia celular en células mesangiales humanas analizando las vías intracelulares implicadas en dicho proceso, con especial atención a:
 - Las vías de senescencia implicadas.
 - La implicación de la producción de radicales libres.
 - El papel de factores de crecimiento como el IGF-1 en este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este trabajo, se realizaron tanto experimentos *in vitro* como *in vivo*. Los experimentos *in vitro* se realizaron en cultivos primarios de células mesangiales humanas (CMH) (pases 3-7) y para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas wistar macho.

Para analizar los efectos de la alta glucosa (HG; del inglés, *high glucose*) y la pequeñas variaciones de osmolaridad plasmática, se incubaron las CMH con altas concentraciones de glucosa (HG) (30mM) así como diferentes osmolitos como manitol (30mM), sacarosa (30mM), urea (30mM) y cloruro sódico (9mM), durante periodos de tiempo de 24 a 72 horas. En un primer lugar se estudió la senescencia celular a través del análisis la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia utilizando el sustrato fluorescente C₁₂FDG, así como las vías de senescencia implicadas mediante el estudio de la expresión de p16^{INK4a}, p53 y p21.

La implicación de la producción de especies reactivas de oxígeno se testó midiendo su producción por citometría de flujo, en CMH tratadas con HG (30mM) o manitol (30mM). Con el fin de conocer si el efecto sobre la senescencia era debido a la producción de ROS, se trataron las células con el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC), estudiándose tanto la actividad SA- β -Gal como la expresión de p53 y p16^{INK4a}.

Se analizaron las vías Ras y MAPK como posibles mecanismos intracelulares implicados en el proceso de senescencia inducido por HG y manitol. La activación de Ras se estudió mediante ensayo de pull-down en CMH tratadas con HG (30mM) y manitol (30m) y la SA- β -Gal y la expresión de p53 y p16^{INK4a} en células tratadas con el inhibidor farmacológico de la farnesilación de Ras FPTIII (2,5 μ M) y un dominante negativo de Ras (DN-Ras). También se midió la activación de las MAPK p38 y Erk1/2 mediante western-blot de su forma activa (p-p38 y p-Erk1/2) y se midió la expresión de p53 y p16^{INK4a} en presencia de inhibidores farmacológicos de la activación de Erk1/2 (PD98059; 50 μ M) y p38 (SB203580; 25 μ M).

Para conocer el efecto de osmolitos compatibles sobre la senescencia celular, se trataron CMH con *myo*-inositol (1mM) junto con HG (30mM) y manitol (30mM) y se estudió la SA- β -Gal, la expresión p53 y p16^{INK4a} así como la activación de Ras, Erk1/2 y p38.

Los estudios *in vivo* se realizaron para estudiar la senescencia celular y la función renal en un modelo animal de diabetes e hiperosmolaridad plasmática. Se establecieron tres grupos de animales: controles, diabéticos (por inyección de Estreptozotocina) y manitol (por inyección intraperitoneal de manitol durante 8 días). En estos animales se estudió la osmolaridad plasmática, la glucemia y glucosuria, diuresis, creatinina sérica, aclaramiento de creatinina y proteínas en orina. En el riñón de estos animales se estudió la expresión de p53 y p16^{INK4a} mediante western-blot y técnicas de inmunohistoquímica.

Para llevar a cabo el segundo objetivo del trabajo, con el fin de conocer los efectos de los productos de glicosilación avanzada sobre la senescencia celular, se realizaron experimentos utilizando albúmina glicosilada (AG) (50-200µg/ml) y albúmina no glicosilada (ANG) (100µg/ml) en CMH, durante periodos de tiempo de 24 a 72 horas. Se estudió la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia utilizando el sustrato fluorescente C₁₂FDG. Las vías de senescencia implicadas se analizaron mediante el estudio de la expresión de p16^{INK4a}, p53 y p21. Para estudiar la especificidad de la interacción AG-RAGE se bloqueó el receptor con un anticuerpo bloqueante anti-RAGE y un ARN de interferencia contra el mismo, analizando la expresión de p53.

La implicación de las especies reactivas de oxígeno se estudió midiendo la producción de ROS por citometría de flujo en CMH tratadas con AG (100µg/ml). Con el fin de conocer si el efecto sobre la senescencia era debido a la producción de ROS, se trataron las células con el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC), estudiándose tanto la actividad SA-β-Gal como la expresión de p53. Se analizó la expresión de catalasa por western-blot en presencia de AG (100µg/ml), ANG (100µg/ml), anticuerpo bloqueante anti-RAGE y ARN de interferencia contra RAGE. Para ver la implicación del descenso en la expresión de catalasa sobre la senescencia se analizó la expresión de p53 y la SA-β-Gal tras la adición exógena de catalasa.

La liberación de IGF-1 al sobrenadante de CMH tratadas con AG (100µg/ml) se estudió por ensayo de ELISA. La activación del receptor IGF-1 (IGF-1R) se analizó mediante ensayo de inmunoprecipitación y western-blot de la forma activa del receptor (p-IGF-1R). La activación del IGF-1R se inhibió utilizando un inhibidor farmacológico de la autofosforilación del IGF-1R (12µM) o mediante la transfección estable de CMH con klotho. La expresión de klotho se midió por RT-PCR cuantitativa. Las vías intracelulares implicadas se analizaron mediante western-blot o pull-down mediante el

análisis de la actividad de Akt (p-akt), FoxO1 (p-FoxO1), Ras (Ras-GTP) y Erk1/2 (p-erk 1/2). Se midió la expresión de p53 y catalasa en presencia un dominante negativo de Ras (DN-Ras) y un inhibidor farmacológico de la activación de Erk1/2 (PD98059; 50 μ M) (Figura 22).

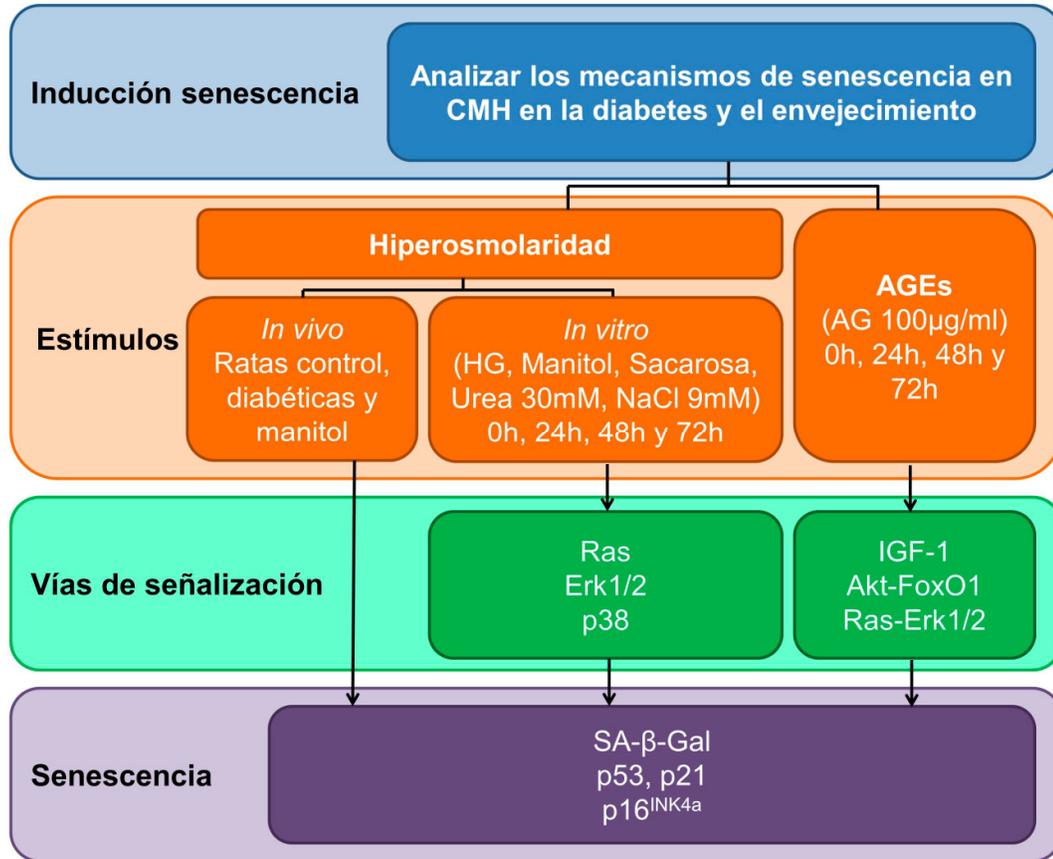


Figura 22. Esquema del diseño experimental empleado en el presente trabajo

2. MATERIAL EMPLEADO

2.1. REACTIVOS

Los reactivos y las dosis utilizados para la realización de los tratamientos *in vitro* se resumen en la tabla 4

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN DE USO | CASA COMERCIAL |
|--|----------------------|--|
| Albúmina glicosilada (AG) | 100µg/ml | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| Albúmina no glicosilada (ANG) | 100µg/ml | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| Catalasa (CAT) | 320U/ml | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| N-acetil-cisteína (NAC) | 10mM | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| Glucosa | 30mM | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| Manitol | 30mM | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |
| Sacarosa | 30mM | Panreac (Castellar del Vallès, España) |
| Urea | 30mM | Calbiochem (Gibbstown, NJ, EEUU) |
| Cloruro sódico (NaCl) | 9 mM | Panreac (Castellar del Vallès, España) |
| Anticuerpo monoclonal bloqueante Anti- RAGE humano | 10µg/ml | R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU) |
| Inhibidor FPTIII | 2,5µM | Calbiochem (Gibbstown, NJ, EEUU) |
| PD98059 | 50 µM | Calbiochem (Gibbstown, NJ, EEUU) |
| SB203580 | 25 µM | Calbiochem (Gibbstown, NJ, EEUU) |
| Inhibidor IGF-1R | 12 µM | Calbiochem (Gibbstown, NJ, EEUU) |
| Myo-inositol | 1 mM | Sigma (St. Louis, MO, EEUU) |

Tabla 4. Reactivos utilizados en los tratamientos

2.2. CULTIVO DE CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS

Para la realización de los estudios *in vitro* se utilizaron células mesangiales humanas (CMH). Estas células se cultivaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía (Díez-Marqués, M.L. y col 1995). Se recogieron porciones de corteza renal sanas, de un riñón humano obtenido por nefrectomía por carcinoma renal. Se aislaron los glomérulos por procedimientos mecánicos y se trataron con colagenasa tipo IA (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) para la obtención de células mesangiales. Las

CMH se mantuvieron en placas petri de plástico con medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, M.D., EEUU), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; del inglés *fetal bovine serum*), L-glutamina (1mm), penicilina (0,66 µg/ml), estreptomicina sulfato (60µg/ml) (Gibco, Paisley, Reino Unido), y tamponado con HEPES y bicarbonato, a pH 7.4 en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se subcultivaron en un ratio 1:4 usando el mismo medio de cultivo. Los experimentos se realizaron en células en pase 3 a 7 sembradas en placas Petri de plástico a una densidad de 4x10⁴ células/cm², en confluencia con medio RPMI sin FBS.

2.3. LINEA DE CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE CON KLOTHO

Para la obtención de una línea celular de CMH transfectadas de manera estable con un plásmido que contiene la isoforma de membrana de la proteína klotho, se sembraron 100.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se procedió a transfectar dichas células, que estaban en estado de subconfluencia, con 1µg de plásmido que contiene la isoforma transmembrana de klotho de ratón, clonado en un vector pEF1/Myc-His (CMHKL) (amablemente proporcionado por Dr. M. Kuro-o) o bien con un plasmido que contenía el vector pEF1/Myc-His vacío (CMHvacío). Para realizar la transfección se utilizó medio Opti-MEM® (Gibco, Paisley, Reino Unido) y lipofectamina (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido). La transfección se dejó toda la noche y transcurrido este tiempo, las células se recuperaron en medio RPMI al 10% de FBS durante 3 días. Una vez recuperadas, las células transfectadas se seleccionaron con 200 µg/ml de G418 (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) durante 14 días (Kurosu, H. y col 2006).

2.4. ESTUDIOS EN ANIMALES

Se realizaron tres grupos de animales con diferentes tratamientos:

- **Grupo control:** Formado por 6 animales a los que se les inyectó citrato vía intraperitoneal (3,75 ml de citrato/kg peso) y se mantuvieron durante 12 semanas, tras las cuales se sacrificaron.

- Grupo Diabéticas: Formado por 6 animales a los que se les inyectó estreptozotocina (STZ) (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) por vía intraperitoneal para inducirles diabetes (75mg de STZ en 4,75ml de citrato/kg peso) y se mantuvieron durante 12 semanas hasta su sacrificio. La STZ es una N-Nitrosourea cuya acción específica es la destrucción de las células β -pancreáticas, generando por tanto, una diabetes experimental de tipo 1.
- Grupo Manitol: Formado por 6 animales a los que se les inyectó manitol vía intraperitoneal (10 ml Manitol 1M/kg peso) de manera diaria durante 8 días. El manitol es utilizado para inducir un aumento en la osmolaridad plasmática (Ghodsi, A. y col 1999)

Durante el tratamiento, todos los animales se mantuvieron *ab libitum* de agua y comida.

El día anterior al término del tratamiento, los animales se introdujeron en jaula metabólica para recoger la orina producida durante 24 horas. Transcurrido este tiempo los animales se anestesiaron con isofluorano y se procedió a la extracción de sangre directamente del corazón. Se recogieron muestras de riñón y aorta que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C para su posterior análisis. Una porción de riñón fue incluida en parafina para el análisis histológico. La sangre extraída se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm para la recogida del plasma que se utilizó junto con la orina para análisis bioquímico.

3. METODOS

3.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Las técnicas empleadas para medir la actividad β -galactosidasa se basaron en el uso de sustratos de la β -galactosidasa cuyo producto pudiera ser fácilmente detectable. Para la cuantificación de la actividad de dicha enzima se utilizaron tres métodos diferentes:

3.1.1. Detección citoquímica con tinción SA- β -gal: Para ello, se utilizó el sustrato de la β -galactosidasa 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactósido (X-Gal). La X-Gal es hidrolizada por la β -galactosidasa dando lugar a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último compuesto es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo que al dimerizar da lugar a un precipitado de color azul fácilmente detectable (Figura 23).

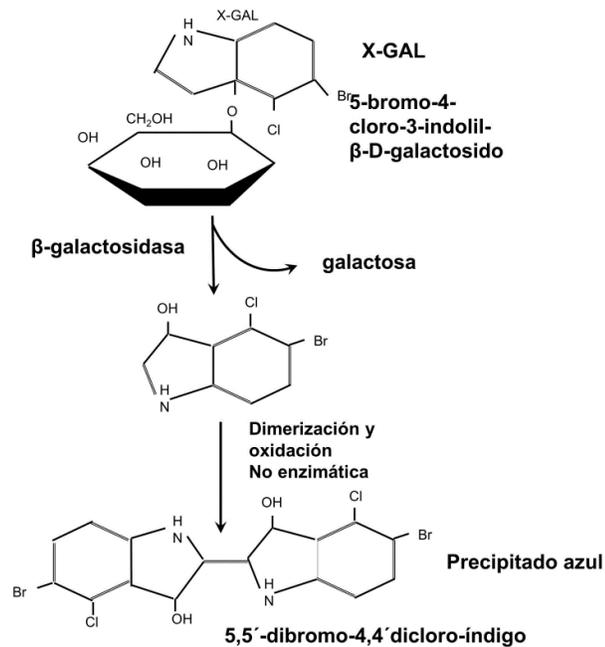


Figura 23. Reacción de hidrólisis de X-Gal por la β -galactosidasa.

Para la realización de esta técnica, las CMH se lavaron dos veces con PBS 1X, se fijaron durante 3 minutos con paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) al 3% en tampón fosfato salino (PBS; NaCl 139mM, Na₂HPO₄·2H₂O 8 mM, NaHPO₄·2H₂O 1,4 mM; pH 7,4), se lavaron con PBS 1X y se incubaron 24h a 37°C con

solución fresca de tinción de Sa- β -gal [1mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactósido (X-Gal) (Calbiochem; Gibbstown, NJ, EEUU) por ml, 5mM Ferrocianuro potásico 5 mM, ferricianuro potásico 5 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, ácido cítrico 40 mM y fosfato sódico 4M; pH 6,0]. Para detectar la actividad β -gal lisosomal, la solución ácido cítrico fosfato sódico fue de pH 4,0. Tras la incubación, las CMH se lavaron con agua, se deshidrataron con diluciones seriadas de etanol al 90% y 100% y se tiñieron con anti-Thy-1 para probar si las células conservan el fenotipo mesangial (Dimri, G.P. y col 1995). Las muestras fueron fotografiadas utilizando microscopio (Nikon Eclipse 50i; Melville, NY, EEUU), a distintos aumentos (20x y 40x), acoplado una cámara fotográfica digital (Nikon Digital Sight; Melvine, NY, EEUU).

3.1.2. Medida de actividad β -galactosidasa por citometría de flujo: En este experimento se utilizó el sustrato de la β -galactosidasa 5-dodecanoilaminofluoresceína di- β -D-Galactopiranosido (C₁₂FDG) (Figura 24). Una vez dentro de la célula, la β -galactosidasa hidroliza los residuos de galactosa dando lugar a un producto fluorescente que es retenido en la célula, probablemente debido a la presencia de un motivo de 12 carbonos de naturaleza lipofílica que puede incorporarse a la membrana celular. De este modo cuanto mayor actividad β -galactosidasa tenga la célula, mayor intensidad de fluorescencia tendrá. La intensidad de fluorescencia puede medirse por citometría de flujo (Plovins, A. y col 1994).

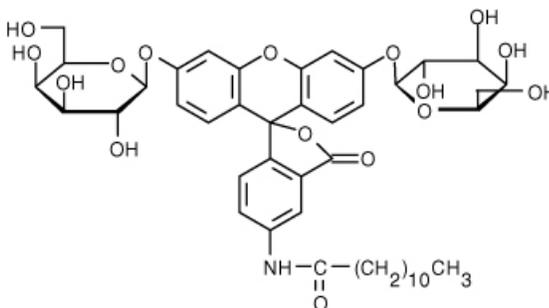


Figura 24. Estructura química de C₁₂FDG

Para la realización de este ensayo, se sembraron CMH en placas de 6 pocillos y se trataron en medio sin FBS. Una vez finalizado el tratamiento, se les cambió el medio y se incubaron durante 2 h con cloroquina 300 μ M (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) para inducir alcalinización lisosomal. Este proceso permite eliminar la

posible actividad β -galactosidasa procedente de los lisosomas y así disminuir el fondo. Transcurridas las 2 h con cloroquina, se añadió el sustrato fluorogénico de la β -galactosidasa, C₁₂FDG (33 μ M) (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) y se dejó durante 4 h. Al final de la incubación, las CMH se lavaron dos veces con PBS 1X frío y se levantaron mediante tripsinización. Las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min a 4°C, se lavaron con PBS 1X y se volvieron a centrifugar. El pellet celular se resuspendió en 500 μ l de PBS 1X y se analizó inmediatamente en citómetro de flujo FASCCalibur con un láser de argón a 488nm de excitación (Becton Dickinson; BD Bioscience; Erembodegem, Bélgica). La señal de C₁₂-fluoresceína se midió en el detector FL-1 y la actividad β -galactosidasa se estimó utilizando la intensidad de fluorescencia media de la población. La autofluorescencia de CMH se midió en paralelo en células no expuestas a C₁₂FDG. Los datos se analizaron con el programa WinMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

3.1.3. Medida de actividad β -galactosidasa por microscopía confocal:

Para la realización de esta técnica se empleó también el sustrato fluorescente de la β -galactosidasa C₁₂FDG. En este caso, la fluorescencia se detectó en un microscopio confocal de fluorescencia.

En una placa de 24 pocillos se colocaron cubreobjetos circulares de cristal estériles (Microscope Cover Glass 12mm; Thermo Scientific; Chicago, IL., EEUU) donde se sembraron 100.000 células/pocillo en medio con 10% FBS. Al día siguiente, se privaron las células de suero y se le añadió el tratamiento correspondiente. Terminado el mismo, se incubaron con el sustrato fluorogénico de la β -galactosidasa, C₁₂FDG (33 μ M) (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) durante 4h. Finalizado dicho tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras y se montaron con líquido de montaje ProLong® Gold antifade Reagent (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) que incorpora tinción de núcleos celulares con DAPI. Las muestras se observaron en microscopio confocal LEICA TCS-SP5 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) utilizando láser de excitación a 488nm para detectar el producto fluorescente, y el diodo de 405 nm para detectar el DAPI. Las imágenes fueron captadas y la intensidad de la fluorescencia se midió por densitometría con programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y se representaron los resultados en forma de porcentaje con respecto al control.

3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CULTIVO CELULAR Y TEJIDO

Para la extracción de las proteínas nucleares y citosólicas de cultivo celular y tejido se utilizaron procedimientos diferentes

3.2.1. Cultivo celular: Las células tratadas se llevaron a hielo y se lavaron dos veces con PBS 1X frío. Para la extracción de las proteínas las células se lisaron con 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) EDTA 1 mM, 10% v/v glycerol, KCl 100 mM, 1% triton X-100, 0.5% v/v β -mercaptoethanol, NaF 5 mM, NaVO_4 0,2 mM, MgCl_2 5 mM, e inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). La solución resultante se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante se determinó utilizando Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). A cada muestra se añadió tampón SDS 5x (Tris-HCl 0,1M pH7, SDS 3X, β -mercaptoetanol 1M, Glicerol 1M y azul de bromofenol) y se calentó a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización de proteínas y posterior análisis de las mismas por western-blot.

3.2.2. Tejido renal: Porciones de corteza renal se sometieron a tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH7,6, 1% Tritón X-100, EDTA 1mM, 0,1% deoxicolato sódico, NaVO_4 500 mM, NaF 50 mM, PMSF 1mM e inhibidores de proteasas) durante 30 minutos en hielo. Trascurrido este tiempo, los tejidos se trituraron mecánicamente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante se determinó utilizando el kit Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). A cada muestra se añadió tampón SDS 5x y se calentó a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización de proteínas. Una vez extraídas las proteínas se analizaron por western-blot.

3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

Para el estudio de la expresión de proteínas se utilizó la técnica de western-blot que permite en un primer paso la separación de proteínas por peso molecular y la posterior detección de la proteína de interés mediante el uso de anticuerpos que la reconocen específicamente (Towbin, H. y col 1979).

Una misma cantidad de proteína de cada muestra se separó en geles de SDS-poliacrilamida (National Diagnostics, Atlanta, GA, EEUU) de diferente porcentaje bajo condiciones reductoras en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, Glicina

19,2 M y 0,1% SDS). Una vez separadas las proteínas por peso molecular se transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) por transferencia semi-seca en tampón “semi-dry” (Tris-HCl 48 mM, pH 9,2, glicina 39 mM, 0,35% SDS y 20% metanol) o de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) por transferencia húmeda con tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, Glicina 19,2 M, 0,1% SDS y 20% Metanol), para proteínas de alto peso molecular. Las membranas se bloquearon con un 5% de leche desnatada o un 5% albúmina sérica bovina (BSA) en tampón tween-tris salino (TTBS) (Tris-HCL 20mM pH 7,5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) durante 1h a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario contra la proteína que se quería detectar durante toda la noche a 4°C. Tras lavar las membranas con TTBS, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 6) conjugado con peroxidasa durante 1h a temperatura ambiente. Una vez lavadas las membranas se revelaron utilizando ECL Western blotting detection reagents (Pierce, Rockford, IL, EEUU) y la consecuente exposición a películas X-OMAT (Kodak, Rochester, NY, EEUU). A continuación se detallan los datos de todos los anticuerpos utilizados (Tablas 5 y 6)

| Anticuerpo | Especie hospedadora | Dilución | Diluyente | Bloqueo | Casa comercial |
|---|---------------------|----------|------------------|----------|---|
| Monoclonal anti- β -tubulina | Ratón | 1/1000 | 3% BSA en TTBS | 5% Leche | Sigma, St. Louis, MO, EEUU |
| Monoclonal anti-actina | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Sigma, St. Louis, MO, EEUU |
| Monoclonal anti-p53 humano | Ratón | 1/1000 | 3% BSA en TTBS | 5% Leche | Sigma, St. Louis, MO, EEUU |
| Monoclonal anti-p16 ^{INK4a} humano | Ratón | 1/1000 | 3% BSA en TTBS | 5% Leche | Sigma, St. Louis, MO, EEUU |
| Policlonal anti-p16 ^{INK4a} | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Abcam (Cambridge, MA, EEUU) |
| Monoclonal anti-p21 humano | Ratón | 1/500 | 3% BSA en TTBS | 5% Leche | BD Biosciences (Erembodegem, Bélgica) |
| Policlonal anti-p21 | Conejo | 1/500 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Abcam, Cambridge, MA, EEUU |
| Monoclonal anti-Ras humano | Ratón | 1/1000 | 3% BSA en TTBS | 5% Leche | BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica |
| Policlonal anti-erk 1/2 | Conejo | 1/500 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology (Danvers, MA, EEUU) |

MATERIALES Y MÉTODOS

| Anticuerpo | Especie hospedadora | Dilución | Diluyente | Bloqueo | Casa comercial |
|---|---------------------|----------|------------------|----------|--|
| Policlonal anti-p-erk 1/2 (Thr202/Tyr204) | Conejo | 1/500 | 3% BSA en TTBS | 5% BSA | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Policlonal anti-p38 | Conejo | 1/500 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Policlonal anti-p-p38 (Thr180/Tyr182) | Conejo | 1/500 | 3% BSA en TTBS | 5% BSA | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Monoclonal anti-IGF-1R β | Conejo | 1/100 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Monoclonal anti-p-IGF-1R β | Conejo | 1/500 | 3% BSA en TTBS | 5% BSA | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Policlonal anti-Catalasa | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Anti-FoxO1 | Conejo | 1/100 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Anti-p-FoxO1 | Conejo | 1/500 | 3% BSA en TTBS | 5% BSA | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Policlonal anti-RAGE humano | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Abcam, Cambridge, MA, EEUU |
| Policlonal Anti-Akt | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Monoclonal Anti-p-Akt | Conejo | 1/1000 | 3% Leche en TTBS | 5% Leche | Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU |
| Policlonal Anti-fosfotirosina | Conejo | 1/1000 | 3% BSA en TTBS | 5% BSA | BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica |

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados y condiciones empleadas para la realización de los western-blot

| Anticuerpo | Especie hospedadora | Dilución | Diluyente | Casa comercial |
|--------------------------------------|---------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| Anti-ratón IgG peroxidasa-conjugado | Cabra | 1/2000 | 0,05% BSA en TTBS | Sigma, St. Louis, MO, EEUU |
| Anti-conejo IgG peroxidasa-conjugado | Cabra | 1/5000 | 3% leche en TTBS | Dako, Glostrup, Dinamarca |

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados y condiciones empleadas para la realización de los western-blot

3.4. MEDIDA DEL ESTADO OXIDATIVO

La producción total de ROS se analizó midiendo la oxidación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Molecular probes, Paisley, Reino Unido) producida en CMH, por citometría de flujo. La DCFH-DA es la técnica más

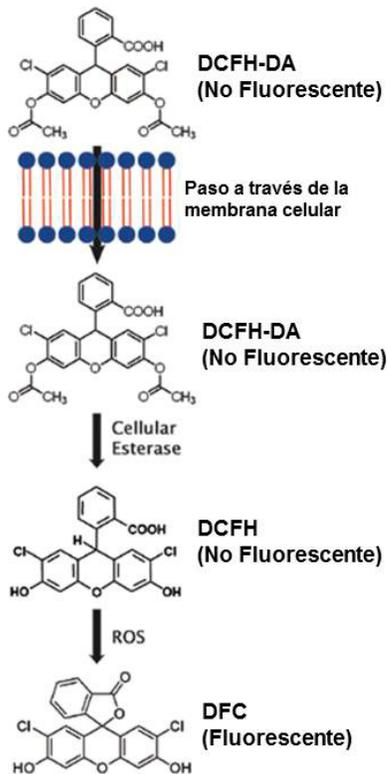


Figura 25. Reacciones de la DCFH-DA en el interior de la célula.

empleada para la medida del estado oxidativo celular. La DCFH-DA entra al interior de la célula gracias a su gran permeabilidad celular y una vez en el interior, las esterasas intracelulares hidrolizan a la DCFH-DA dando lugar a un producto relativamente polar e impermeable a la membrana celular, H₂DCF. Esta molécula no fluorescente se acumula en el interior de la célula y la consecuente oxidación de la misma da lugar al producto fluorescente DCF (Figura 25). El estado oxidativo de una muestra puede ser monitorizado mediante la detección del incremento en fluorescencia. La acumulación de DCF en células puede ser medida por un incremento en la fluorescencia a 530nm cuando la muestra es excitada a 485 nm. La fluorescencia a 530nm puede medirse usando un citómetro de flujo y se asume que es proporcional con la concentración de peróxido de hidrógeno en la célula (Bass, D.A. y col 1983; Royall, J.A. y Ischiropoulos, H. 1993)

Para la realización de este ensayo, las CMH se lavaron dos veces con PBS 1X y se levantaron por tripsinización. La suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 1800 rpm a 4°C, el pellet se resuspendió en 300µl de solución DCFH-DA (5µM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Uno de los tubos se resuspendió en 300 µl de PBS 1X para medir la autofluorescencia de CMH. Tras la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 min a 1800 rpm a 4°C. Las células se resuspendieron en 500µl de PBS 1X y se mezclaron con yoduro de propidio 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Las CMH se analizaron con citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson; BD Bioscience; Erembodegem, Bélgica). La señal H₂DCFDA-fluoresceína se midió con detector FL-1 y las células yoduro positivas con FL-3. La producción de ROS se estimó utilizando la

intensidad de fluorescencia media de la población viva (yoduro de propidio negativas). Los datos se analizaron con programa WinMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

3.5. ENSAYO DE PULL-DOWN

La actividad de Ras (Ras-GTP) se midió mediante ensayo de pull-down (Einarson, M.B. 2007). El fundamento de esta técnica se basa en que la proteína Ras activa es capaz de reconocer el dominio de unión a Ras (RBD) de Raf1, proteína susceptible de activación por Ras. Para la realización del ensayo de pull-down se utiliza una proteína de fusión que contiene el dominio de unión a Ras unido a glutatión sefarosa (GST) (RBD-GST). El RBD-GST se encuentra clonado en un plásmido bacteriano que se purifica tras el crecimiento de estas bacterias en medio LB con ampicilina. La glutatión sefarosa permite a la proteína de fusión adherirse a sefarosa con una alta afinidad. Por tanto, el ensayo de pull-down consiste en la incubación de la mezcla de proteínas presentes en los lisados celulares con la proteína RBD-GST unida a sefarosa. Como se ha comentado antes, la sefarosa es fácilmente precipitable por centrifugación y permite la separación de la proteína Ras activa del resto de proteínas celulares. Para facilitar la unión de la RBD-GST a la sefarosa es necesaria la incubación de ambas a 4°C toda la noche, preparándose el día anterior al pull-down.

Para la realización de este ensayo las CMH tratadas se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron con 300µl de tampón de extracción de Ras (Tris-HCl 20mM (pH 7.4), EDTA 1mM, 10% v/v glicerol, ClK 100 mM, 1% triton X-100, 0.5% v/v β-mercaptoetanol, NaF 5 mM, NaVO₄ 0,2 mM, MgCl₂ 5 mM e inhibidores de proteasas). El lisado celular se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. 270 µl del sobrenadante se incubaron con bolas de sefarosa unida a la proteína de fusión Glutacion S-transferasa (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) que contiene el dominio de unión a Ras de Raf1 (GSTRaf1-RBD) durante 2h. Las bolas de sefarosa se lavaron 3 veces con el tampón de lisis utilizado, se añadió tampón SDS 5x y se calentaron a 95°C durante 5 minutos para su futuro análisis por western-blot. 30 µl de los lisados celulares se tomaron previamente al ensayo de pull-down para el análisis de la expresión total de Ras.

3.6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los tejidos renales recogidos de los animales se fijaron en formalina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) durante toda la noche, se deshidrataron mediante un gradiente creciente de etanol (Panreac, Castellar del Vallès, España) y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes en láminas de 3 μm y se montaron en cristales de poly-L-lisina (Polysine®; Fisher Scientific, Madrid, España). Después se desparafinaron con xileno (Panreac, Castellar del Vallès, España) y se rehidrataron mediante un gradiente decreciente de etanol.

Para las inmunohistoquímicas las muestras una vez desparafinadas y rehidratadas se sometieron a desenmascaramiento antigénico exponiéndolas en una olla a presión durante 2 minutos. Después se rodeó cada muestra con un rotulador hidrofóbico (Dako Pen, Glostrup, Dinamarca). A continuación se bloqueó la peroxidasa endógena incubando con H_2O_2 (Panreac, Castellar del Vallès, España) al 3% durante 5 minutos. Tras el bloqueo, se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-p53 (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) o anti-p16^{INK4a} (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) a una dilución 1:100 en PBS al 3% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Como control negativo se utilizaron secciones a las que no se les añadió anticuerpo primario. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Sigma, St. Louis, MO, EEUU; 1:100) durante 1 hora. Tras lavar con PBS se reveló con el cromógeno diaminobencidina (DAB; Dako, Glostrup, Dinamarca) aproximadamente durante 5 minutos. Las secciones se contrastaron con hematoxilina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y se montaron con DPX (Panreac, Castellar del Vallès, España). Las muestras fueron fotografiadas utilizando microscopio Nikon Eclipse 50i (Melville, NY, EEUU), a distintos aumentos (20x y 40x), acoplado una cámara fotográfica digital (Nikon Digital Sight; Melvine, NY, EEUU).

3.7. TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA

Se utilizó esta técnica para inhibir de manera específica la expresión de RAGE. Para ello, el día previo a la transfección se sembraron 100.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, las células en subconfluencia se transfectaron con ARN de interferencia (siRNA; del inglés, *small interference RNA*) ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon, Chicago, IL., EEUU). Se mezclaron 100nM de RAGE siRNA (Cat. No: L-003625-00-0005) o control de siRNA sin diana (Cat. No. D-001810-10-05)

con 3µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) en 200µl de Opti-MEM® y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se añadió a CMH al 50% de confluencia en 800µl de Opti-MEM® y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, las células se dejaron recuperar añadiendo medio RPMI al 10% de FBS. Tras 48 horas, las células se privaron de suero y se les añadió el tratamiento. Posteriormente se extrajeron las proteínas para su análisis por western-blot.

3.8. MEDIDA DE EXPRESIÓN DE IGF-1 POR ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall, E. y col 1977).

Para la cuantificación de IGF-1 liberado al sobrenadante celular, se empleó un ensayo de ELISA comercial específico para IGF-1 humano (R&D Systems; Minneapolis, MN, EEUU). Se utilizó una placa que portaba un anticuerpo monoclonal anti-IGF-1 humano adherido al fondo de los pocillos. Se recogió el sobrenadante de las células tratadas y se realizó una breve centrifugación para eliminar los restos celulares (2 minutos a 11000 rpm). 1500 µl de cada sobrenadante se traspasó a un tubo limpio liofilizándose posteriormente (Liofilizador Labconco; Kansas City, MO, USA) para concentrar las proteínas unas 20 veces. Tanto las soluciones de la curva estándar como los sobrenadantes se pipetearon en los pocillos de la placa y se incubaron durante 2 horas a 4°C, de tal modo que cualquier IGF-1 presente en la muestra se unió al anticuerpo inmovilizado. Tras diversos lavados para eliminar cualquier sustancia no unida al anticuerpo inmovilizado, se añadió un anticuerpo policlonal específico para IGF-1, unido a una enzima y se incubó durante 1 hora a 4°C. Tras varios lavados para eliminar el anticuerpo no unido, se procedió a la adición del sustrato de la enzima ligada al anticuerpo y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La adición del sustrato dio lugar a color de manera proporcional a la cantidad de IGF-1 unida en el primer paso. La reacción se paró y la intensidad de color se midió en un espectrofotómetro a 450nm. Se tomó una medida a 570 nm cuyo valor se resta al obtenido a 450nm para corregir las posibles imperfecciones ópticas de la plata. Los valores obtenidos se interpolaron en la curva

patrón dando lugar a valores de IGF-1 en ng/ml, que se representaron en tanto por ciento respecto al control.

3.9. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1

Para la detección de la activación del IGF-1R se utilizó la técnica de inmunoprecipitación. Esta técnica consiste en la incubación de la mezcla de proteínas presente en los lisados celulares con un anticuerpo específico contra IGF-1R junto con la proteína A/G unida a sefarosa. La proteína A/G tiene una gran afinidad por la región Fc del anticuerpo (IgG), quedando libre la región Fab del mismo para su unión con la proteína a estudiar. Como la proteína A/G está unida a sefarosa, un soporte fácilmente precipitable por centrifugación, se puede separar de este modo el inmunocomplejo del resto de las proteínas de la muestra que permanecerán en el sobrenadante (Bjorck, L. y col 1984).

Las CMH sembradas en placas Petri de 10cm² fueron tratadas con albúmina glicosilada (100 µg/ml) a diferentes periodos de tiempo. Una vez transcurrido el mismo, se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron con 300µl de un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaVO₄ 1 mM, PMSF 0,1 mM y 1% triton X-100. Los lisados celulares se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. 200 µl del sobrenadante se incubaron con anticuerpo anti-IGF-1Rβ a una dilución 1/50 durante toda la noche a 4°C en rotación. Se añadió a cada muestra 10µl de proteína A/G plus (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Alemania) y se incubó durante 3h a 4°C en rotación. La proteína A/G plus se lavó con un tampón de lavado que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaVO₄ 1 mM y PMSF 0,1 mM. A cada muestra se añadió tampón SDS 5x, se calentó a 95° durante 5 minutos y se cargó en geles de poliacrilamida para su separación por electroforesis. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpo anti-fosfotirosina para detección de IGF-1R autofosforilado. Como control del IGF-1R total se reincubaron las membranas con el anticuerpo anti-IGF1R.

3.10. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLOTHO

Para medir la cantidad de ARNm de klotho se empleó la técnica de RT-PCR cuantitativa o RT-PCR a tiempo real. Esta técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*) que permite amplificar secuencias de ADN hasta niveles fácilmente detectables mediante una ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) (Saiki, R.K, y col 1988). Para evaluar la expresión de un determinado gen por esta técnica, en primer lugar, el ARNm debe transformarse a ADN puesto que la Taq polimerasa solamente es capaz de amplificar ADN. Al ADN obtenido a partir de ARN se denomina ADN complementario o copia (ADNc). Esta reacción es lo que se conoce como retrotranscripción o transcripción inversa. Una vez obtenido en ADNc se procede a la PCR. En una PCR cuantitativa (qPCR; del inglés, *quantitative PCR*) se utiliza un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre una muestra un haz de longitud de onda determinada y detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado. En la qPCR realizada se utilizaron sondas Taqman™ específicas que son capaces de unirse al fragmento de ADN susceptible de amplificación de tal manera que cuando la Taq polimerasa amplifica esa región, la sonda emite fluorescencia. La fluorescencia producida estará relacionada con la cantidad de producto amplificado (Scheffe, J.H. y col 2006).

La extracción del ARN celular se basó en el método desnaturizante del tiocianato de guanidinio y la extracción con fenol/cloroformo (Chomczynski, P. 1993) Para la realización de esta técnica se procedió a la extracción del ARN de CMH transfectadas con plásmido que sobreexpresa klotho o con plásmido vacío utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido). Para ello, se retiró el medio de cultivo de cada placa, se añadió 1 ml del reactivo Trizol y se homogeneizó con la micropipeta hasta que la solución se volvió viscosa. La mezcla se incubó durante 15 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación, se añadieron 200µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar, centrifugándose después durante 15 minutos a 12.000 x g. Tras dicho centrifugado se observaron tres fases: una fase orgánica roja (inferior), una interfase blanquecina y una fase acuosa incolora (superior). El ARN se encuentra disuelto en la fase acuosa, que se recogió, se precipitó con 500µl de isopropanol y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos. El ARN precipitado se lavó con etanol para favorecer su disolución en agua y se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos. El pellet se dejó secar y se resuspendió en agua libre de enzimas que degraden el ARN (ARNasas). La

integridad del ARN se testó corriendo las muestras en geles de agarosa-formaldehído, y la concentración total de ARN se midió utilizando un espectrofotómetro VIS-UV (Nanodrop).

A partir del ARN extraído se sintetizó ADN copia (ADNc) utilizando el kit High Capacity™ (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, EEUU). La expresión de *klotho* se midió por RT-PCR cuantitativa (qPCR) (ABI Prism 7000), mediante ensayo Taqman™ y método doble delta Ct. Los primers utilizados fueron *Klotho* (Rn00580132_m1), y como control endógeno, *18s* (18s ARNr eucariótico control endógeno Applied Biosystems) y *GAPDH* (Rn99999916_m1).

3.11. TRANSFECCIÓN CON DOMINANTE NEGATIVO DE RAS

Para inhibir la activación de Ras, se utilizó un plásmido que contenía un dominante negativo de Ras (DN-Ras) que expresa una proteína disfuncional que compete con la activación de proteína Ras nativa. El día anterior de la transfección, se sembraron 100.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. Las CMH en una subconfluencia de aproximadamente el 50%, se transfectaron con 1µg de plásmido con DN-Ras junto con lipofectamina (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) en Opti-MEM® como medio de transfección y se dejó toda la noche. Al día siguiente, se retiró el medio de transfección y se dejaron recuperar las células en medio con suero. Tras 48h de recuperación, las células se privaron de suero y se les añadió el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tratamiento, se analizó la cantidad de Ras activo mediante ensayo de pull-down y la expresión de diferentes proteínas por western-blot.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media de un número variable de experimentos. Los valores densitométricos de los western-blot se corrigieron por la variación de carga de las correspondientes densidades de las bandas de Actina o β -tubulina. Se compararon los datos no pareados a través de los test estadísticos ANOVA de dos vías, t-Student, Friedman y Wilcoxon. El valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 17.0.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y LOS PEQUEÑOS CAMBIOS EN LA OSMOLARIDAD EXTRACELULAR SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS Y EN LA CORTEZA RENAL

1.1. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA INDUJERON SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS p53 Y p16^{INK4a}

Nuestro objetivo fue evaluar si las altas concentraciones de glucosa (HG) inducen senescencia y estudiar los mecanismos implicados en células mesangiales humanas sometidas al tratamiento prolongado con HG (30mM).

Para ello, en primer lugar, se trataron CMH con HG durante diferentes periodos de tiempo, observándose un aumento significativo de la actividad β -galactosidasa tras 24h de tratamiento, que se mantuvo hasta las 72h (Figura 26).

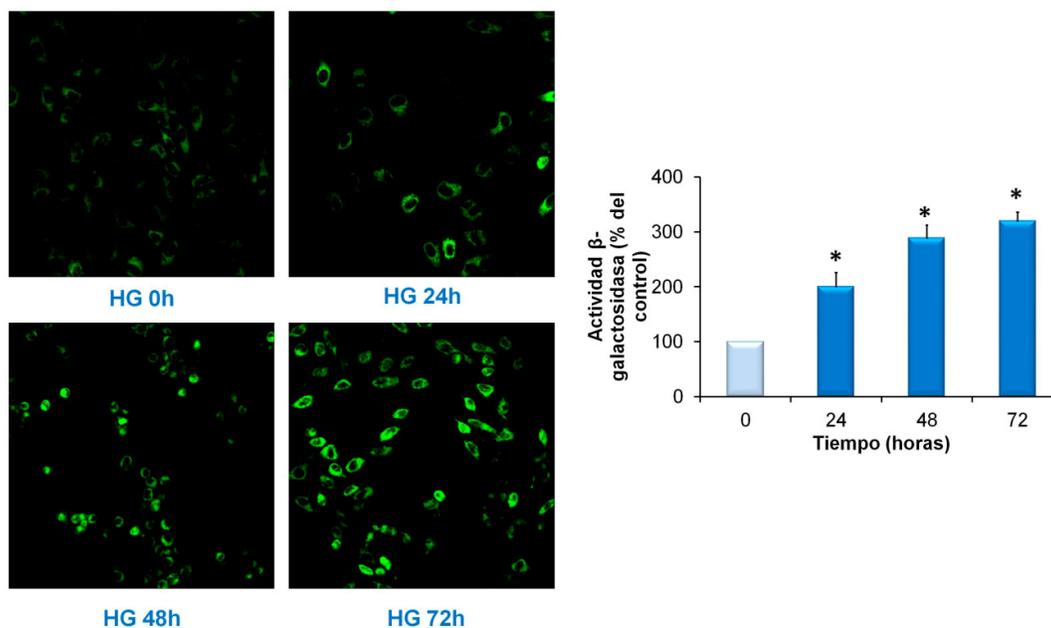


Figura 26. La HG promovió el aumento en la actividad β -galactosidasa. Actividad β -galactosidasa en CMH tratadas a diferentes periodos de tiempo con glucosa 30mM, medida por microscopía confocal con sonda C₁₂FDG. En la parte derecha se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la parte izquierda el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Para dilucidar los mecanismos de senescencia que se están activando en presencia de HG, se analizaron las vías de p53 y p16^{INK4a}. Cuando se analizó la vía de senescencia de p53 se observó un aumento significativo en su expresión de manera tiempo-dependiente (Figura 27.A), así como en la expresión de p21 (Figura 27.B).

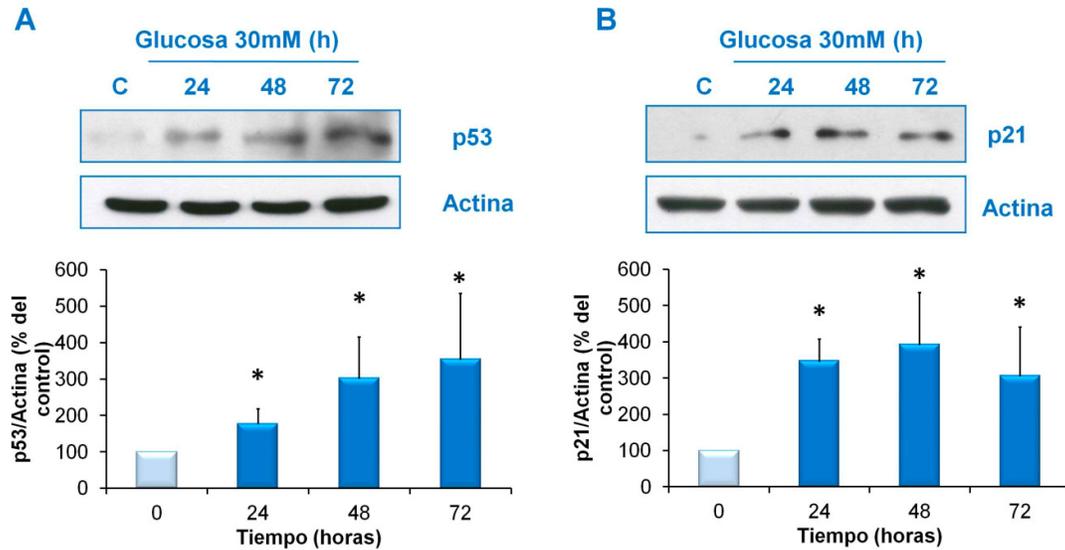


Figura 27. La HG induce un aumento en la expresión de p53 y p21. (A) Análisis de la expresión proteica de p53 y (B) p21 mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y en la parte inferior el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Al estudiar la vía de senescencia de p16^{INK4a}, también se observó un aumento significativo en su expresión tras el tratamiento con alta glucosa (Figura 28).

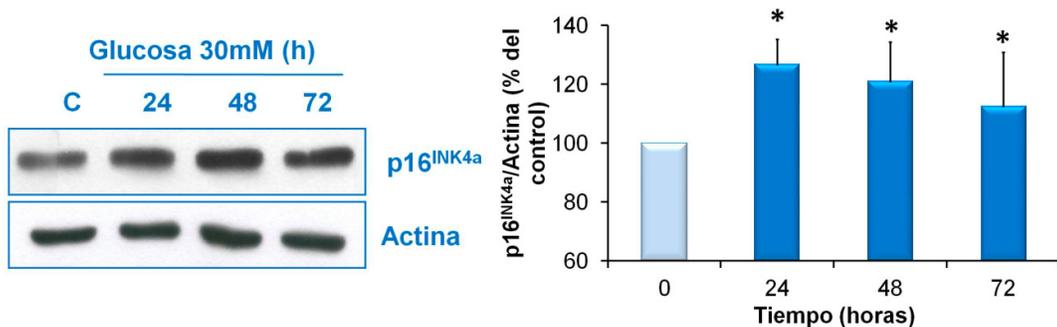


Figura 28. La HG aumentó la expresión de p16^{INK4a}. Análisis de la expresión proteica de p16^{INK4a} mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM durante diferentes periodos de tiempo. A la derecha se muestra un blot representativo y en la parte izquierda el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

La glucosa es un azúcar y por tanto, puede actuar como un soluto osmóticamente activo. Cuando analizamos la osmolaridad en el medio cultivo de CMH tratadas con HG, observamos un ligero pero significativo aumento en la osmolaridad de unos 20-30 mOsm/kg con respecto al medio de cultivo de las células sin tratamiento (Figura 29).

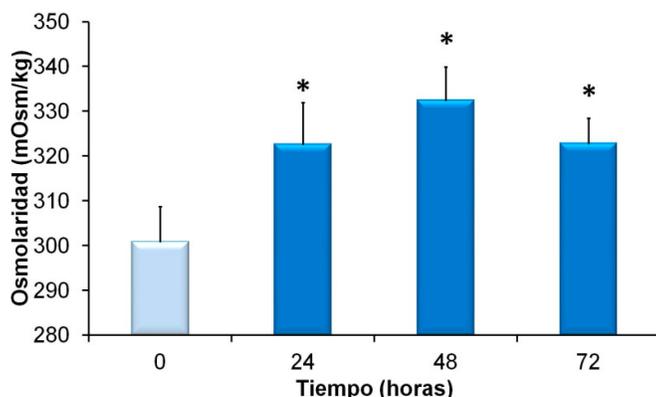


Figura 29. La HG indujo un aumento en la osmolaridad del medio extracelular. Medida de la osmolaridad del medio de cultivo de CMH tratadas con glucosa 30mM a diferentes periodos de tiempo. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

1.2. EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS CON DIFERENTES SUSTANCIAS OSMÓTICAMENTE ACTIVAS INDUJO SENESCENCIA CELULAR MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE p53 Y p16

Para analizar si los efectos de las altas concentraciones de glucosa sobre la senescencia celular en CMH eran dependientes o no de cambios en la osmolaridad del medio de cultivo, estas células se trataron con diferentes sustancias osmóticamente activas. Se utilizaron diferentes osmolitos para estudiar si el efecto observado en las CMH en presencia de alta glucosa puede deberse a un fenómeno relacionado con cambios en la osmolaridad del medio extracelular.

Para los siguientes experimentos se utilizaron diferentes sustancias osmóticamente activas como el cloruro sódico (NaCl) 9mM, manitol 30mM, sacarosa 30mM y urea 30mM.

En primer lugar, se analizó la osmolaridad del medio de cultivo de CMH tratadas con los osmolitos anteriormente descritos (Figura 30). Se observó un aumento de 20-30 mOsm/kg tras el tratamiento con manitol, sacarosa y urea, similar al

observado con la alta glucosa. Tras el tratamiento con NaCl, las CMH presentaron un incremento de unos 70 mOs/kg en el medio de cultivo.

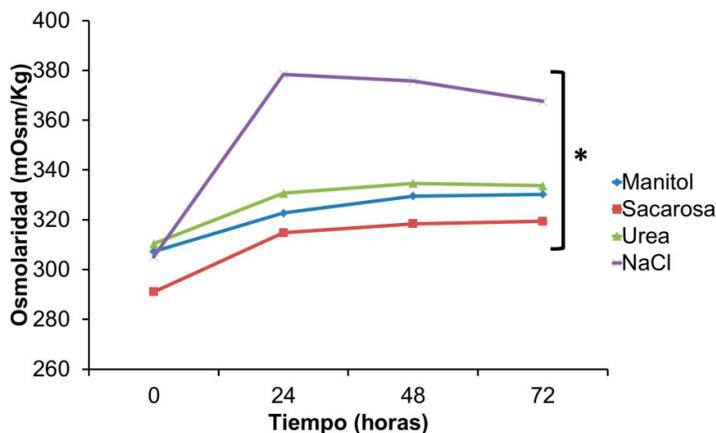


Figura 30. Diferentes osmolitos indujeron un aumento en la osmolaridad del medio extracelular.

Medida de la osmolaridad del medio de cultivo de CMH tratadas con manitol 30mM, sacarosa 30mM, urea 30mM y NaCl 9 mM durante diferentes periodos de tiempo. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control de su mismo tratamiento.

Posteriormente, se evaluó la actividad β -galactosidasa en CMH tratadas con NaCl, manitol, sacarosa y urea (Figura 31 y 32). El tratamiento con manitol, sacarosa y urea, indujo senescencia celular a las 24 horas de tratamiento, manteniéndose el efecto hasta las 72 horas. En el caso del NaCl, se observó un incremento en la actividad β -galactosidasa a las 24 y 48 horas de tratamiento pero que manifestó un descenso a las 72 horas.

Cuando se analizó la expresión de p53, se observó un aumento significativo tras 24 horas de tratamiento y en las 72 horas siguientes, en las CMH tratadas con manitol, sacarosa y urea, observándose un pico máximo a las 48 horas de tratamiento. Tras el tratamiento con NaCl, p53 aumentó significativamente a las 24 horas, pero se observó un descenso gradual hasta las 72 horas de tratamiento (Figura 33).

Para comprobar si el aumento en p53 está activando vías de senescencia, se analizó la expresión de p21. Tras el tratamiento con manitol, sacarosa, urea y NaCl se observó un aumento significativo en la expresión de p21 (Figura 34).

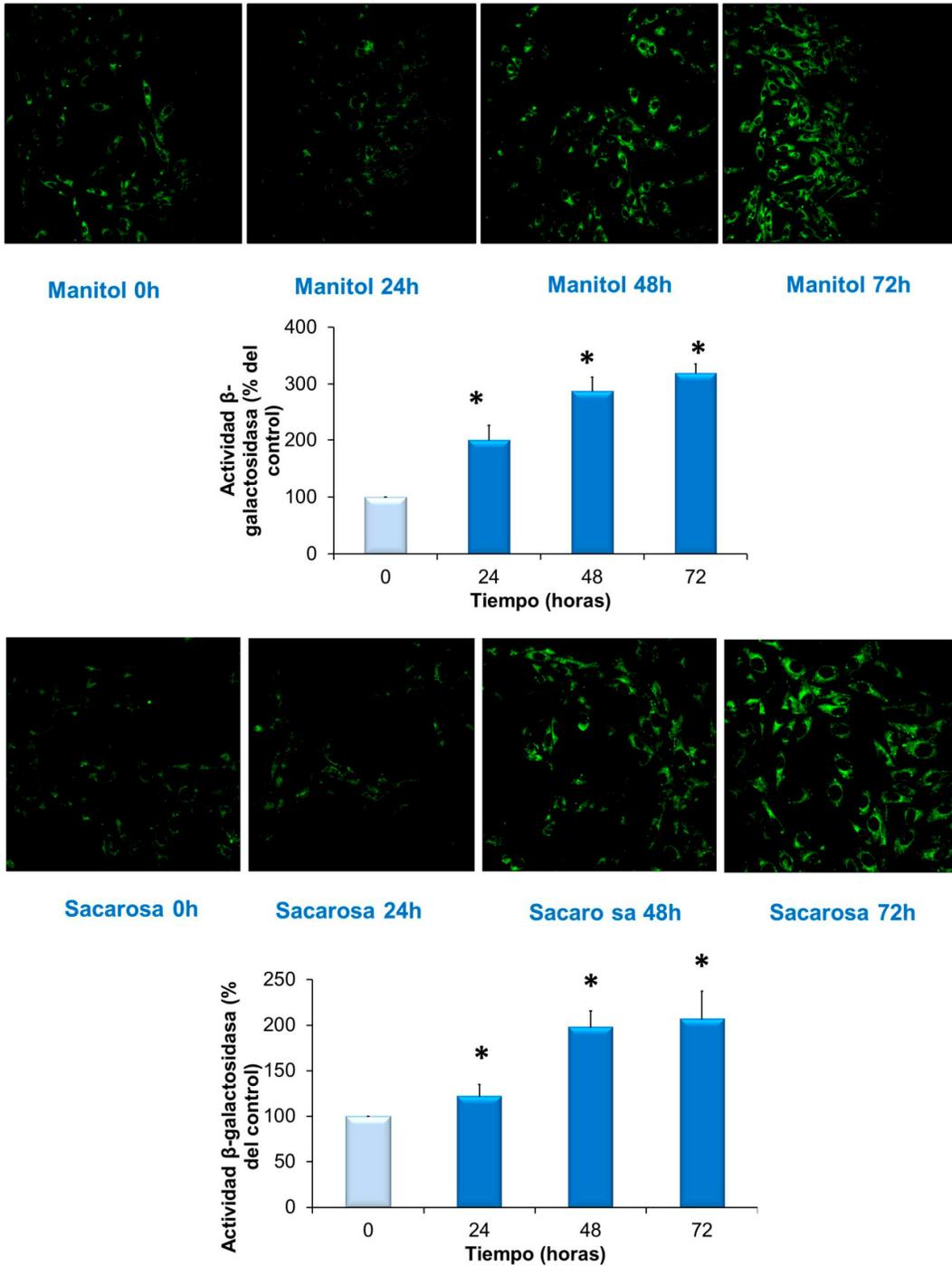


Figura 31. El manitol y la sacarosa indujeron un aumento en la actividad β-galactosidasa
 Actividad β-galactosidasa en CMH tratadas con manitol 30mM y sacarosa 30mM durante distintos periodos de tiempo, medida por microscopía confocal con sonda C₁₂FDG. En la parte superior se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la parte inferior el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

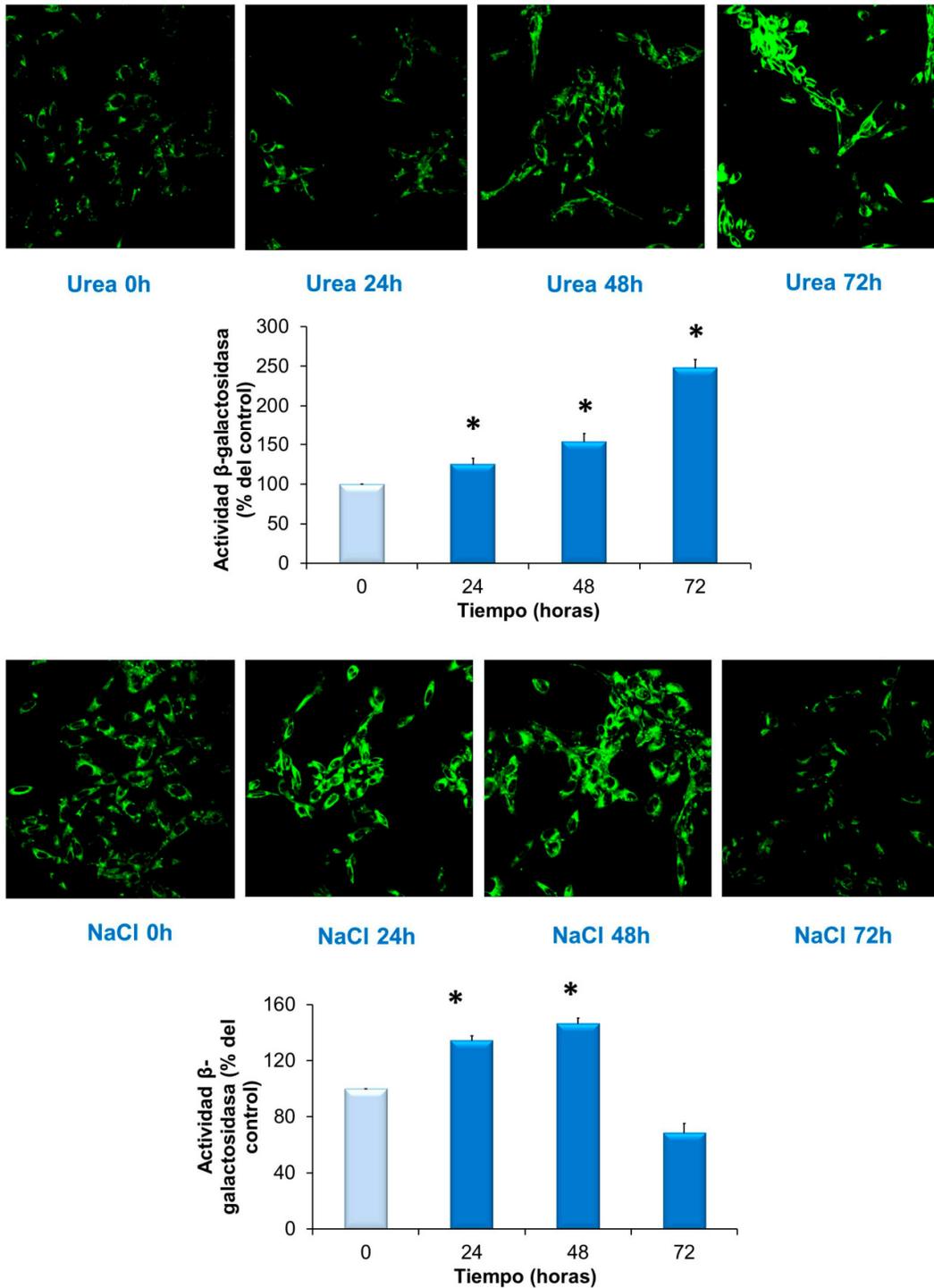


Figura 32. La urea y el NaCl promovieron un aumento en la actividad β -galactosidasa. Actividad β -galactosidasa en CMH tratadas con Urea 30mM y NaCl 9mM durante diferentes periodos de tiempos, medida por microscopía confocal con sonda C_{12} FDG. En la parte superior se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la parte inferior el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

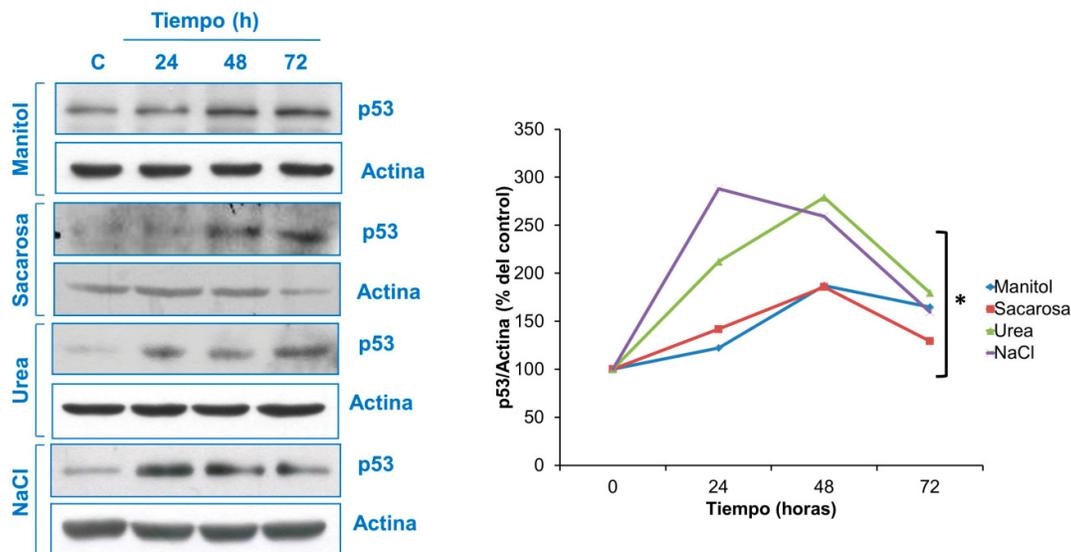


Figura 33. Diferentes sustancias osmóticamente activas indujeron un aumento en p53 Análisis de la expresión de p53 en CMH tratadas con diferentes sustancias osmóticamente activas. Estudio de la expresión proteica de p53 en CMH tratadas con manitol 30mM, sacarosa 30mM, urea 30mM y NaCl 9mM durante diferentes periodos de tiempos, determinada mediante western-blot. En la parte izquierda se muestra un blot representativo de cada tratamiento y en la parte derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control de su mismo tratamiento.

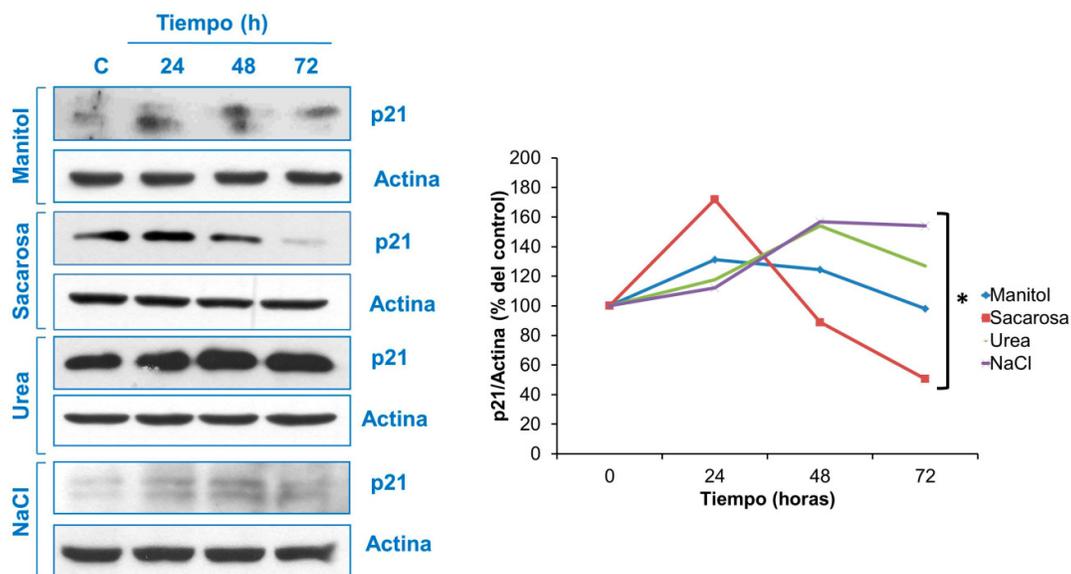


Figura 34. Distintos osmolitos indujeron la expresión de p21. Estudio de la expresión proteica de p21 en CMH tratadas con manitol 30mM, sacarosa 30mM, urea 30mM y NaCl 9mM a diferentes periodos de tiempo, determinada mediante western-blot. En la parte izquierda se muestra un blot representativo de cada tratamiento y en la parte derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control de su mismo tratamiento.

Posteriormente, se procedió a estudiar si la vía de senescencia de p16^{INK4a} pudiera estar involucrada en la senescencia celular provocada por los diferentes osmolitos añadidos. Tras el tratamiento de CMH con manitol, sacarosa y urea, se observó un aumento significativo de la expresión de p16^{INK4a} a las 24 horas de tratamiento, manteniéndose hasta las 72 horas (Figura 35). En el caso del NaCl, el aumento en p16^{INK4a} se observó también a las 24 horas de tratamiento, sin embargo, se observó una recuperación de los niveles basales de p16^{INK4a} a las 72 horas (Figura 35).

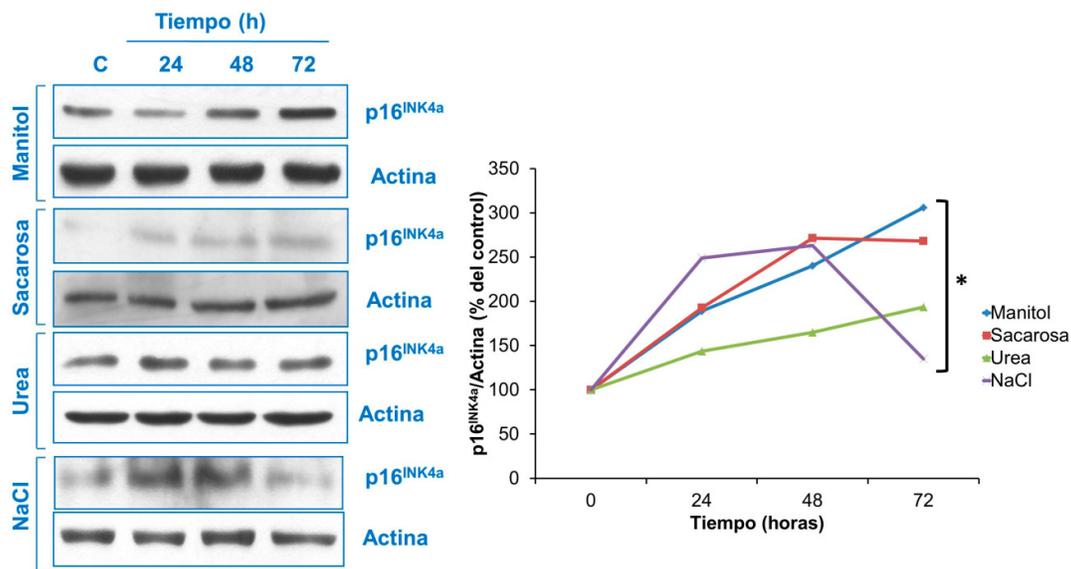


Figura 35. El tratamiento de CMH con diferentes sustancias osmóticamente activas indujo la expresión de p16^{INK4a}. Estudio de la expresión proteica de p16^{INK4a} por western-blot en CMH tratadas con manitol 30mM, sacarosa 30mM, urea 30mM y NaCl 9mM a distintos periodos de tiempo. En la parte izquierda se muestra un blot representativo de cada tratamiento y en la parte derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control de su mismo tratamiento.

1.3. EL TRATAMIENTO DE CMH CON EL OSMOLITO COMPATIBLE MYO-INOSITOL PREVINO LA SENESCENCIA CELULAR MEDIADA POR LA HG Y EL MANITOL.

Con el fin de comprobar si los efectos que la HG o diversas sustancias osmóticamente activas como el manitol pudieran ser debidos a cambios en el volumen celular, se trataron CMH con el osmolito compatible *myo*-inositol durante unos minutos

antes de añadir la HG o el manitol. El *myo*-inositol previno el aumento en la expresión de p53 y p16^{INK4a} provocado por los osmolitos (Figura 36.A y 36.B).

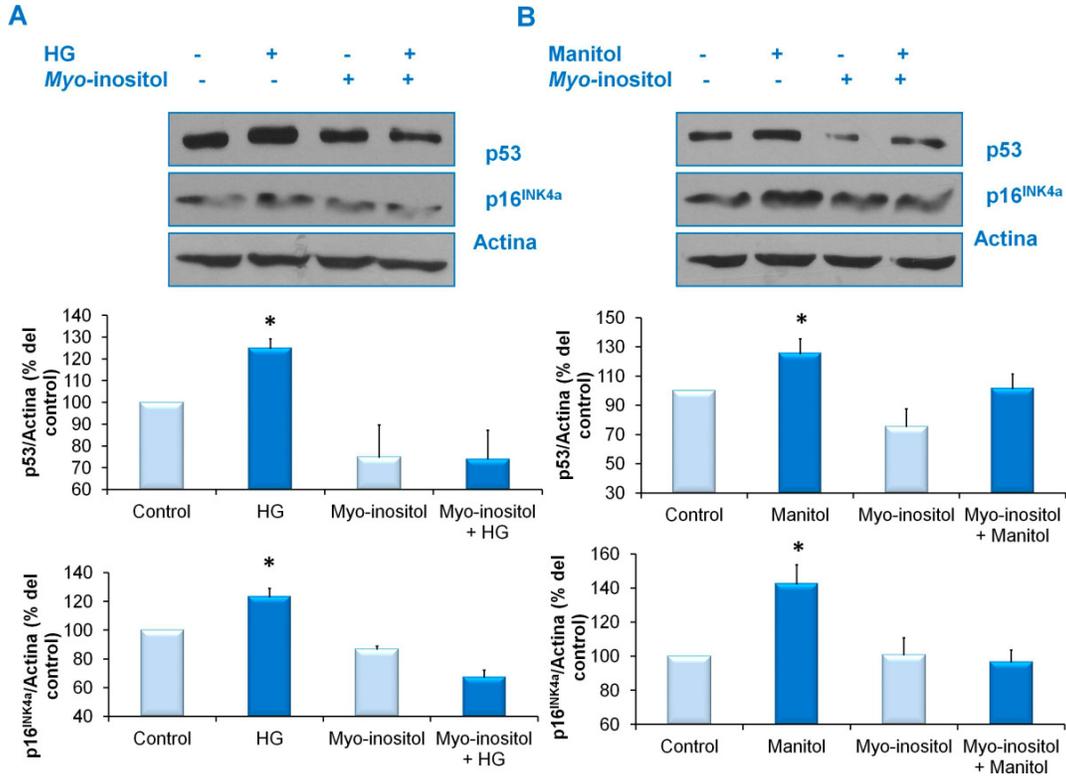


Figura 36. El tratamiento con *myo*-inositol previno el aumento en p53 y p16^{INK4a} inducido por HG y manitol. (A) Estudio de la expresión de p53 y p16^{INK4a} mediante western-blot en CMH tratadas con *myo*-inositol (1mM) junto con glucosa (30mM) o manitol (30mM) durante 24h. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Cuando se analizó la actividad β-galactosidasa en CMH tratadas con *myo*-inositol previo a la adición de HG o manitol, no se produjo el aumento esperado (Figura 37).

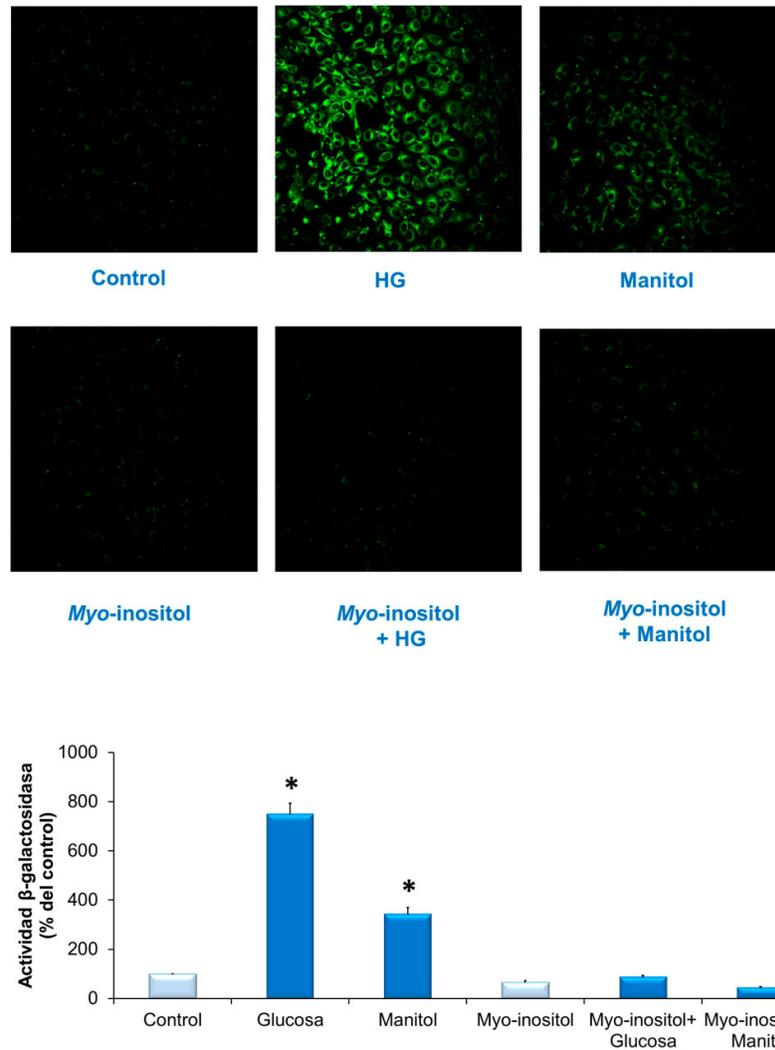


Figura 37. El tratamiento con *myo*-inositol previno el aumento en la actividad β -galactosidasa inducido por HG y manitol. Estudio de la expresión de p53 y p16^{INK4a} mediante western-blot en CMH tratadas con *myo*-inositol (1mM) junto con glucosa (30mM) o manitol (30mM) durante 24h. En la parte superior se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la parte inferior el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

1.4. LA SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS INDUCIDA POR LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y EL MANITOL FUE DEPENDIENTE DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

A continuación se procedió a estudiar los posibles mecanismos celulares implicados en la senescencia inducida por la HG y sustancias osmóticamente activas. Para los siguientes experimentos se eligió el manitol como control de estrés osmótico.

En primer lugar se analizó si el efecto sobre la senescencia celular observada en CMH con los tratamientos tanto con HG como con manitol pudiera haber sido debido a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para conocer si el tratamiento con HG y con manitol estaba produciendo un aumento de ROS, se estudió su producción mediante citometría de flujo, observándose un aumento significativo con ambos tratamientos (Figura 38).

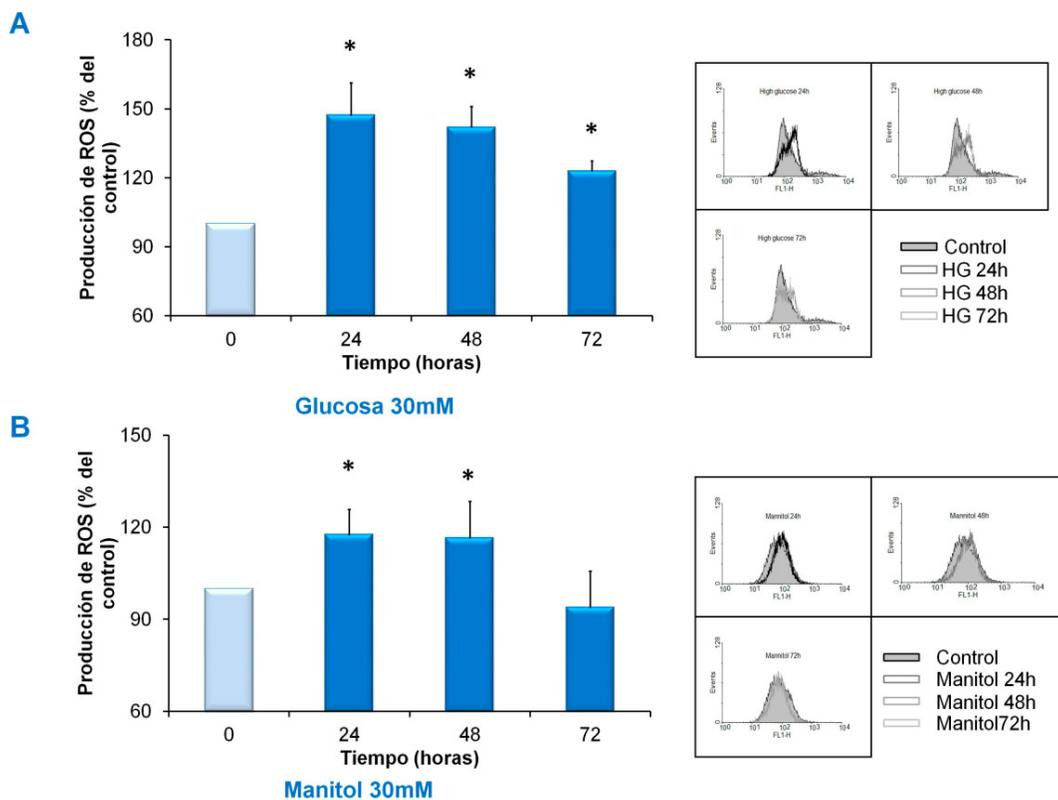


Figura 38. La HG y el manitol promovieron la producción de ROS. (A) Medida de la producción de ROS mediante citometría de flujo con sonda H₂DCFDA en CMH tratadas con glucosa 30mM y **(B)** manitol 30mM a diferentes periodos de tiempo. A la derecha se representa la gráfica de citometría de flujo de un experimento representativo y a la izquierda la media de los valores de fluorescencia de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

Para establecer una relación entre la senescencia celular inducida por la HG y el manitol en CMH y la producción de ROS, se trataron las células con un antioxidante, la N-acetil-cisteína, 15 minutos antes de añadir la HG o el manitol, durante 24h. Tras el tratamiento conjunto de NAC con HG y de NAC con manitol, no se observó un aumento significativo en la proteína p53 y de p16^{INK4a} (Figura 39).

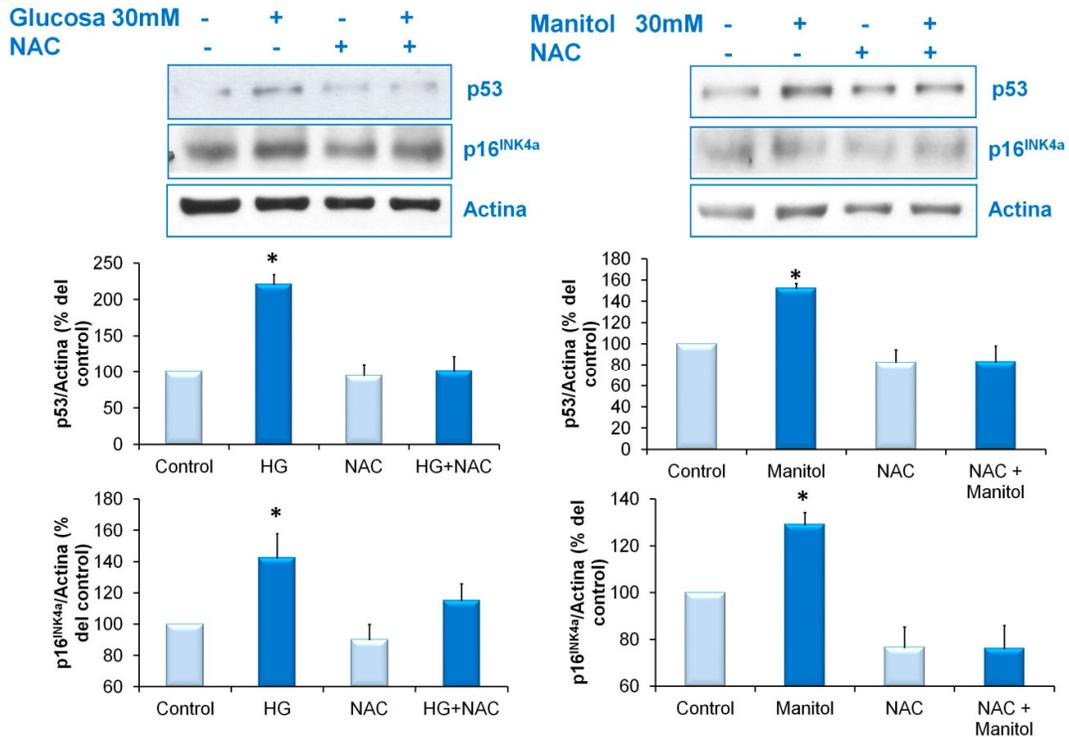


Figura 39. El tratamiento con NAC previno el aumento en p53 y p16^{INK4a} inducido por HG y manitol. Efecto del tratamiento de NAC 10mM previo a la adición de glucosa 30 mM y manitol 30 mM, durante 24 horas, sobre la expresión de p53 y p16^{INK4a}, medida mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Cuando se analizó la actividad β-galactosidasa en células previamente tratadas con NAC junto con HG o manitol, se observó que no se inducía senescencia (Figura 40).

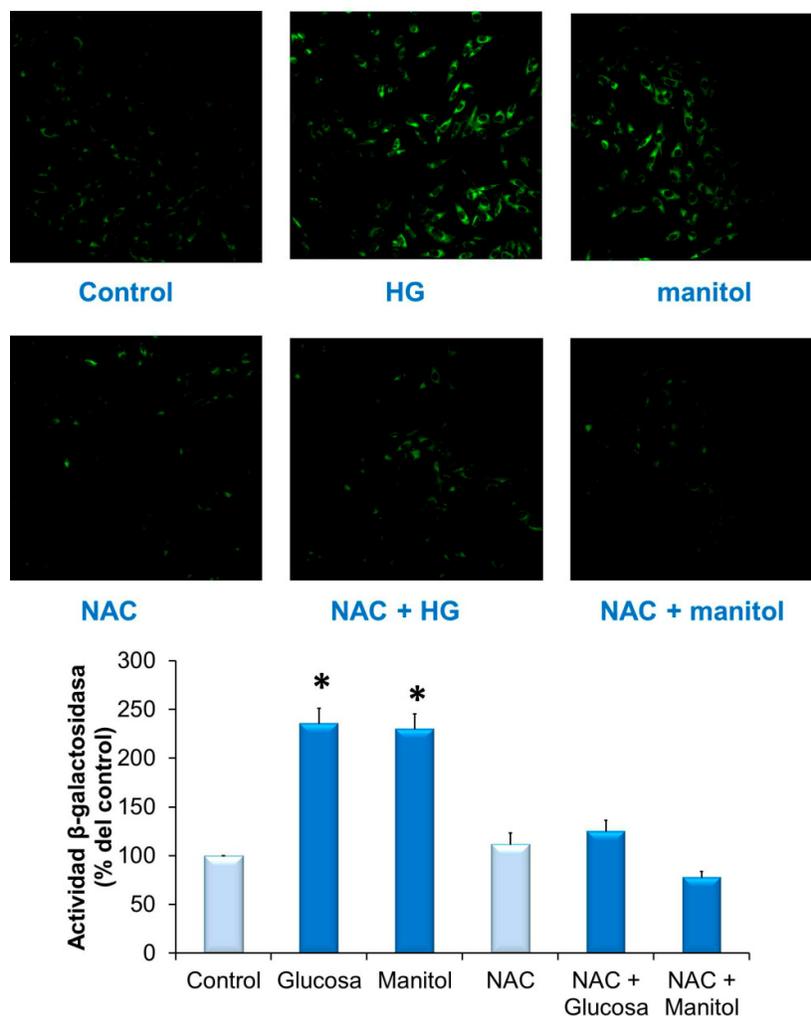


Figura 40. El tratamiento con NAC previno el aumento en la SA-β-Gal inducida por HG y manitol
 Actividad β-galactosidasa en CMH tratadas con glucosa 30 mM y manitol 30mM junto con NAC 10mM durante 24 horas, medida por microscopía confocal con sonda C₁₂FDG. En la parte superior se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

1.5. EL TRATAMIENTO CON ALTA GLUCOSA Y MANITOL INDUJO LA ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE RAS EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS.

Como posible mecanismo inductor de la producción de radicales libres se estudió la activación de Ras, un mecanismo bien demostrado de senescencia prematura, en CMH tratadas con HG y Manitol. Se observó un aumento significativo de

la activación de Ras a las 2 horas de tratamiento, sin embargo, apareció un descenso en su activación a las 8 horas que se recuperó a las 24 horas, tanto en las CMH tratadas con HG como con manitol (Figura 41).

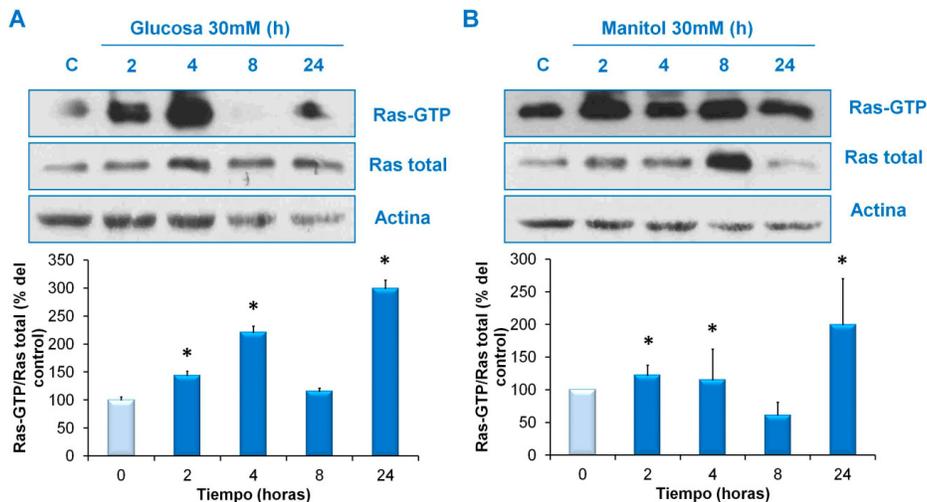


Figura 41. La HG y el manitol promovieron la activación de Ras. (A) Media de la actividad de Ras (Ras-GTP) mediante ensayo de pull-down en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30mM a distintos tiempos y analizado mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

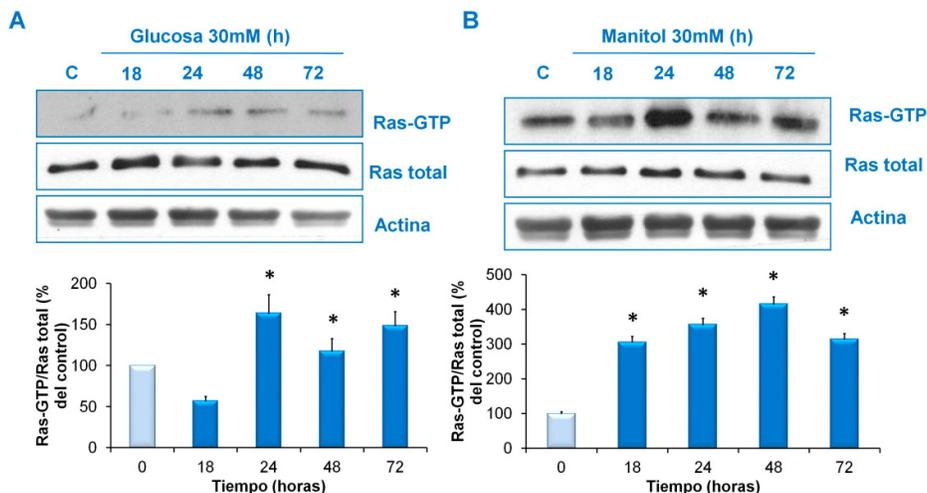


Figura 42. El tratamiento prolongado con HG y manitol indujo la activación constitutiva de Ras. (A) Media de la actividad de Ras (Ras-GTP) mediante ensayo de pull-down en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30mM a diferentes periodos de tiempo y analizado mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Cuando se analizó la activación de Ras en CMH tratadas con HG y manitol a tiempos más largos, se observó un aumento significativo de dicha activación, mantenida hasta las 72 horas, tras ambos tratamientos (Figura 42).

Para comprobar si la activación de Ras pudiera estar implicada en la senescencia celular inducida por HG y manitol, se trataron CMH con un inhibidor de la farnesilación de Ras (FPTIII) 15 minutos antes de la adición de HG o manitol. Este inhibidor bloqueó el aumento observado en p53 y p16^{INK4a} tras el tratamiento con los osmolitos (Figura 43).

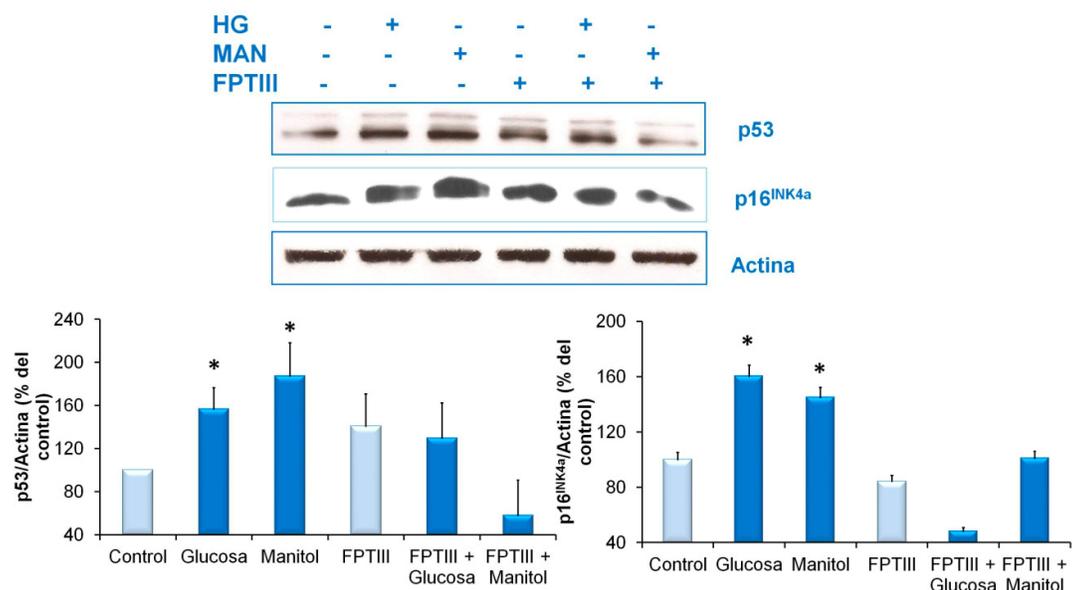


Figura 43. El tratamiento con FPTIII previno el aumento en p53 y p16^{INK4a} inducido por HG y manitol. Medida de la expresión de p53 y p16^{INK4a} en CMH tratadas con FPTIII (2,5µM) y glucosa 30mM o manitol 30mM durante 24h mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Posteriormente se analizó la actividad β-galactosidasa en CMH tratadas con FPTIII y alta glucosa o manitol, observándose que no se inducía senescencia en presencia del inhibidor de Ras (Figura 44).

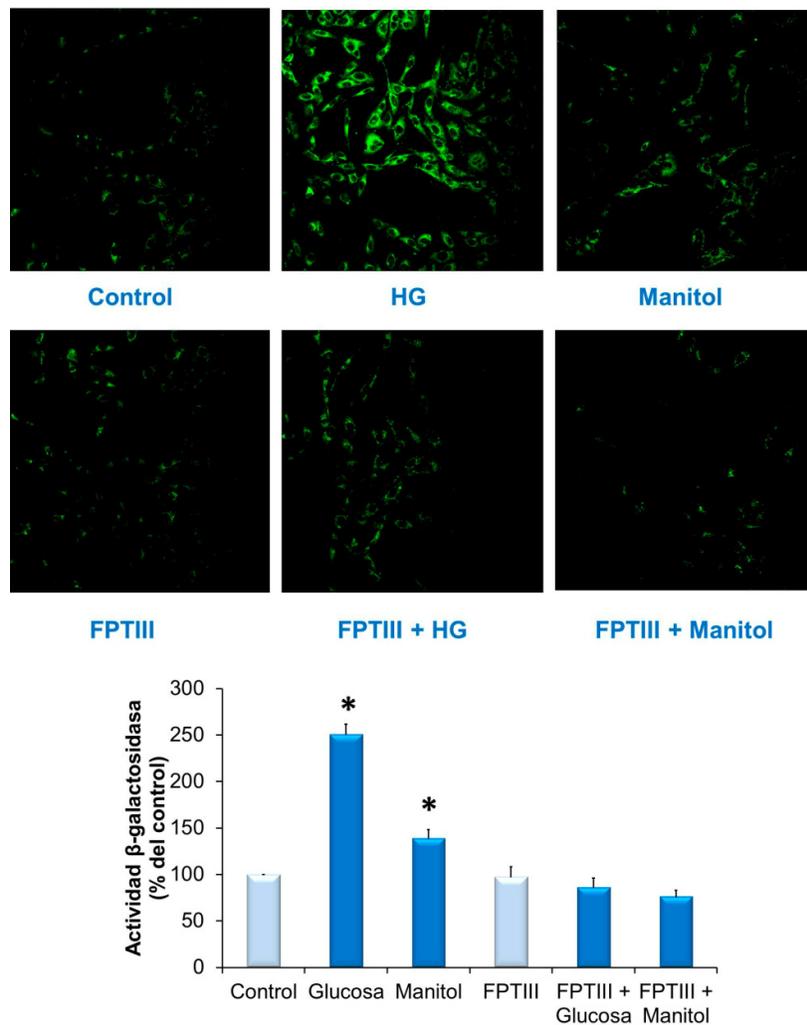


Figura 44. El tratamiento con FPTIII previno el aumento en la actividad β-galactosidasa inducida por HG y manitol. Actividad β-galactosidasa en CMH tratadas con glucosa 30 mM y manitol 30mM junto con FPTIII 2,5 μM durante 24 horas, medida por microscopía confocal con sonda C₁₂FDG. En la parte izquierda se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

1.6. LA SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA POR HG Y MANITOL FUE DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK ERK1/2 Y p38.

Una de las principales vías que se activan a través Ras es la de la MAPK Erk1/2. Por ello, se procedió a estudiar esta vía en las CMH tratadas con HG y manitol. Se observó un aumento significativo de la activación de Erk1/2 (p-Erk1/2) a partir de

las 4 horas de tratamiento con HG, que se mantuvo hasta las 24 horas (Figura 45.A). Tras la administración de manitol, se observó un aumento significativo en la activación de Erk1/2 a partir de las 4 horas de tratamiento, habiendo un descenso a las 24 horas (Figura 45.B).

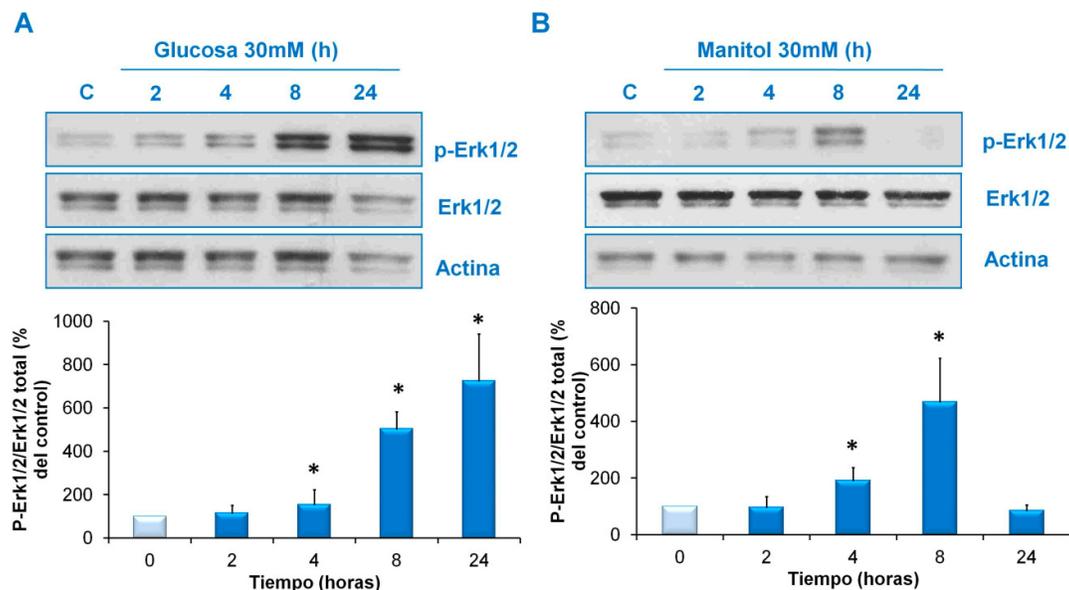


Figura 45. La HG y el manitol promovieron la activación de Erk1/2 en CMH. (A) Medida de la actividad de Erk1/2 mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30 mM a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

Cuando se estudió la activación de Erk1/2 a tiempos más largos en CMH tratadas con HG se observó que el aumento observado a las 24 horas de tratamiento, se mantuvo hasta las 72 horas (Figura 46.A). Con respecto al tratamiento con manitol, se observó un aumento significativo en la activación de Erk1/2 que se mantuvo hasta las 72 horas de tratamiento (Figura 46.B).

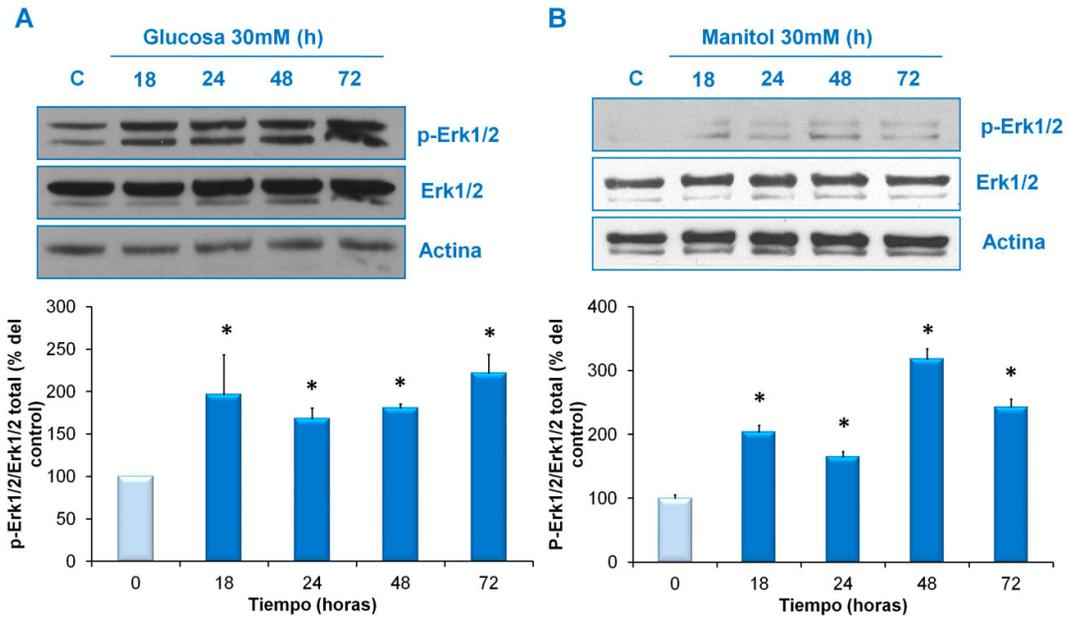


Figura 46. El tratamiento prolongado con HG y manitol indujo la activación constitutiva de Erk1/2. (A) Medida de la actividad de Erk1/2 mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30 mM a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

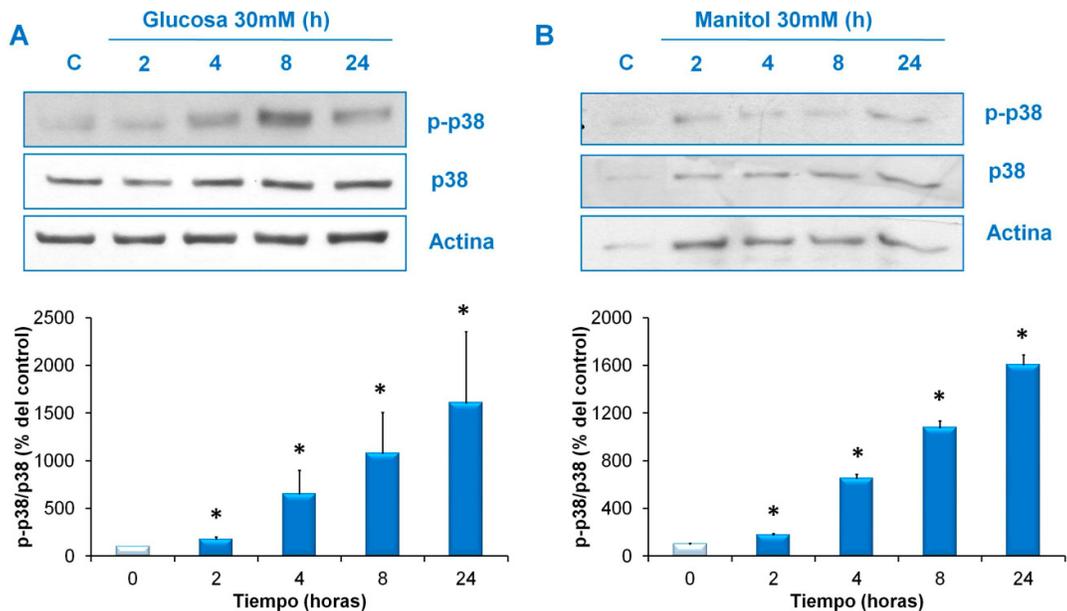


Figura 47. La HG y el manitol aumentaron la activación de p38 en CMH. (A) Medida de la actividad de p38 mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30mM a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0.05$ vs control.

Por otro lado, se analizó la activación de p38 en CMH tratadas con HG y manitol, observándose un aumento significativo a partir de las 2 horas de tratamiento, en ambos tratamientos, y que se mantuvo hasta las 24 horas (Figura 47.A y 47.B).

Cuando se estudió la activación de p38 a tiempos más largos, se observó un aumento significativo a partir de las 18 horas de tratamiento con HG. Dicha activación se mantuvo hasta que a las 72 horas se observó un descenso significativo (Figura 48.A). En cuanto al tratamiento con manitol, el aumento en la activación de p38 se observó a partir de las 24 horas de tratamiento y no se observó ningún descenso hasta las 72 horas. (Figura 48.B).

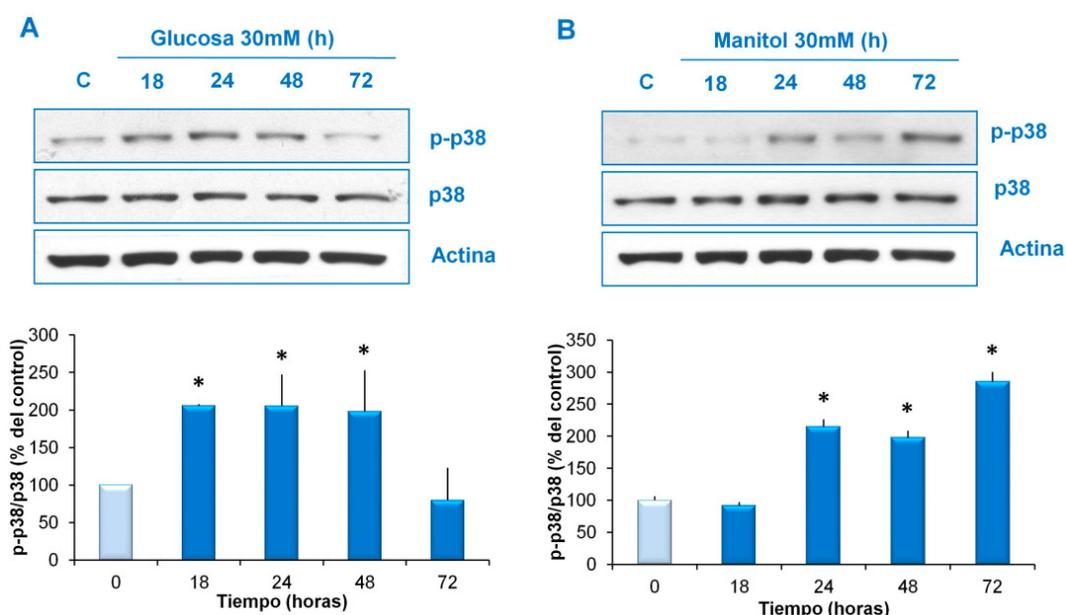


Figura 48. El tratamiento prolongado con HG y manitol promovió la activación constitutiva de p38. (A) Medida de la actividad de p38 mediante western-blot en CMH tratadas con glucosa 30mM y (B) manitol 30 mM a distintos intervalos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

Para comprobar si la activación de las MAPK Erk1/2 y p38 fue la responsable de la senescencia inducida por el tratamiento de CMH con HG y manitol, se trataron las células con un inhibidor farmacológico de la activación de Erk1/2 (PD98059) y de la de p38 (SB203580) 15 minutos antes a la adición de HG o manitol. Tras el tratamiento conjunto de CMH con HG y PD, se observó que no había aumento significativo en la expresión de p53 y de p16^{INK4a}. En cuanto al tratamiento con HG y SB, apareció un aumento significativo en la expresión de p53, pero no en la de p16^{INK4a} (Figura 49.A).

Los mismos resultados se obtuvieron tras el tratamiento conjunto de manitol con PD y SB (Figura 49.B).

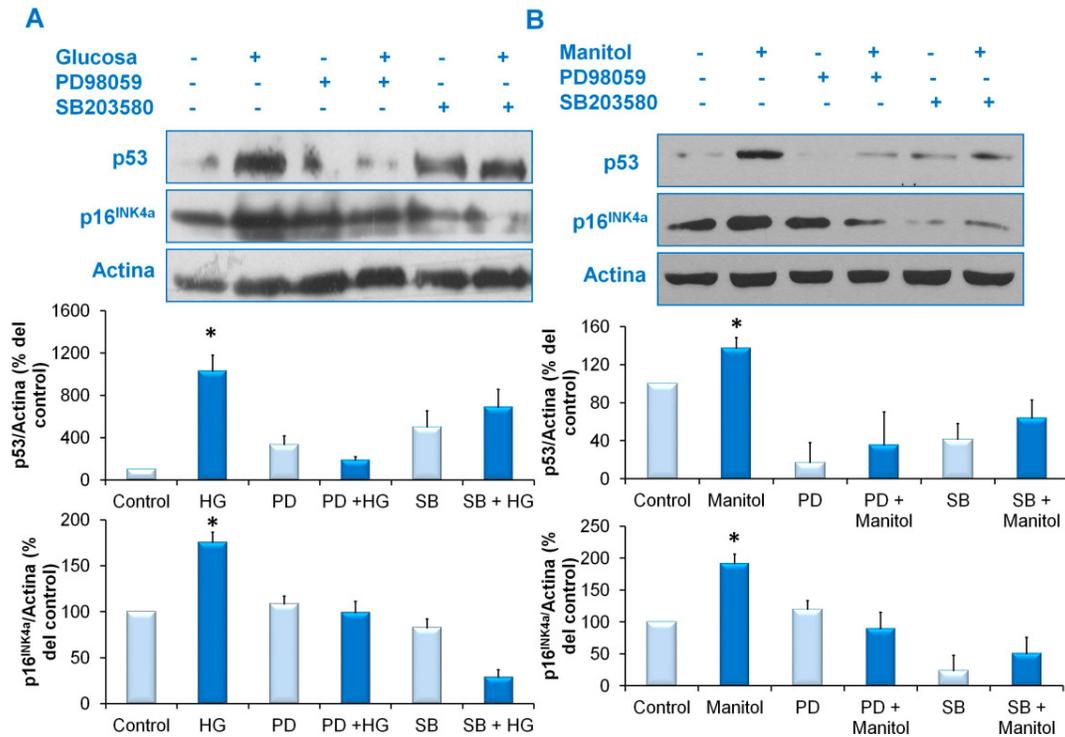


Figura 49. El tratamiento con inhibidores de Erk1/2 y p38 previnieron el aumento en p53 y p16^{INK4a} inducidos por HG y manitol. (A) Estudio de la expresión de p53 y p16^{INK4a} mediante western-blot en CMH tratadas con PD98059 50µM y SB203580 25µM y glucosa 30 mM y **(B)** manitol 30 mM. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Con el fin de prevenir los efectos que la HG o el manitol pudieran estar provocando sobre el volumen celular, se trataron previamente CMH con el osmolito compatible *myo*-inositol. La activación de Ras inducida por HG y manitol se revirtió en presencia del osmolito compatible *myo*-inositol. Lo mismo ocurrió con la activación de Erk1/2 (Figura 50.A y 50.B).

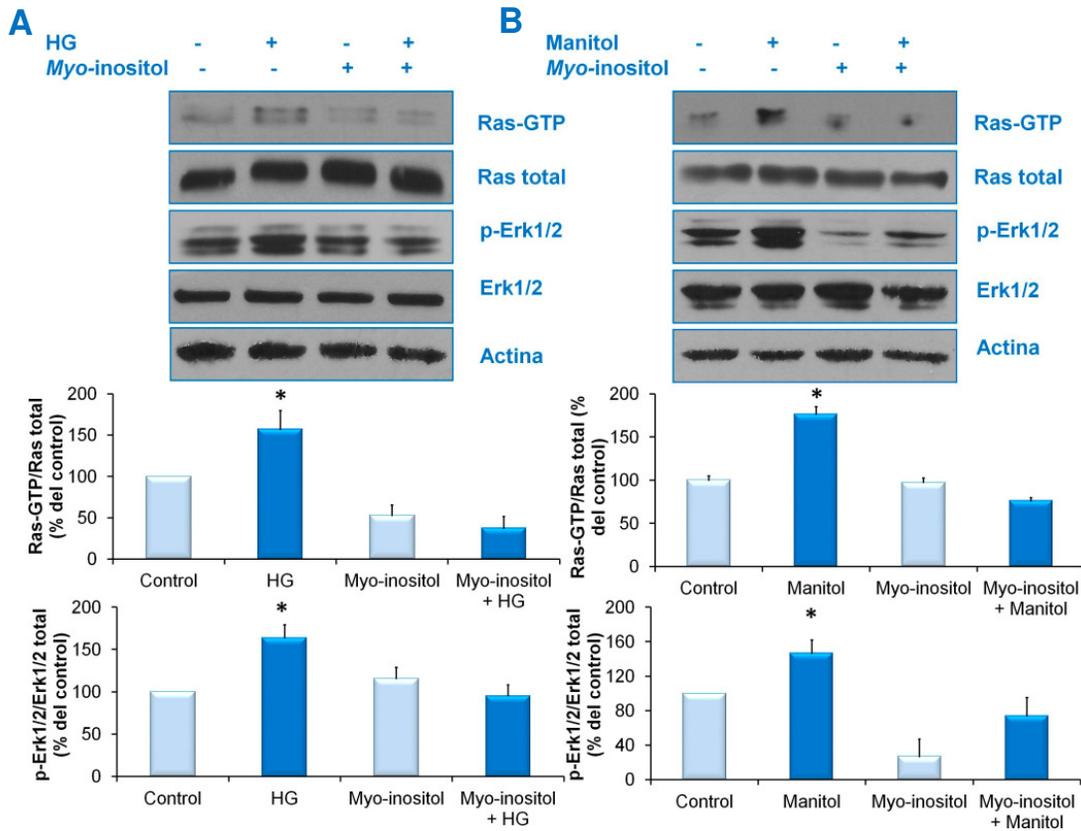


Figura 50. El tratamiento con *myo*-inositol previno el aumento en la activación de Ras y Erk1/2 inducidas por HG y manitol. (A) Estudio de la activación de Ras (Ras-GTP) mediante ensayo de pull-down y de Erk1/2 (p-Erk1/2) por western-blot y p16^{INK4a} mediante western-blot en CMH tratadas con *myo*-inositol (1mM) junto con glucosa (30mM) o (B) manitol (30mM) durante 24h. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0.05 vs control.

1.7. LAS RATAS DIABÉTICAS Y LAS RATAS TRATADAS CON MANITOL PRESENTAN UN AUMENTO EN LA OSMOLARIDAD PLASMÁTICA Y UNA ELEVACIÓN EN LOS NIVELES DE p53 Y p16 EN LA CORTEZA RENAL.

Para completar los resultados in vitro, se procedió a estudiar los efectos de la alta glucosa y el estrés osmótico sobre la senescencia de las células renales en un modelo animal en ratas wistar. Para ello, se hicieron tres grupos

- **Grupo control:** Animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

- **Grupo Diabético:** Se indujo diabetes en ratas wistar mediante inyección con estreptozotocina.
- **Grupo Manitol:** Se les administró manitol intraperitoneal con el fin del aumentar la osmolaridad plasmática de estos animales.

La finalidad de estos experimentos *in vivo* fue comparar los efectos de la diabetes y el estrés osmótico sobre la función renal y la expresión de proteínas relacionadas con la senescencia celular.

| Parámetros | Grupo control (n = 6) | Grupo tratado con Estreptozotocina (n = 6) | Grupo tratado con Manitol (n = 6) |
|--|-----------------------|--|-----------------------------------|
| Glucemia (mg/dl) | 64,75 ± 28,6 | 8995 ± 2499 * | 10 ± 0 * |
| Osmolaridad plasmática (mOsm/kg) | 273 ± 6 | 326 ± 6,09 * | 311,33 ± 5,8 * |
| Creatinina sérica (mg/dl) | 0,49 ± 0,02 | 0,55 ± 0,01 | 0,47 ± 0,03 |
| Diuresis (ml 24 hours) | 16,5 ± 5,56 | 149,03 ± 13,60 * | 16,63 ± 2,21 |
| Glucosa en orina (mg/min) | 0,61 ± 0,08 | 916,14 ± 131,05 * | 0,31 ± 0,06 |
| Aclaramiento de creatinina (ml/min x kg) | 4,95 ± 0,29 | 10,23 ± 5,83 | 5,69 ± 1,30 |
| Proteínas en orina (mg 24h) | 268,23 ± 7,69 | 155,67 ± 21,81 * | 233,05 ± 17,34 |

Tabla 7. * p> 0,05 respecto al grupo control

En primer lugar, se realizaron diferentes determinaciones bioquímicas en la sangre y la orina de estos animales con el fin de estudiar tanto los cambios en la osmolaridad plasmática como en la función renal. El grupo de ratas diabéticas presentó un aumento significativo de la glucosa en sangre, la glucosa en orina y la diuresis, características que indican que el tratamiento con estreptozotocina ha

funcionado correctamente, ya que se trata de cualidades típicas en la diabetes. Cuando se analizó la osmolaridad plasmática de estos animales, se observó un incremento significativo con respecto al grupo control, lo que indicaba que en la diabetes ocurre un aumento en la osmolaridad plasmática. El grupo tratado con manitol, presentó también un aumento en la osmolaridad plasmática, indicando que el tratamiento con manitol había ejercido el efecto esperado. Hay que destacar que el aumento en la osmolaridad en el grupo diabético fue superior.

En cuanto a la función renal, las ratas tratadas con estreptozotocina presentaron una disminución en las proteínas en orina, observándose un aumento en el aclaramiento de creatinina no significativo. El grupo tratado con manitol, no presentó diferencias en la función renal con respecto al grupo control (Tabla 7).

Cuando se estudió la expresión de p53 en estos animales, se observó un aumento significativo en la expresión proteica de p53 en el extracto de proteínas de la corteza renal en los animales diabéticos, sin embargo, la expresión de p53 en el grupo manitol no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 51.A).

Cuando se analizó la expresión de p53 mediante técnicas de inmunohistoquímica, se observó un aumento significativo en la expresión de p53 en los animales diabéticos, presentándose una mayor tinción en la zona glomerular. En el caso del grupo manitol, también presentó un aumento significativo en la expresión de p53 con respecto al grupo control aunque este aumento no fue tan alto como el observado en las ratas diabéticas (Figura 51.B).

Al estudiarse la expresión de p16^{INK4a} mediante western-blot, se observó un aumento significativo de la expresión de la proteína en el grupo diabético, mientras que el grupo manitol no presentó un aumento significativo de su expresión cuando se comparó con el grupo control (Figura 52.A).

Al analizar la expresión de p16^{INK4a} mediante técnicas de inmunohistoquímica, se observó un aumento significativo en la cantidad de p16^{INK4a} en las ratas tratadas con estreptozotocina, cuando se comparó con el grupo control. En el caso de los animales a los que se les administró manitol, se observó un aumento en la expresión de p16 concentrada en la zona glomerular (Figura 52.B).

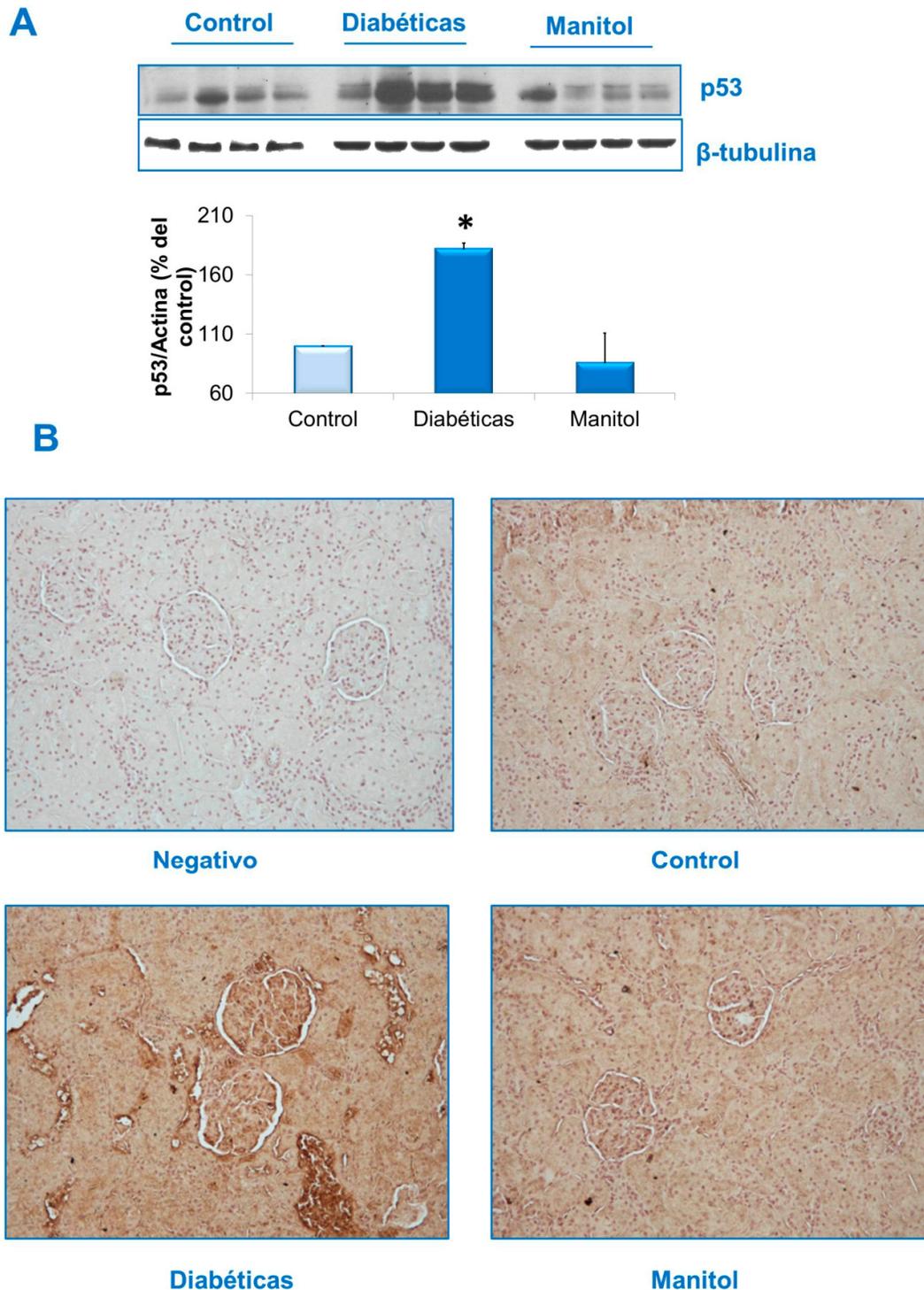


Figura 51. Los animales diabéticos y manitol presentaron aumentada la expresión de p53. (A) Análisis de la expresión de p53 en el extracto proteico de corteza renal de ratas control, ratas tratadas diabéticas y ratas tratadas con manitol. En la parte superior se muestra una blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los animales. Los resultados son la media \pm error estándar de seis animales por grupo experimental. * $p < 0,05$ vs control. **(B)** Expresión de p53 mediante técnicas de inmunohistoquímica en cortes de corteza renal de ratas control, ratas diabéticas y ratas manitol. En todos los casos se muestra una imagen representativa.

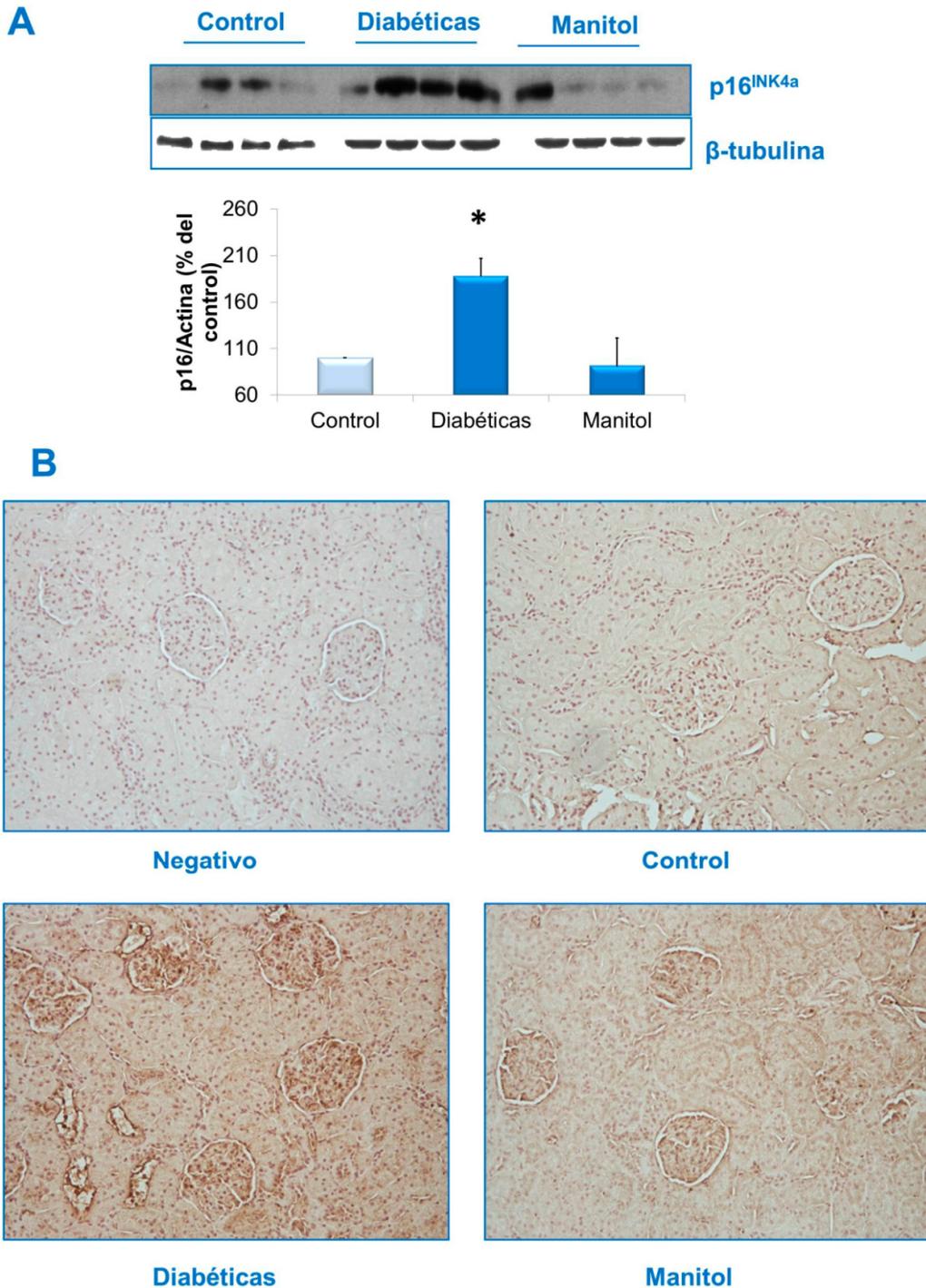


Figura 52. Las ratas diabéticas y manitol presentaron un aumento en la expresión de p16^{INK4a} a nivel renal. (A) Análisis de la expresión de p16^{INK4a} en el extracto proteico de corteza renal de ratas control, ratas tratadas diabéticas y ratas tratadas con manitol. En la parte superior se muestra una blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los animales. Los resultados son la media ± error estándar de seis animales por grupo experimental. * p < 0,05 vs control. **(B)** Expresión de p16 mediante técnicas de inmunohistoquímica en cortes de corteza renal de ratas control, ratas diabéticas y ratas manitol. * p < 0,05 respecto del grupo control. En todos los casos se muestra una imagen representativa.

En resumen

- Las altas concentraciones de glucosa indujeron senescencia celular en células mesangiales humanas mediante el aumento en la osmolaridad plasmática. Tanto las vías de senescencia de p53-p21 como la de p16^{INK4a} estuvieron implicadas en este proceso.
- La senescencia inducida por altas concentraciones de glucosa y manitol fue dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno.
- La activación de Ras y las MAPK Erk1/2 y p38 fueron responsables de la senescencia celular inducida por las altas concentraciones de glucosa y manitol (Figura 53).
- Los animales diabéticos y los tratados con manitol presentaron un aumento en la osmolaridad plasmática así como un aumento en la expresión de p53 y p16^{INK4a} en la corteza renal.

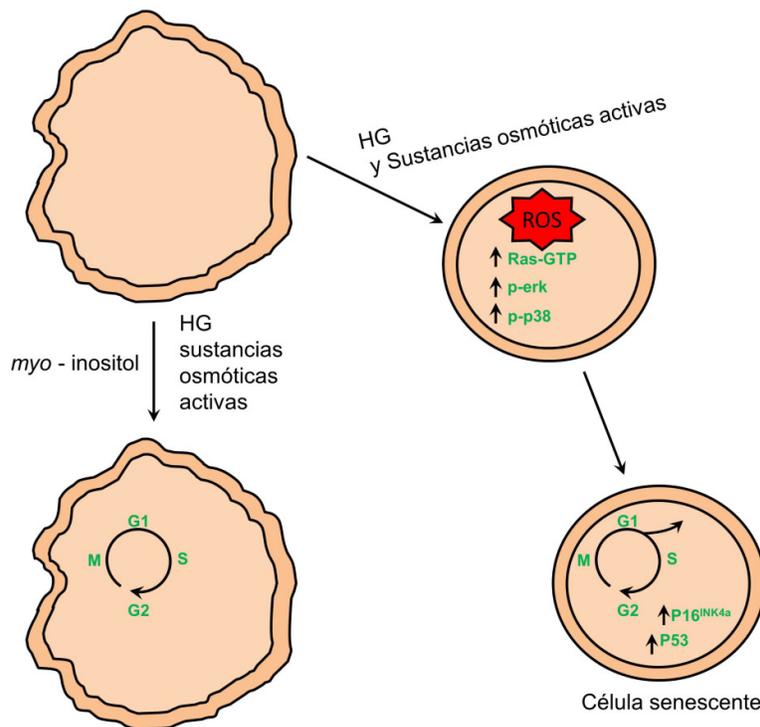


Figura 53. Esquema representativo de los efectos de la HG y las sustancias osmóticamente activas sobre la célula mesangial. La HG y las sustancias osmóticamente activas promueven un descenso en el volumen celular a través de un aumento en la producción en ROS, activando las proteínas Ras, Erk1/2 y p38. Esto provoca la parada de ciclo celular a través del aumento en la expresión de p16^{INK4a} y p53, induciendo senescencia. El pre-tratamiento con *myo*-inositol previene los efectos de la HG y las sustancias osmóticamente activas sobre la senescencia celular.

2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE GLICOSILACIÓN AVANZADA SOBRE LA SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS: MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS

2.1. LA ALBÚMINA GLICOSILADA INDUJO SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS A TRAVÉS DE LA VÍA DE p53

La albúmina glicosilada (AG) es el producto de glicosilación avanzada más abundante en sangre. Su concentración es elevada en el suero de pacientes con diabetes mellitus y en otras patologías relacionadas con el envejecimiento (Chen, S. y col 2000; Margo, P. y col 2006

Para conocer si la AG pudiera inducir senescencia celular, se trataron CMH con 100 $\mu\text{g/ml}$ de AG a diferentes tiempos en ausencia de suero fetal bovino. Mediante tinción con β -gal se analizó la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia observándose un aumento de la senescencia a las 24h de tratamiento, que se mantuvo hasta las 72h. No se observó senescencia a tiempos inferiores a las 24h (Figura 54).

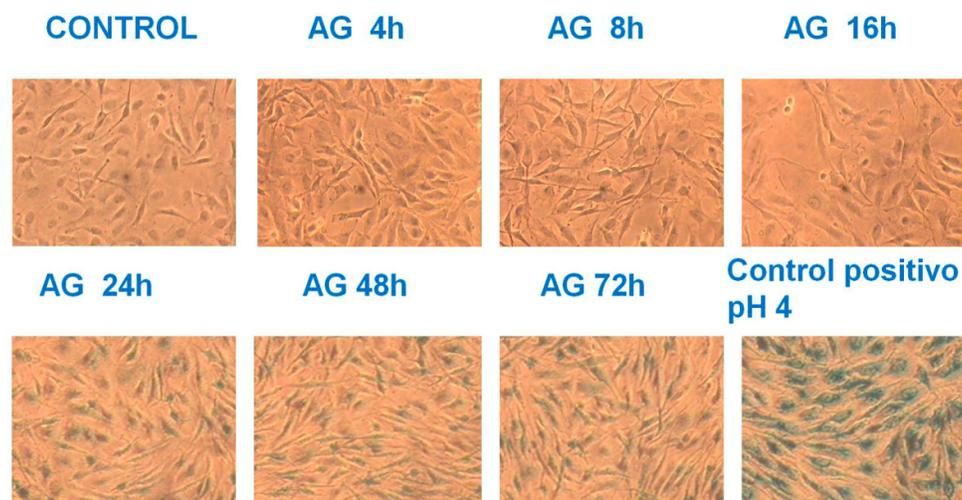


Figura 54. La AG aumentó la actividad β -galactosidasa. Actividad β -galactosidasa en CMH tratadas con AG 100 $\mu\text{g/ml}$ durante diferentes periodos de tiempo medida mediante tinción X-gal. En todos los casos se muestra una imagen representativa

Para corroborar este resultado, se midió la senescencia celular mediante citometría de flujo utilizando el sustrato fluorescente C_{12}FDG , obteniéndose el mismo resultado (Figura 55).

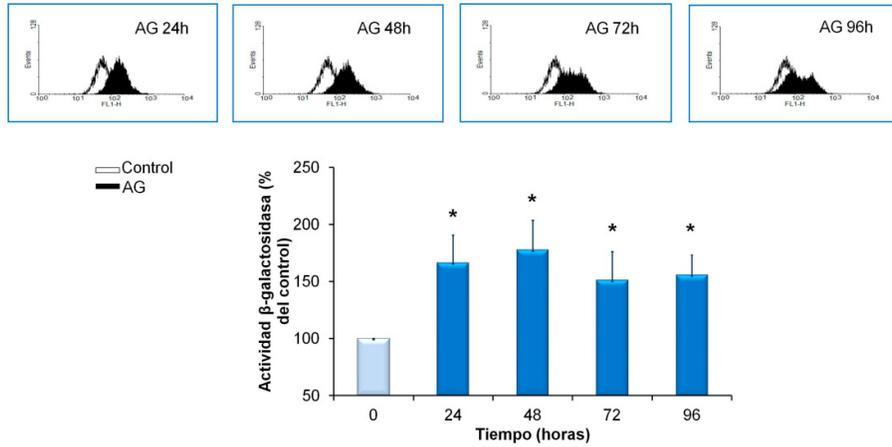


Figura 55. La AG promovió un aumento en la actividad β -galactosidasa. Actividad β -galactosidasa en CMH tratadas con AG 100 μ g/ml a diferentes periodos de tiempo medida mediante citometría de flujo con sustrato fluorescente C₁₂FDG 33 μ M. En la parte superior se representan las gráficas de citometría de flujo de un experimento representativo y abajo la media de los valores de fluorescencia de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

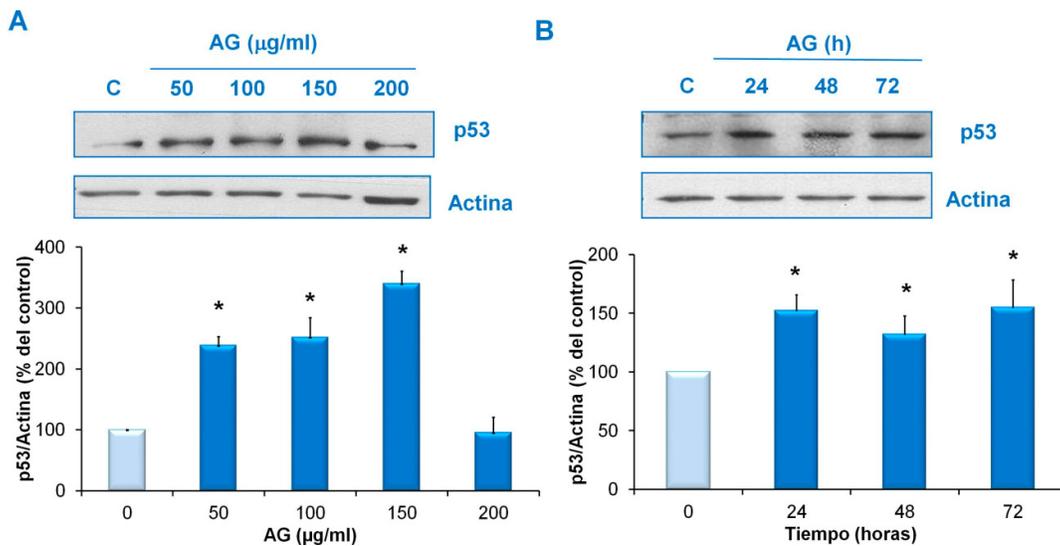


Figura 56 La AG indujo la expresión de p53 de manera tiempo y dosis-dependiente. (A) Estudio de la expresión proteica de p53 mediante western-blot en CMH durante experimento dosis-respuesta a 24h de tratamiento. **(B)** Estudio de la expresión de p53 en experimento tiempo-respuesta con una concentración de AG de 100 μ g/ml. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

La senescencia podría estar inducida por diferentes vías por lo que se analizó cuál pudiera estar involucrada en el efecto de la AG. En primer lugar, se estudió la vía de p53, realizándose experimentos con diferentes dosis de AG y a diferentes tiempos (Figuras 56.A y 56.B). El tratamiento con AG produjo un aumento en la expresión de p53 de manera dosis- y tiempo-dependiente

Para conocer si el aumento de p53 estaba activando vías de senescencia, se estudió la expresión proteica de p21, observándose un aumento significativo a partir de las 24h de tratamiento con AG (Figura 57).

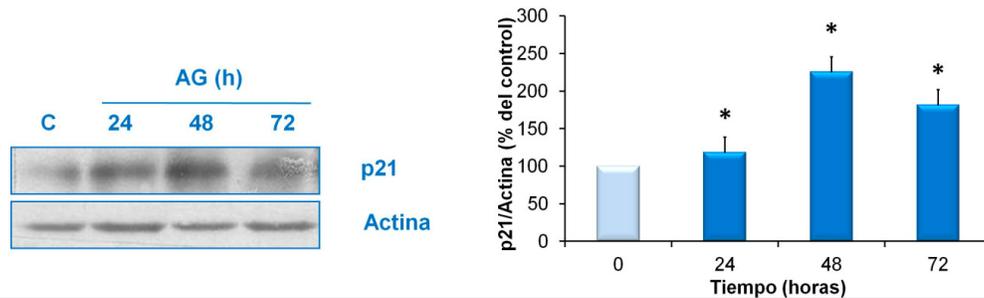


Figura 57. La AG promovió la expresión de p21. Expresión proteica de p21 en experimento tiempo-respuesta a una concentración de AG de 100 $\mu\text{g/ml}$ estudiada mediante western-blot. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

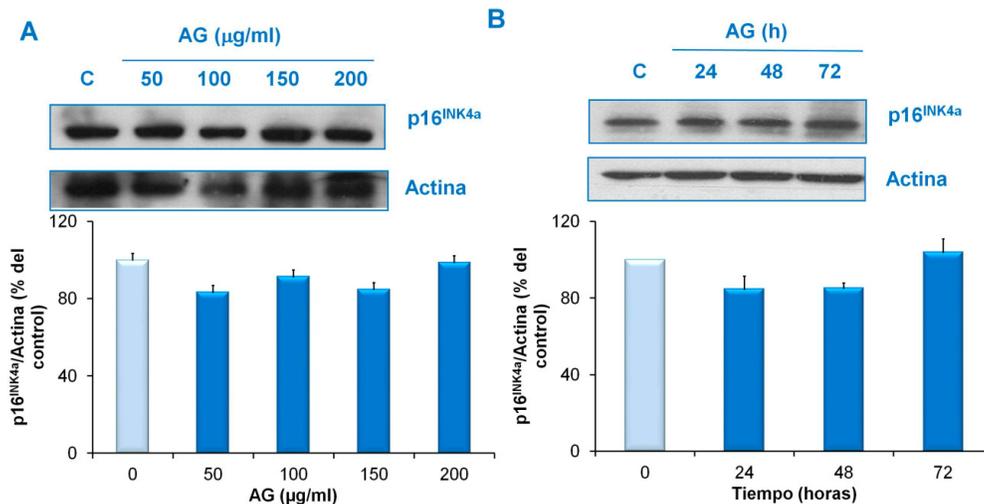


Figura 58. La AG no produjo cambios en la expresión de p16^{INK4a}. (A) Estudio de la expresión de p16^{INK4a} mediante western-blot en experimento dosis-respuesta con AG durante 24h y (B) tiempo respuesta con 100 $\mu\text{g/ml}$ de AG, respectivamente. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control.

A continuación se analizó el papel de p16^{INK4a} en la senescencia celular inducida por AG, realizándose experimentos tanto dosis- como tiempo-respuesta en presencia de AG (Figuras 58.A y 58.B). No se observaron diferencias significativas en la expresión de p16^{INK4a} en ninguno de los dos experimentos indicados.

2.2. LA ALBÚMINA GLICOSILADA INDUJO SENESCENCIA CELULAR A TRAVÉS DE SU INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR DE PRODUCTOS DE GLICOSILACIÓN AVANZADA (RAGE)

Para comprobar si el aumento en p53 provocado por la albúmina glicosilada no era debido al efecto oncótico de la propia albúmina, se trataron CMH con albúmina humana no glicosilada (ANG) (Figura 59), no observándose diferencias significativas en la expresión de p53.

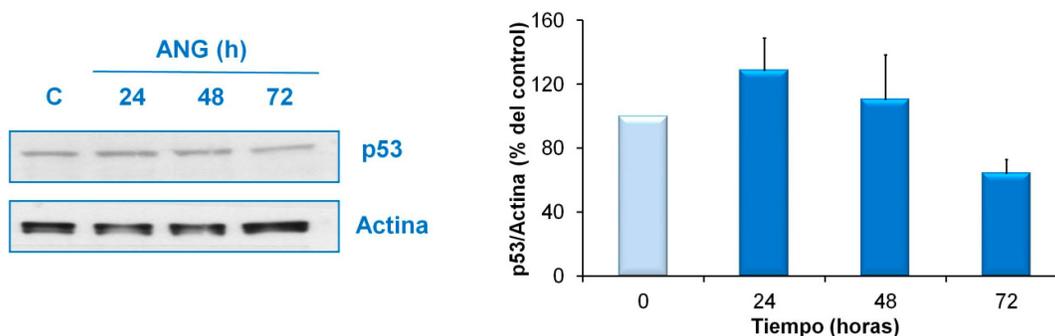


Figura 59. El tratamiento con ANG no indujo cambios en la expresión de p53. Estudio de la expresión de p53 mediante western-blot en CMH tratadas con ANG 100µg/ml a diferentes periodos de tiempo. A la izquierda se muestra un blot representativo ya la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Con el propósito de estudiar si el efecto de la albúmina glicosilada sobre las CMH era debido a su interacción con el receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE), se procedió a inhibir la interacción de la albúmina glicosilada con RAGE mediante dos mecanismos. El primero, mediante la preincubación con un anticuerpo bloqueante anti-RAGE, impidiendo la unión física ligando-receptor. Dicho anticuerpo bloqueó el aumento en p53 tras el tratamiento con AG (Figura 60).

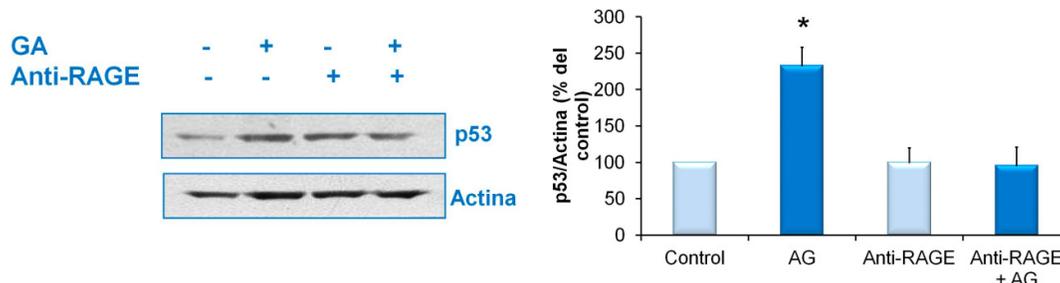


Figura 60. El bloqueo de la interacción AG-RAGE con un anticuerpo bloqueante anti-RAGE previno el aumento en p53 inducido por AG. Medida de la expresión de p53 mediante western-blot de CMH tratadas con AG 100 µg/ml junto con un anticuerpo bloqueante anti-RAGE 10µg/ml durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo ya la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

El segundo mecanismo utilizado fue mediante la disminución de la expresión del RAGE con un ARN de interferencia específico, observándose un resultado similar que con el anticuerpo bloqueante (Figura 61).

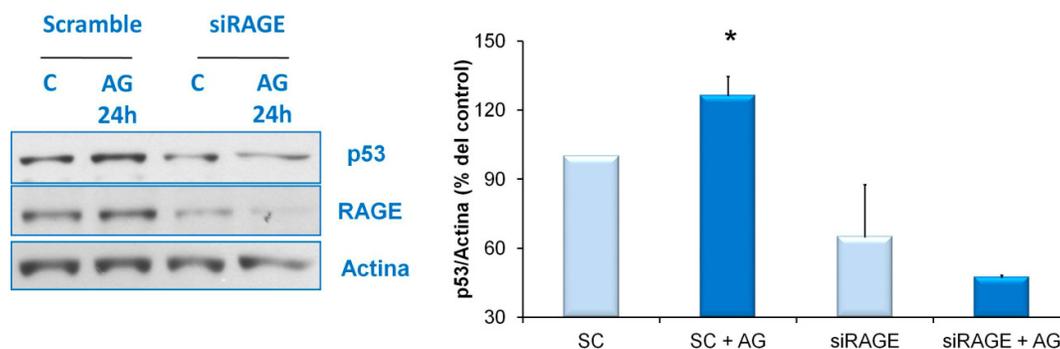


Figura 61. El silenciamiento de RAGE previno el aumento en p53 promovido por AG. Medida de la expresión de p53 mediante western-blot de CMH transfectadas con ARN de interferencia contra RAGE 100mM (siRAGE) o ARN sin diana (Scramble) y tratadas con AG 100 µg/ml durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo ya la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

2.3. EL AUMENTO EN p53 INDUCIDO POR LA ALBÚMINA GLICOSILADA FUE DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Con el objetivo de analizar los mecanismos responsables de la senescencia inducida por AG, se midió la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

observándose un aumento significativo de su producción a las 24h de tratamiento (Figura 62).

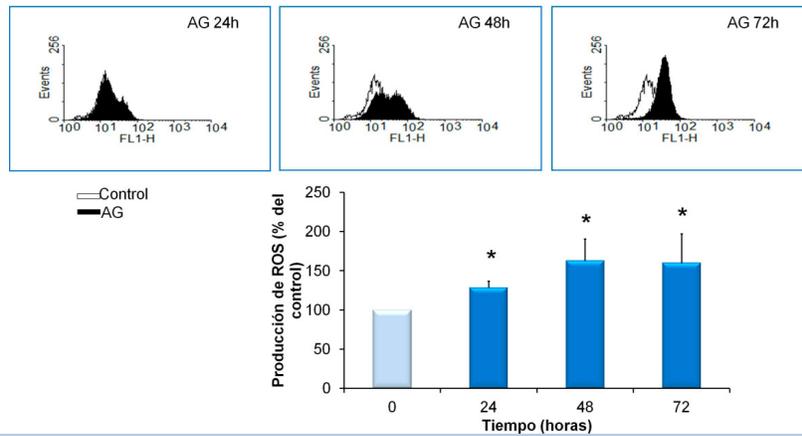


Figura 62. La AG promovió la producción de ROS. Medida de la producción de ROS, mediante citometría de flujo, con sonda H₂DCFDA en CMH tratadas con AG 100µg/ml a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se representan las gráficas de citometría de flujo de un experimento representativo y abajo la media de los valores de fluorescencia de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes. *p < 0,05 vs control.

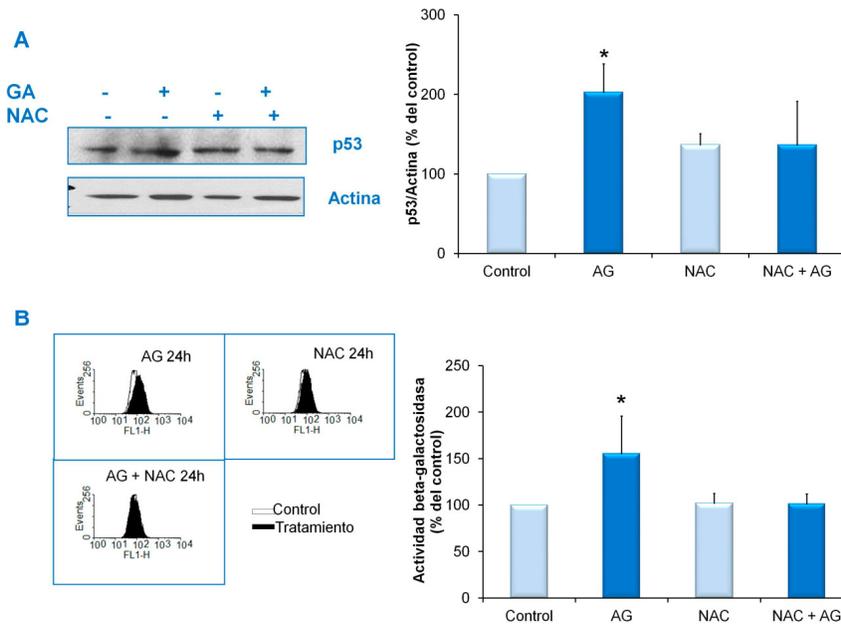


Figura 63. El tratamiento con el antioxidante NAC previno el aumento en p53 y el aumento en la actividad de la β-galactosidasa inducido por AG. (A) CMH tratadas con AG 100µg/ml y NAC (10mM) durante 24h donde se midió la expresión de p53 mediante western-blot. A la izquierda se muestra un blot representativo ya la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. (B) La actividad β-galactosidasa mediante citometría de flujo. En la izquierda se representan las gráficas de citometría de flujo de un experimento representativo y a la derecha la media de los valores de fluorescencia de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Por otro lado, la adición de un antioxidante como la N-acetil-cisteína (NAC, 10mM) previo a la de la AG, inhibió el aumento en p53 esperado (Figura 63.A) y disminuyó el número de células senescentes (Figura 63.B), indicando que el estrés oxidativo conduce a la senescencia.

2.4. LA SENESCENCIA PRODUCIDA POR LA ALBÚMINA GLICOSILADA FUE DEPENDIENTE DE UN DESCENSO EN LA EXPRESIÓN DE CATALASA

Para conocer los posibles mecanismos implicados en la producción de ROS, se estudió la expresión de la enzima catalasa, responsable del aclaramiento del peróxido de hidrógeno celular.

Tras el tratamiento de CMH con AG se observó un descenso significativo de la expresión proteica de catalasa, que no apareció en presencia de ANG (Figura 64).

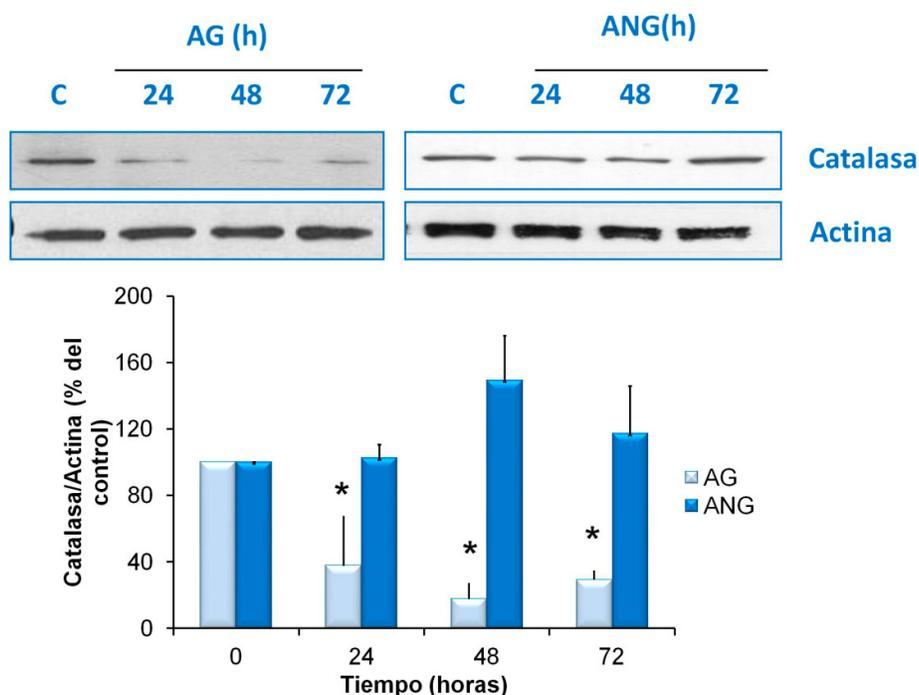


Figura 64. El tratamiento con AG descendió la expresión de catalasa. Estudio de la expresión de catalasa mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100µg/ml y ANG 100µg/ml a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Además, el descenso en catalasa fue dependiente de la unión de la AG a RAGE, ya que su expresión en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-RAGE (Figura 65) y un ARN de interferencia contra RAGE (Figura 66) hizo desaparecer el efecto observado.

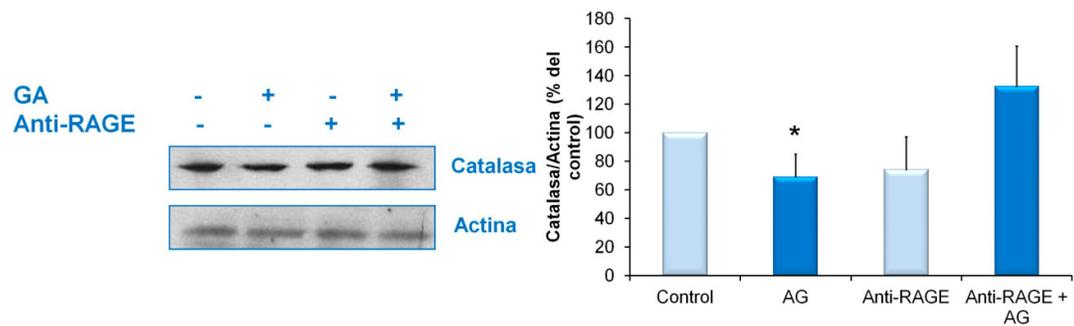


Figura 65. El bloqueo de la interacción AG-RAGE mediante un anticuerpo bloqueante anti-RAGE previno el descenso en catalasa inducido por AG. Análisis de la expresión de catalasa mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100µg/ml durante 24h y anticuerpo bloqueante anti-RAGE 10µg/ml. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

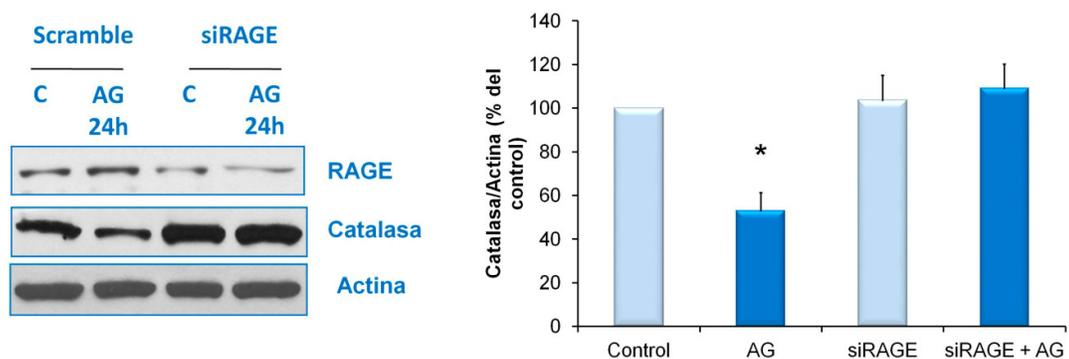


Figura 66. La inhibición específica de RAGE previno el descenso en catalasa promovido por AG. Análisis de la expresión de catalasa mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100µg/ml durante 24h y transfectadas ARN de interferencia contra RAGE 100nM (siRAGE) o ARN sin diana (scramble). A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Abundando en el efecto antes citado, se compensó el descenso en catalasa añadiendo catalasa exógena (CAT) a las células. No se observó un aumento ni en p53 ni en la actividad SA-β-gal en presencia de AG y CAT (Figura 67.A y 67.B).

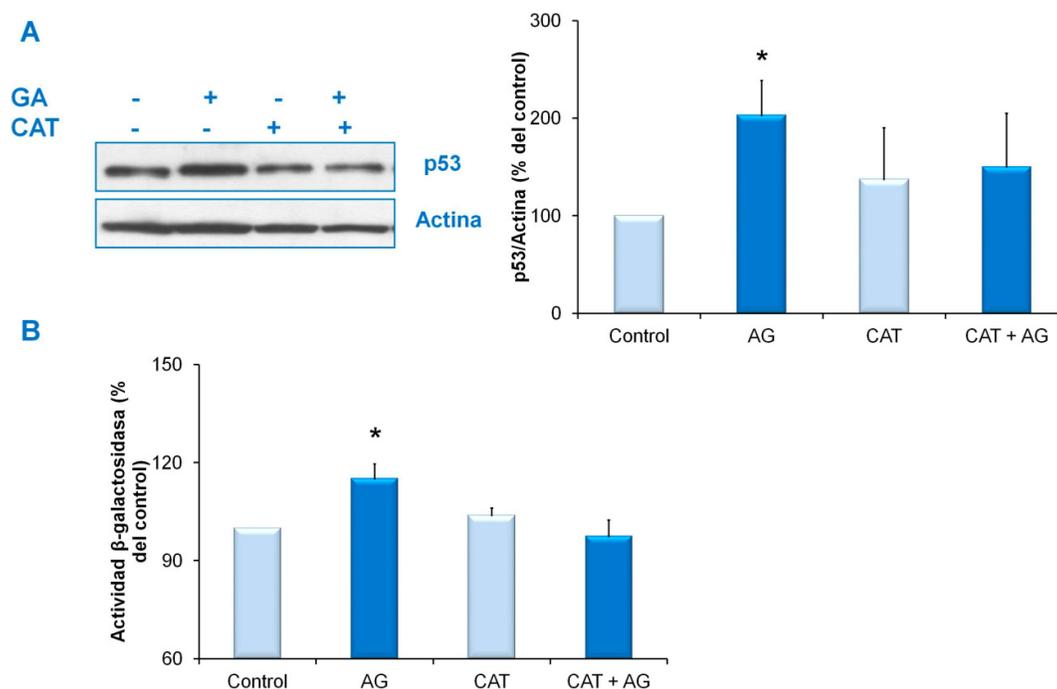


Figura 67. La adición exógena de catalasa previno el aumento en p53 y en la actividad β-galactosidasa inducido por AG. (A) Análisis de la expresión de p53 mediante western-blot. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. **(B)** La actividad β-galactosidasa mediante citometría de flujo en CMH tratadas con AG 100 μg/ml y CAT 160 U/ml durante 24h representándose la media de los valores de fluorescencia de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

2.5. LA ALBÚMINA GLICOSILADA INDUJO SENESCENCIA CELULAR MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO

Como se comentó anteriormente, la vía celular del receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R) está relacionada con el envejecimiento celular y su activación es responsable del descenso en la expresión génica de catalasa. Asimismo, es conocido que la AG es capaz de inducir la liberación de IGF-1 en las CMH (Publiese, G. y col 1997). Para corroborar este resultado, se estudió la liberación de

IGF-1 al sobrenadante de CMH tratadas con AG, observándose un aumento significativo a partir de los 60 minutos de tratamiento (Figura 68).

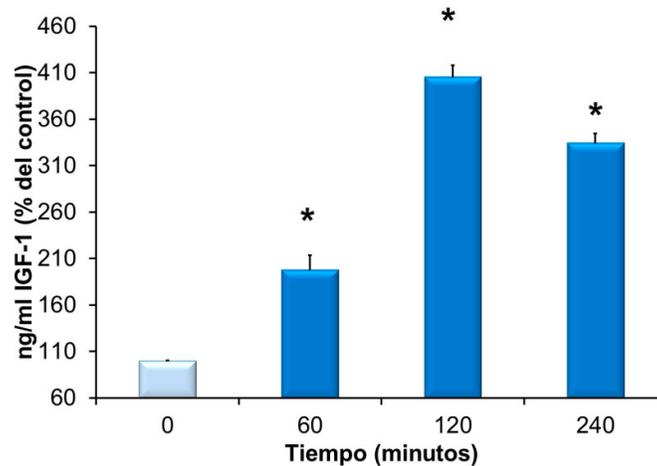


Figura 68. La AG indujo la liberación de IGF-1 al sobrenadante celular. Medida de la liberación de IGF-1 (ng/ml) al medio de cultivo en CMH tratadas con AG 100 µg/ a diferentes periodos de tiempo mediante ELISA. En el gráfico se representa la media de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control. * p < 0,05 respecto del control.

Debido a que el IGF-1 es el principal ligando del IGF-1R, se quiso estudiar si la AG podía aumentar la activación del IGF-1R en CMH. Cuando se trataron las células con AG se observó un aumento significativo tanto de la expresión (Figura 69) como de la activación del receptor (Figuras 70.A y 70.B).

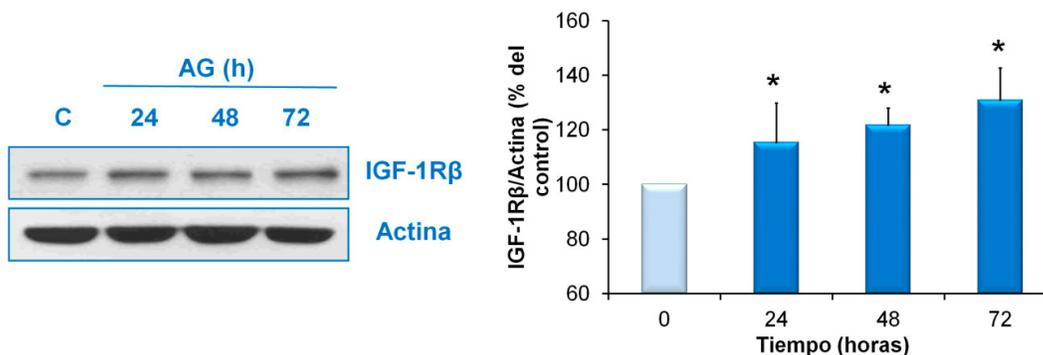


Figura 69. La AG indujo el aumento en la expresión de IGR-1R. Estudio de la expresión de la subunidad β del receptor IGF-1 mediante western-blot. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

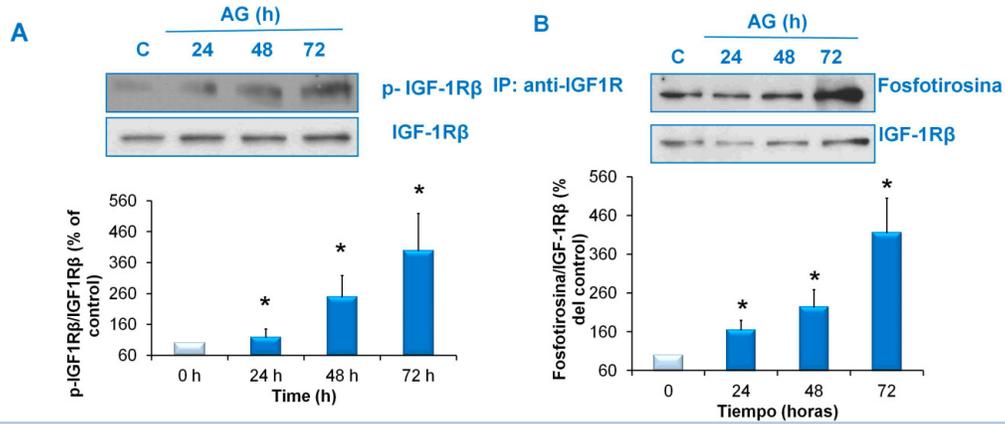


Figura 70. La AG indujo la activación del IGF-1R. (A) Estudio de la expresión de la activación de la subunidad β del receptor IGF-1 mediante el análisis de la forma fosforilada western-blot y (B) mediante inmunoprecipitación del receptor IGF-1 y western-blot para fosfotirosina a diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

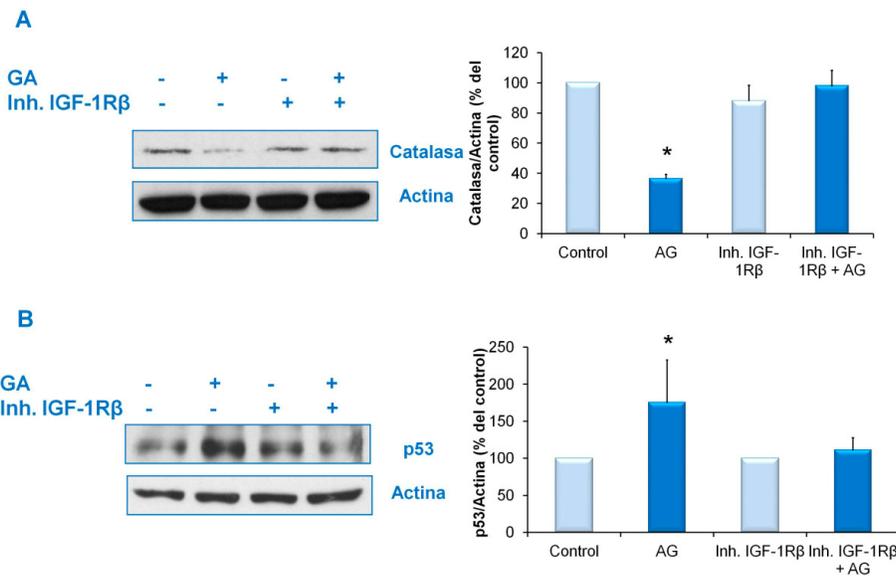


Figura 71. La inhibición farmacológica de la autofosforilación de IGF-1R previno el descenso en catalasa y el aumento en p53 promovido por AG. (A) Medida de la expresión de catalasa (B) y p53 mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100μg/ml junto con inhibidor de la autofosforilación del IGF-1R durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Para conocer si la activación de IGF-1R estaba implicada en los cambios anteriormente observados en la expresión de catalasa y p53, se utilizó un inhibidor farmacológico de la autofosforilación del receptor (Figura 71.A y 71.B). El tratamiento

conjunto de la AG con dicho inhibidor previno los efectos productos por la AG sobre la expresión de catalasa y p53.

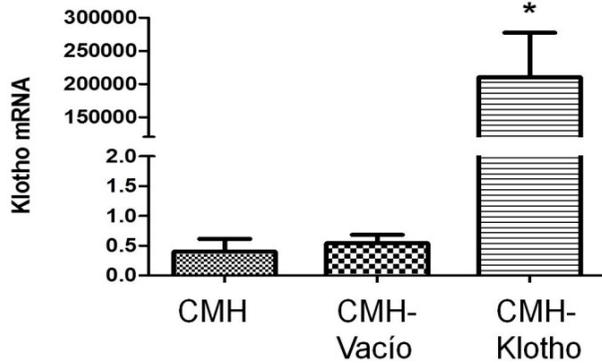


Figura 72. La transfección de CMH con plásmido que contiene Klotho indujo la expresión constitutiva de la proteína. Medida de la expresión de Klotho en línea estable de células transfectadas con Klotho mediante qPCR. * p < 0,05 respecto al control. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0.05 vs control.

Klotho es una proteína presente en la circulación sanguínea que es capaz de inhibir al IGF-1R de manera natural. Para ver si klotho podría prevenir los efectos inducidos por la AG en CMH, se realizó una línea estable de CMH que sobre-expresaban Klotho ya que las células mesangiales en cultivo no expresan klotho de manera endógena (Figura 72). La transfección de Klotho disminuyó de forma importante la autofosforilación del IGF-1Rβ en respuesta a la adición de AG (Figura 73).

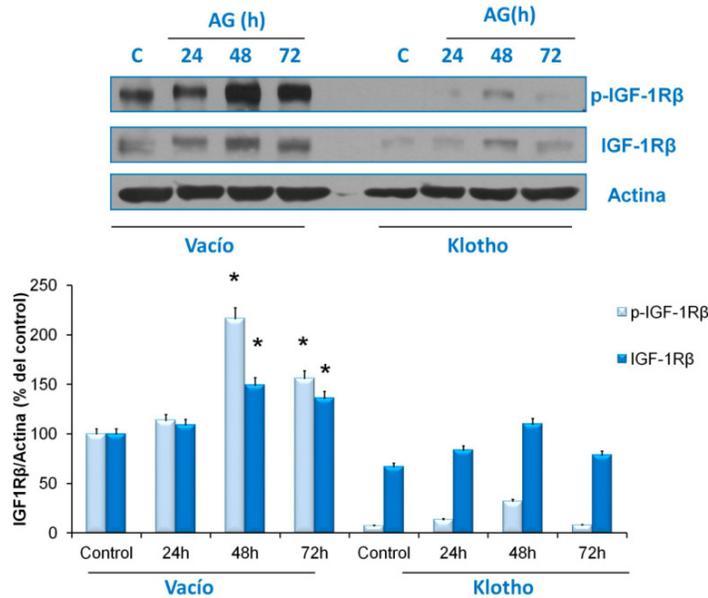


Figura 73. Las células transfectadas establemente con Klotho presentaron una menor expresión y activación de IGF-1R en presencia de AG. Análisis de la expresión y actividad de IGF-1Rβ en CMH transfectadas con Klotho y tratadas con AG 100µg/ml mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Las células transfectadas de forma estable con klotho se trataron con AG, no observándose el descenso en catalasa, que sí ocurrió en las células transfectadas con un plásmido vacío (Figura 74.A). Tampoco se observó el aumento en p53 y en la actividad SA-βgal que sí apareció en las células con plásmido vacío (Figura 74.B y 74.C).

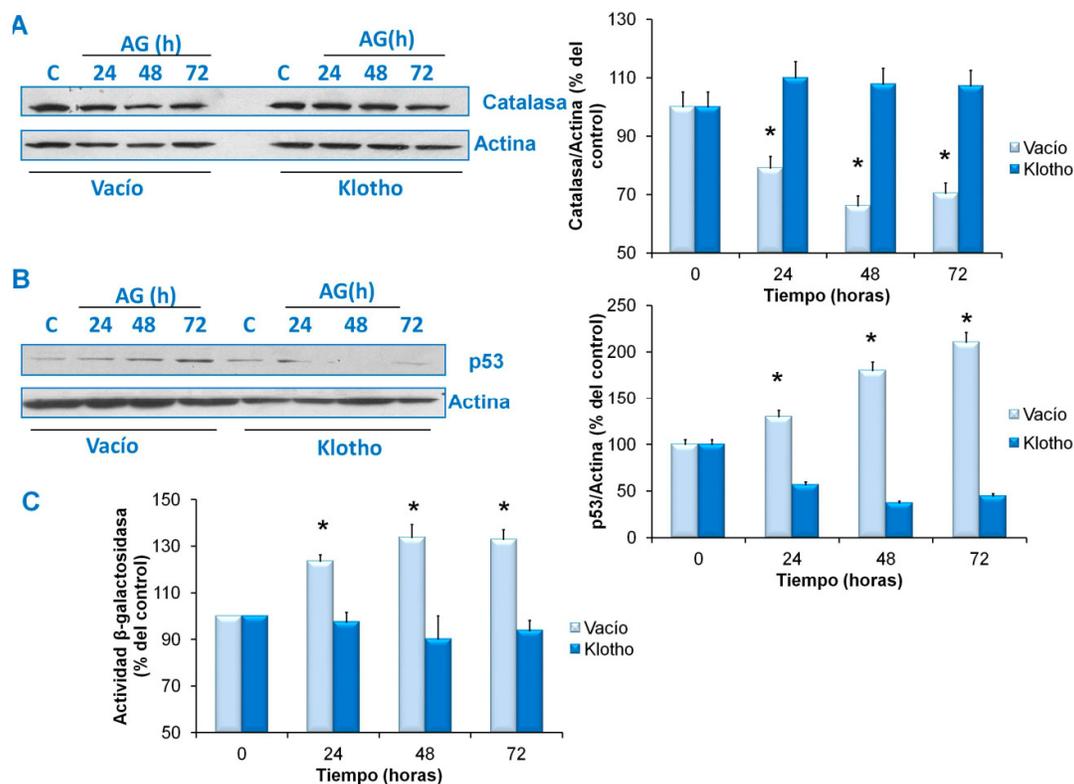


Figura 74. La transfección estable con Klotho previno el descenso en catalasa y el aumento en p53 y la actividad β-galactosidasa inducido por AG. (A y B) Análisis de la expresión de catalasa y p53 mediante western-blot en CMH transfectadas de manera estable con plásmido que sobreexpresa Klotho o plásmido vacío, tratadas con AG 100μg/ml a diferentes periodos de tiempo. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos (C) Medida de la actividad β-galactosidasa por citometría de flujo en estas mismas células, con este mismo tratamiento. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

2.6. LA SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA POR LA ALBÚMINA GLICOSILADA FUE MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA RAS-ERK

A continuación se analizaron las posibles vías que el IGF-1R podría estar activando tras su autofosforilación. Como anteriormente se ha explicado, la vía canónica que es activada mediante la autofosforilación de IGF-1R es la de PI3K-Akt-FoxO, que es responsable de la regulación de la expresión génica de la catalasa. Por este motivo se estudió la activación de Akt en presencia de AG, observándose un descenso de forma tiempo-dependiente. Lo mismo ocurrió con la activación del factor de transcripción FoxO1 (Figura 75.A y 75.B).

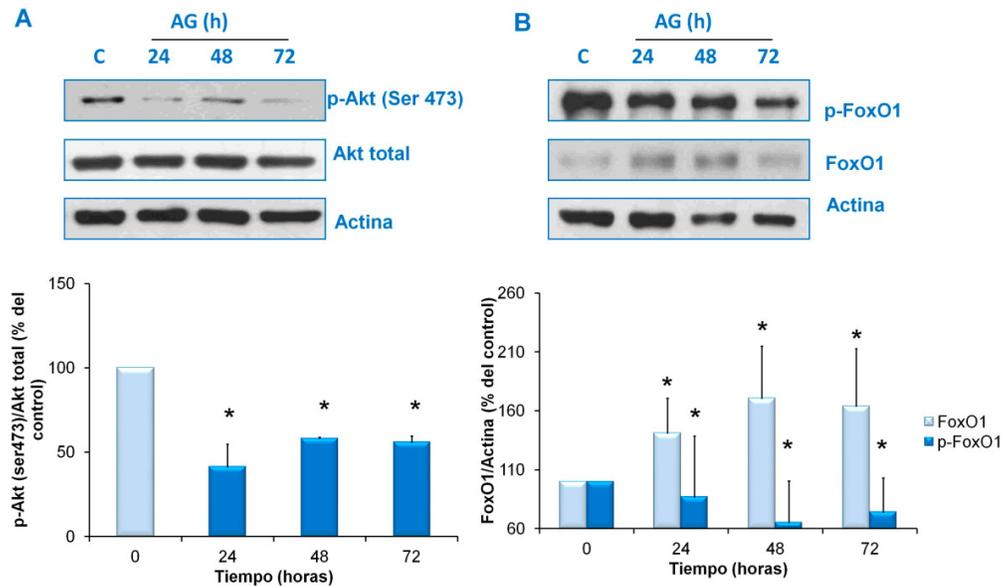


Figura 75. La AG promovió el descenso en la fosforilación de Akt y FoxO1. Estudio de la vía PI3K-akt-FoxO. (A y B) Medida de la actividad de akt y FoxO1 mediante la detección de sus formas fosforiladas en CMH tratadas con GA 100µg/ml mediante western-blot. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Por otro lado, otra vía de señalización activada por la fosforilación del IGF-1R es la de Ras-erk. Para ello, se analizó en primer lugar la actividad de Ras, observándose un aumento significativo de su forma activa (Ras-GTP) tras el tratamiento con AG (Figura 76.A), que se mantuvo hasta las 72 horas. Lo mismo ocurrió con la actividad de Erk1/2, que aumentó significativamente con AG (Figura 76.B).

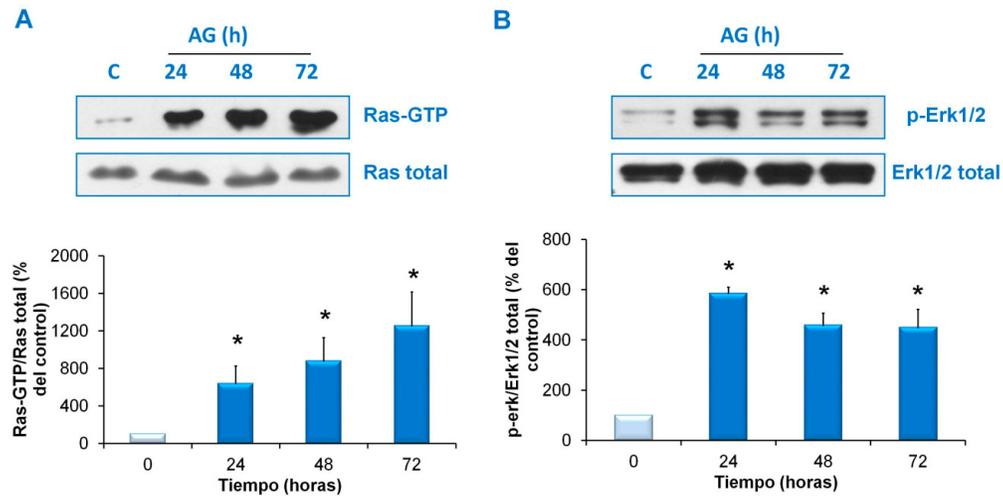


Figura 76. La AG indujo la activación de Ras y Erk1/2. (A) Medida de la actividad de Ras mediante ensayo de pull-down y posterior análisis mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100µg/ml a diferentes tiempos. **(B)** Expresión de la forma activa de Erk1/2 con el mismo tratamiento. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Para conocer si el aumento en la actividad de Ras era debido a un aumento en la actividad del IGF-1R, se estudió su actividad en células transfectadas establemente con klotho. Tras el tratamiento de dichas células con AG, no se observó un aumento significativo en Ras-GTP que sí ocurrió en las células transfectadas establemente con un plásmido vacío (Figura 77).

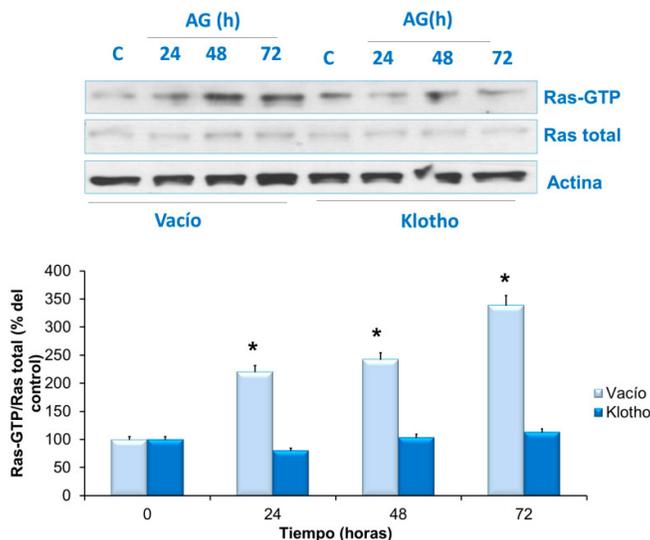


Figura 77. La transfección estable con Klotho previno la activación de Ras promovida por AG. Estudio de la actividad de Ras mediante ensayo de pull-down en células transfectadas establemente con plásmido vacío y con plásmido que sobreexpresa Klotho y tratamiento con AG 100µg/ml durante diferentes periodos de tiempo. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Tras observar los resultados obtenidos, se dedujo que la disminución en catalasa no debía de estar regulada por la vía clásica PI3K-Akt, por lo que se trató de estudiar si la actividad de Ras observada tras el tratamiento con CMH pudiera estar involucrada en el descenso en catalasa. Para ello, se analizó la expresión de catalasa en CMH transfectadas con un dominante negativo de Ras (DN-Ras) y tratadas con AG, no observándose el descenso en catalasa tras el tratamiento con el mismo (Figura 78.A). Lo mismo ocurrió cuando se trataron las células con un inhibidor farmacológico de erk junto con la AG (Figura 78.B).

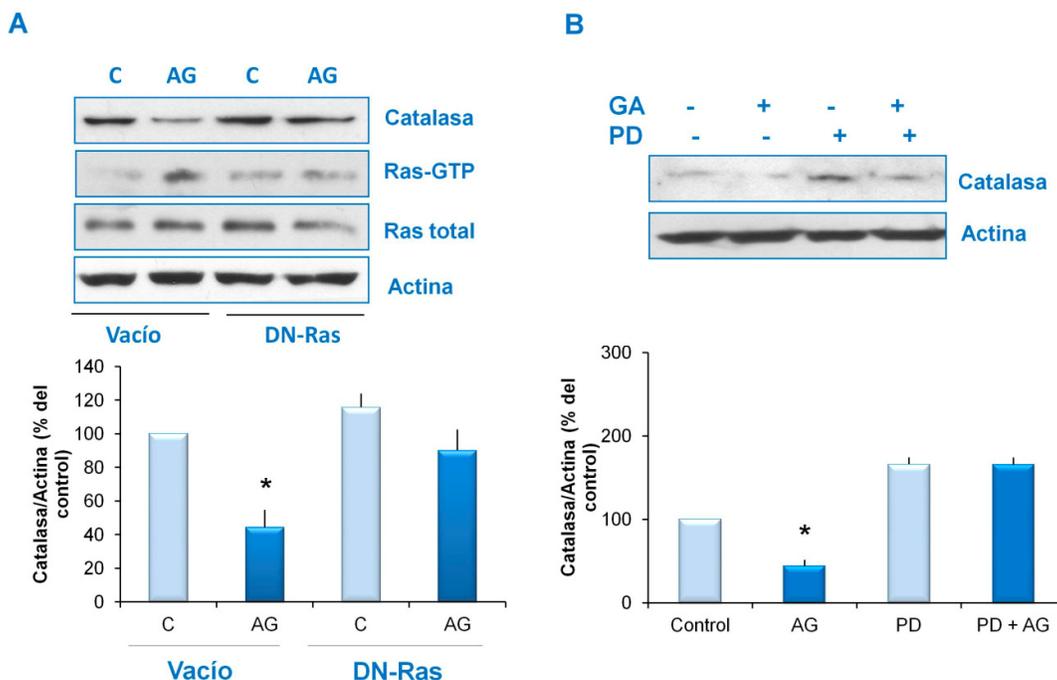


Figura 78. La inhibición de la activación de Ras y Erk1/2 previno el descenso en catalasa inducido por AG. (A) Análisis de la expresión de catalasa mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100 µg/ml y DN-Ras durante 24h. **(B)** Estudio de la expresión de catalasa en CMH tratadas con AG 100µg/ml y PD98059 50µM durante 24h. En la parte superior se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

Para estudiar si el aumento en p53 observado tras el tratamiento con AG era debido a la activación de la vía Ras-Erk1/2, se procedió a analizar la expresión de p53 en CMH tratadas con dos inhibidores de Ras. Por un lado se transfectó con el DN-Ras anteriormente utilizado y un inhibidor farmacológico de la farnesilación de Ras (FPTIII). La transfección del DN-Ras y el tratamiento con el inhibidor farmacológico previnieron el aumento en p53 provocado por AG (Figura 79 y 80). Lo mismo ocurrió con el inhibidor de Erk1/2. (Figura 81).

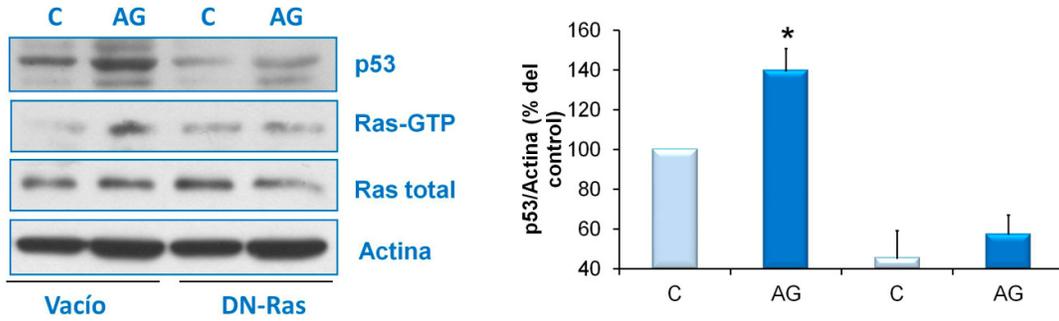


Figura 79. La inhibición de la activación de Ras revirtió el aumento en p53 promovido por AG.

Análisis de la expresión de p53 mediante western-blot en CMH tratadas con AG 100 µg/ml y DN-Ras durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

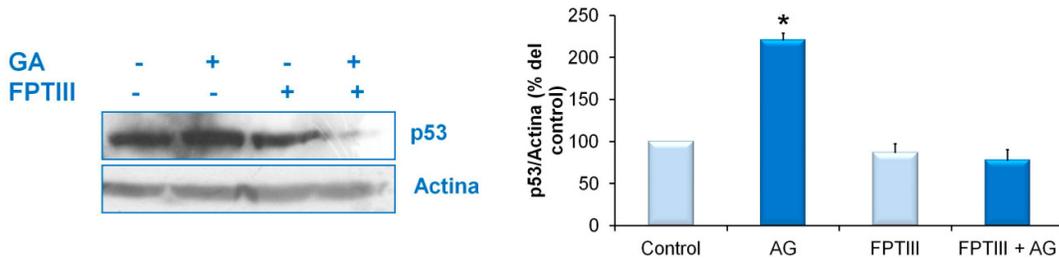


Figura 80. El tratamiento con un inhibidor farmacológico de la activación de Ras previno el aumento en p53 inducido por AG.

Expresión de p53 en presencia de AG 100µg/ml y FPTIII 2,5µM durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

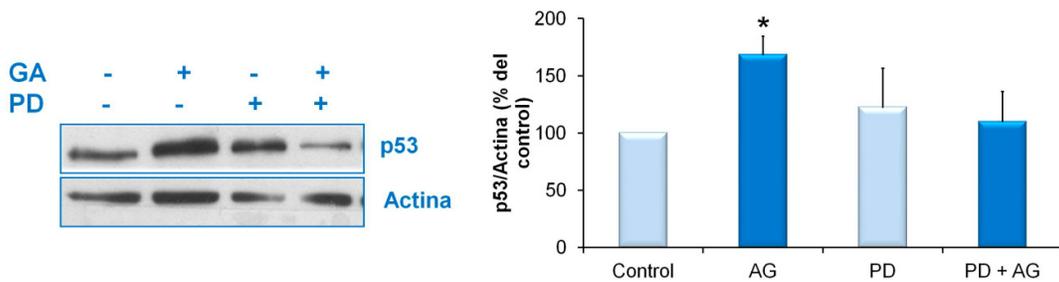


Figura 81. El inhibidor farmacológico que la activación de Erk1/2 revirtió el aumento en p53 promovido por AG.

Estudio de la expresión de p53 en CMH tratadas con AG 100µg/ml y PD98059 50µM durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media ± error estándar de seis experimentos independientes *p < 0,05 vs control.

En resumen:

- La albúmina glicosilada induce senescencia celular en células mesangiales humanas a través de la vía p53-p21, dependiente de su unión al receptor de los productos de glicosilación avanzada.
- La senescencia inducida por la albúmina glicosilada se produce por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno mediante el descenso en la expresión de catalasa.
- El aumento en p53 y el descenso en catalasa es dependiente de la activación del receptor de IGF-1 y la consecuente activación de la vía Ras-Erk1/2 (Figura82).

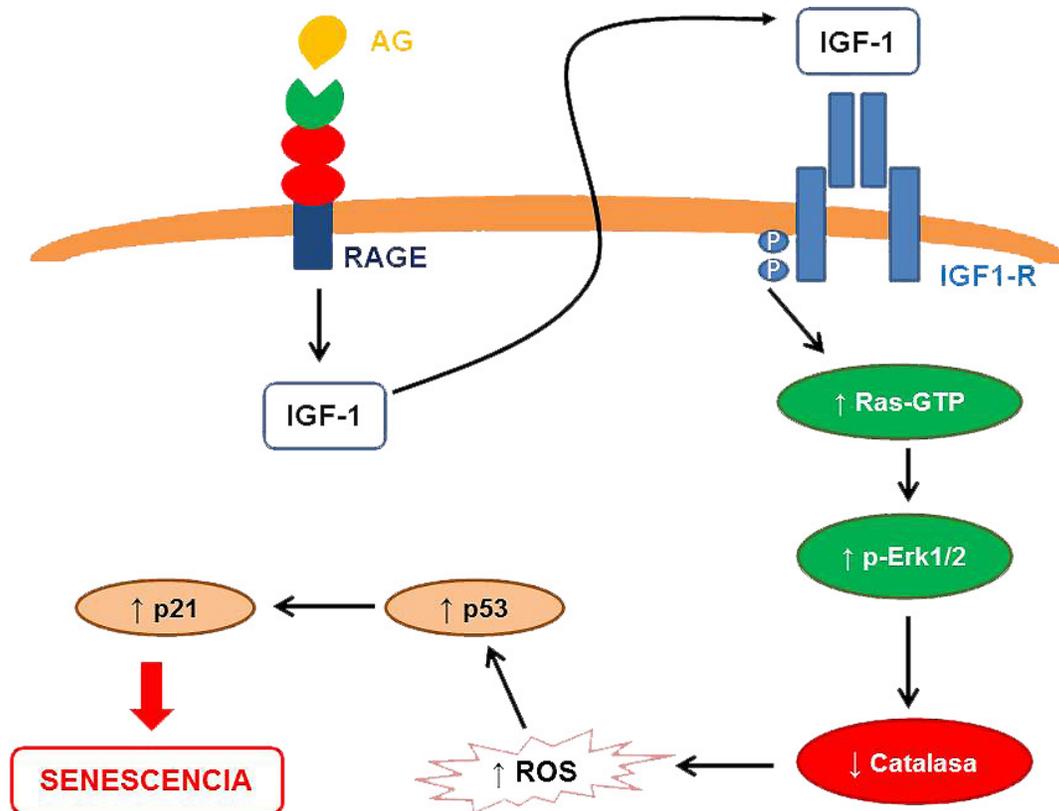


Figura 82. Esquema representativo de los mecanismos intracelulares implicados en la senescencia celular inducida por AG en CMH.

DISCUSIÓN

El envejecimiento de los organismos se caracteriza por un descenso funcional gradual de todos los órganos. Los mecanismos responsables del proceso de envejecimiento están siendo estudiados, existiendo diversas teorías que pretenden explicarlos. De forma general, el envejecimiento es consecuencia de un desequilibrio en los procesos de daño y reparación tisular. La tasa de envejecimiento y la aparición de enfermedades relacionadas con la edad están moduladas por respuestas a estrés y vías celulares de reparación que gradualmente se deterioran (Oliveira, B.F. y col 2010; Haigis, M.C. y Yankner, B.A. 2010).

En el caso concreto del riñón, el envejecimiento se caracteriza por algunos cambios en su morfología como glomerulosclerosis, atrofia tubular, fibrosis intersticial y fibrosis de la íntima arterial que van a condicionar una pérdida progresiva de la función renal (Zhou, X.J. y col 2008). En la patología glomerular, el mesangio sufre diversos cambios como la presencia de sustancias quimioatrayentes de células inflamatorias, proliferación de células mesangiales, seguido de una producción excesiva de matriz extracelular (Scindia, Y.M. y col 2010).

El mesangio forma la región central del glomérulo renal y actúa como soporte al ovillo glomerular. Está formado por las células mesangiales embebidas en una matriz extracelular. Dicha matriz es producida por la célula mesangial y contiene colágeno tipo IV y V, laminina A, B1 y B2, fibronectina, proteoglicanos heparan sulfato y condroitín sulfato, entactina y nidógeno. Las células mesangiales constituyen el 30-40% de toda la población celular glomerular. Se han descrito dos tipos diferentes de célula mesangial. Más del 90% son células similares a células de músculo liso de vaso que contienen actina y miosina, con actividad contráctil. La célula mesangial conecta con la membrana basal glomerular y el aparato yuxtglomerular, bien directamente, o a través de proteínas microfibrilares extracelulares. La contracción de las células mesangiales puede contraer el lumen del capilar glomerular alterando el flujo sanguíneo en el ovillo glomerular y controlando así el filtrado glomerular. El mesangio está separado del compartimento vascular por un endotelio fenestrado sin una membrana basal. Por tanto, la célula mesangial se encuentra en una localización única, comunicándose tanto con la vasculatura como con el intersticio. Las células mesangiales están expuestas a cambios en el flujo sanguíneo glomerular, a componentes plasmáticos y macromoléculas que atraviesan el endotelio fenestrado (Scindia, Y. M., y col 2010). Además de mantener la hemodinámica glomerular, la

célula mesangial presenta diversas funciones críticas. Actúa de soporte estructural al glomérulo y en especial al ovillo capilar; genera y renueva la matriz mesangial extracelular; es diana de diferentes agentes vasoactivos vasoconstrictores y vasodilatadores; y de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y citoquinas, actuando en la hemodinámica local, la proliferación celular y la renovación de la matriz; produce mediadores vasoactivos y agentes modificadores de crecimiento como prostaglandinas, tromboxano, productos de lipooxigenasa, el factor activador de plaquetas, el óxido nítrico etc.; produce varios factores de crecimiento y citoquinas como PDGF, IL-1, CSF-1, TGF- β , etc.; expresa quimioquinas y moléculas de adhesión; genera activadores e inhibidores de plasminógenos; manipula macromoléculas como lípidos, complejos inmunes y los productos de glicosilación avanzada (AGEs) (Schlondorff, D. 1996).

La especial localización de la célula mesangial en el glomérulo y sus capacidades sintéticas y de respuesta a sustancias vasoactivas hacen que juegue un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y la función de los capilares glomerulares y que defectos en su funcionalidad puedan contribuir en parte, a una disfunción glomerular y un fallo renal temprano (Yamagishi, S. y col 2011).

El proceso de envejecimiento del riñón puede verse acelerado por la presencia de algunas patologías como la hipertensión o la diabetes (Zhou, X.J. y col 2008). La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones microvasculares de la diabetes. En etapas tempranas se observa hipertrofia de la célula mesangial, engrosamiento de la membrana basal y aumento en la expresión de componentes de la matriz mesangial. En etapas finales es común la aparición de glomerulosclerosis, proceso en el que la célula mesangial tiene una importante implicación. Las altas concentraciones de glucosa, angiotensina II, productos de Amadori y productos de glicosilación avanzada, endotelina, fuerzas hemodinámicas y mecánicas, alteraciones en los transportadores de glucosa, exceso de ácidos grasos, lipoproteínas de baja densidad oxidadas son algunos de los muchos factores que en diabetes dan lugar a respuestas patológicas en la célula mesangial (Abboud, H.E. 2011).

La senescencia celular es un proceso fisiológico que se caracteriza por un aumento en la expresión de inhibidores de ciclo celular como p53, p16^{INK4a} y p21, así como un aumento de la actividad β -galactosidasa a pH 6 e hipertrofia celular entre otras características y su presencia se ha relacionado con diferentes condiciones patológicas. La célula senescente no es capaz de proliferar y produce diversas

sustancias pro-inflamatorias y factores de crecimiento que pueden comprometer a la renovación celular y la funcionalidad del tejido (Hayflick, L. 1965; Dimri, G.P. y col 1995; Alcorta, D.A. y col, 1996; Brown, J.P. y col 1997; Campisi J. y d'Adda di Fagagna, F. 2007; Tsirpanlis, G. 2008).

La senescencia celular podría jugar un papel importante en los procesos de envejecimiento ya que la actividad SA- β -gal y un aumento en la expresión de p16^{INK4a} se han descrito en el riñón envejecido aún antes de aparecer cambios morfológicos (Zhou, X.J. y col 2008; Yang, H. y col 2010). La célula senescente presenta algunas similitudes muy significativas con la célula hipertrófica y dado que uno de los principales cambios morfológicos encontrados en el riñón diabético es la hipertrofia glomerular (Bak, M. y col 2000; y Drummond, K. y Mauer, M. 2002) y que en modelos experimentales de nefropatía diabética se ha observado la presencia de hipertrofia glomerular dependiente del aumento en p21 (Wolf, G. y col 1992), se puede proponer que la senescencia celular puede estar presente en el riñón diabético y que este factor contribuya al desarrollo de la disfunción renal asociada a la diabetes. Además, la hipertrofia celular puede causar una activación compensatoria de lisosomas, autofagia (debido a la activación de mTOR), y actividad SA- β -gal (Blagosklonny, M.V. 2011). La senescencia de la célula mesangial podría dar lugar a la liberación de factores de crecimiento y otras proteínas inflamatorias que pueden comprometer la funcionalidad del glomérulo.

Las altas concentraciones de glucosa sanguíneas y la formación de productos de glicosilación avanzada son algunos de los factores fisiopatológicos de la diabetes que contribuyen al desarrollo de la nefropatía diabética (Abboud, H.E. 2011). En el presente trabajo se trató de describir los mecanismos a través de los cuales estos factores podrían estar induciendo senescencia celular en la célula mesangial y así contribuir al envejecimiento prematuro del riñón.

El trabajo se ha realizado en células mesangiales debido a que, como antes se menciona, estas células ocupan un papel principal en el mantenimiento tanto de la estructura como de la función del glomérulo, y la exposición a altas concentraciones de glucosa y AGEs, da lugar a diversos cambios fenotípicos que contribuyen a la progresión de la glomerulosclerosis (Fioretto, P. y col 1995).

1. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA INDUCEN SENESCENCIA CELULAR MEDIANTE CAMBIOS EN LA OSMOLARIDAD

La exposición de células mesangiales en cultivo a altas concentraciones de glucosa, da lugar al desarrollo de hipertrofia celular tras 48h de incubación (Wolf, G. y col 1992; Kuan, C.J. y col. 1998; Huang, H.C. y Preisig, P.A. 2000). Asimismo, se ha visto que estas células presentan parada en fase G1 del ciclo celular cuando se mantienen expuestas a un medio con un contenido alto en glucosa y un aumento en la fosforilación de p27 así como, que p21 se requiere para el desarrollo de la hipertrofia glomerular en modelos experimentales de nefropatía diabética (Wolf, G. y col 2000).

Debido a estas evidencias se quiso explorar si la parada del ciclo celular inducida por la HG podría estar dando lugar a senescencia en células mesangiales humanas. Para el estudio de la senescencia celular se evaluó la actividad β -galactosidasa. La β -galactosidasa ácida es una hidrolasa localizada en los lisosomas y tiene un pH óptimo ácido (pH 4,0-4,5). Sin embargo, se ha descrito una actividad β -galactosidasa a pH 6 que parece estar relacionada con la senescencia celular (Kurz, D.J. y col 2000). Por ello, el estudio de la actividad de esta enzima nos permite utilizarlo como marcador de senescencia celular. Para el análisis de las vías inductoras de senescencia se analizó mediante western-blot la expresión de p53 y los inhibidores de CDK p21 y p16^{INK4a}, los principales inductores de senescencia celular prematura (Campisi, J. 2005). Nuestros resultados demostraron que la HG induce senescencia celular a través de la activación de las vías de señalización de p53-p21 y p16^{INK4a}.

Por otra parte, la glucosa es un glúcido y puede actuar como una sustancia osmóticamente activa, observándose un incremento en la osmolaridad del orden de 20-30 mOsm/kg en el medio de cultivo de CMH tratadas con HG. Por el momento, no existen estudios que demuestren una implicación del estrés osmótico en la patogenia renal en la diabetes. Sin embargo, otras sustancias osmóticamente activas como el NaCl y la urea pueden inducir parada de ciclo celular en células de túbulo renal (Michea, L. y col 2000). Estas células presentan mecanismos de protección frente a estrés osmótico ya que se exponen de manera natural a altos niveles de osmolaridad del medio extracelular. Debido a su posición anatómica, la célula mesangial no está expuesta a grandes cambios de osmolaridad, por lo que no se han estudiado hasta ahora los efectos que pequeños incrementos de la misma, pudieran tener en el comportamiento celular. En este sentido, se quiso explorar si el efecto de la HG sobre

la senescencia celular pudiera estar provocado, en parte, por un ligero aumento en la osmolaridad plasmática.

Se realizaron experimentos tiempo-respuesta con diferentes sustancias osmóticamente activas para poder comparar el efecto de éstas sobre la senescencia celular. Se utilizaron cuatro osmolitos de diferente origen químico y diferente función; cloruro sódico (NaCl), manitol, sacarosa y urea. El NaCl es una sustancia hipertónica que se disocia en Na^+ y Cl^- . La membrana celular es permeable para el Na^+ mediante la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, permitiendo la salida de Na^+ al espacio extracelular, manteniendo así, el volumen normal de la célula. El manitol es un polialcohol que no entra en el interior de la célula al carecer de transportador. La sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa que se utiliza como sustancia osmótica debido a que las células humanas no presentan transportador para el mismo. La urea es una sustancia nitrogenada producto de la degradación de aminoácidos en mamíferos, siendo permeable a la mayor parte de las células por lo que su presencia en el espacio extracelular no genera cambios de volumen celular (Burg, M.B. y col 2007).

Todos los compuestos osmóticamente activos utilizados indujeron un efecto similar al observado con la HG. Aumentaron ligeramente la osmolaridad del medio celular y produjeron un aumento en la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia y una activación de las vías de senescencia p53-p21 y p16^{INK4a}. Por lo tanto, la explicación a este hecho la podríamos encontrar en que ligeros aumentos en la osmolaridad plasmática mantenidos durante más de 24 horas inducen senescencia de las células en cultivo. Una de las respuestas fisiológicas a los cambios de osmolaridad del medio extracelular es el cambio de volumen celular. Posiblemente, los pequeños cambios en la osmolaridad del medio extracelular provocados por la HG y el manitol, estén dando lugar a una respuesta a estrés osmótico acompañada por un incremento del volumen celular y a la activación de diversos mecanismos involucrados en la respuesta al incremento en el volumen. En diversos organismos vivos adaptados a hipertonicidad como bacterias, plantas o animales marinos, así como en la médula renal en mamíferos, existen mecanismos de defensa frente a alteraciones en la osmolaridad del medio extracelular. La acumulación de osmolitos orgánicos compatibles han sido bien estudiados en la médula renal, sin embargo el resto de células del organismo no se conoce si presentan los mismos mecanismos (Alfieri, R.R. y Petronini, P.G. 2007).

Por otra parte, se ha descrito un aumento en la actividad del *sistema de transporte A de aminoácidos* cuando se sometieron células mesangiales de rata a un estrés osmótico agudo de 500mOsm/kg con NaCl (Yamauchi, A. y col 1994) así como un aumento en el cotransportador Na⁺/myo-inositol (Miyai, A. y col 1995) y la actividad aldosa reductasa y la consecuente acumulación de sorbitol (Kaneko, M. y col 1990). Esto indica que la célula mesangial también presenta un sistema de defensa frente a estrés osmótico. La célula mesangial es capaz de aumentar el contenido intracelular de myo-inositol, sorbitol y GPC (glicerofosfocolina) cuando está expuesta a un estrés osmótico, siendo el más abundante el myo-inositol. La betaína, por el contrario, no parece estar implicada en la respuesta a estrés osmótico (Miyai, A y col 1995).

En el caso de la célula mesangial se ha descrito que aumenta la expresión del cotransportador Na⁺/myo-inositol también en presencia de HG, sugiriendo que la HG pudiera inducir este aumento por un mecanismo de hiperosmolaridad (Miyai, A. y col 1995). El myo-inositol es un osmolito compatible sintetizado por las células renales, y en presencia de un medio hipertónico, la célula puede aumentar la expresión del cotransportador Na⁺/myo-inositol para favorecer la captación de myo-inositol del medio extracelular (Burg, M.B. y col 2007). En este sentido, para demostrar que el aumento en la expresión de factores asociados a senescencia en células mesangiales fue, en efecto, debido a cambios en la osmolaridad, se trataron CMH con myo-inositol. Los resultados mostraron que este compuesto previno la senescencia celular y el incremento en p53 y p16^{INK4a}. Esto podría indicar que la senescencia celular inducida por HG y manitol podría ser dependiente de cambios de volumen celular. Por otro lado, diversos estudios han demostrado la disminución en la acumulación de myo-inositol en el riñón de pacientes diabéticos (Raccach, D y col 1998) lo que podría indicar que en la diabetes las células pueden ser más susceptibles a estrés osmótico. Estas evidencias junto con nuestros resultados podrían sugerir un efecto protector del myo-inositol frente a la HG.

Con el fin de dilucidar los mecanismos intracelulares implicados en la senescencia celular provocada por la hiperosmolaridad, se estudió la implicación de los ROS. Se ha descrito que la alta glucosa induce la producción de especies reactivas de oxígeno en células mesangiales (Ha, H. y Lee, H.B. 2000) y que los ROS pueden ser uno de los posibles responsables de las complicaciones que aparecen en pacientes diabéticos (Baynes, J.W. 1991; Salahudeen, A.K. y col 1997; Ha H y Kim, K.H. 1999). Sin embargo, también niveles elevados de NaCl o de Urea provocan daño oxidativo (Zhang, Z. y col 1999; Zou, A.P. y col 2001; Zhang, Z. y col 2004; Yang, T. y

col 2005; Zhou, X. y col 2006; Burg, M.B. y col 2007). Por lo tanto, los mecanismos por los que la HG y la hiperosmolaridad promueven la producción de ROS podrían ser comunes. Hemos comprobado que tanto la HG como el manitol pueden producir un aumento en la síntesis de ROS. Además, cuando se previno el aumento en ROS añadiendo un antioxidante, la N-acetil-cisteína (NAC) no se observó un aumento en la senescencia celular ni en p53 ni p16^{INK4a}. NAC es un precursor del aminoácido L-cisteína que combina con glutamato y glicina, siendo todos ellos precursores de la producción de glutathion, uno de los principales antioxidantes celulares (Sansone, R.A. y Sansone, L.A. 2011). Nuestros resultados indican que la producción de ROS es responsable tanto de la senescencia celular como del incremento en p53 y p16^{INK4a}.

En cuanto a otro de los posibles factores involucrados en este hecho, estudios previos han observado la activación rápida de Ras en presencia de HG y AGEs en células mesangiales (Lin, C.L. y col 2006). La activación constitutiva del oncogen Ras es un mecanismo conocido de inducción de senescencia celular prematura (Serrano, M. y col 1997) y que se ha relacionado con la alteración de los niveles intracelulares de ROS (Lee, A.C. y col 1999). En nuestros experimentos, se observó una activación constitutiva de Ras en CMH tratadas con HG y manitol. Como se sabe, Ras es una proteína que para ser susceptible de activación debe estar localizada en la membrana celular. Para que esto ocurra es necesaria una modificación lipídica mediante la incorporación de un grupo prenil, farnesil o geranylgeranil en el extremo C-terminal (Hancock, J.F. 2003). Por tanto, la inhibición farmacológica de estas modificaciones post-traduccionales es una estrategia para evitar la activación de Ras. En nuestros experimentos prevenimos la activación de Ras con un inhibidor farmacológico que impide este tipo de modificaciones, no observándose el incremento en p53 ni p16^{INK4a}, ni en la actividad SA-β-gal tras el tratamiento con HG y manitol.

En cuanto a las posibles vías que Ras pudiera estar activando, se estudió la implicación de la MAPK Erk1/2. Lin, C.L. y col. también observaron una activación rápida de la MAPK Erk1/2 en presencia de HG y AGEs. Además la HG induce hipertrofia en células mesangiales mediante la activación de Erk1/2 (Wolf, G. y col 2003). En nuestros experimentos hemos demostrado una activación constitutiva de esta quinasa en presencia de HG y manitol. Además, la inhibición farmacológica de MEK, quinasa responsable de la activación de Erk1/2, previno el aumento en p53 y p16^{INK4a}. Por otro lado, se sabe que la vía MAPK p38 se encuentra activada en células mesangiales humanas tras una exposición crónica con alta glucosa y en diferentes situaciones de estrés celular como el estrés osmótico (Wilmer, W.A. y col 2001). En

nuestros experimentos observamos una activación constitutiva de esta quinasa en presencia de HG y manitol. Sin embargo, cuando inhibimos la activación de p38 con un inhibidor de la unión a ATP de esta proteína, sólo se revierte el aumento en p16^{INK4a}, sugiriendo que la activación de p38 es responsable de la activación de la vía de p16^{INK4a} pero no de p53. Cuando se trataron CMH con *myo-inositol*, junto con HG y manitol, no se observaron cambios en la activación de Ras-GTP y Erk1/2, indicando que la activación de ambas es dependiente de cambios de volumen celular.

Para completar los estudios *in vitro* se procedió a estudiar los efectos de la alta glucosa y el estrés osmótico en un modelo animal en ratas wistar. Con el fin de observar los efectos de la HG, elegimos un modelo animal de diabetes mediante inyección con estreptozotocina. Ésta provoca la destrucción de las células β del páncreas, encargadas de la secreción de insulina, de tal modo que estos animales al carecer de la producción de insulina no son capaces de regular la glucosa sanguínea ni de favorecer su captación por parte las células, presentando hiperglucemia. Cuando se analizó la osmolaridad plasmática de estos animales, se observó un aumento del orden de 40-50 mOsm/kg con respecto al grupo control. En paralelo, a otro grupo de animales se les administró manitol vía intraperitoneal durante varios días, para inducir un aumento en la osmolaridad plasmática. La osmolaridad plasmática de estos animales aumentó en torno a 30 mOsm/kg. Por tanto, la inyección de manitol produjo el efecto esperado sobre la osmolaridad plasmática. El aumento es menor que en las ratas diabéticas aunque posiblemente si se hubiera prolongado el tratamiento con manitol se podría haber alcanzado niveles de osmolaridad similares.

En nuestros resultados no se observaron cambios significativos en la función renal de estos animales, en ninguno de los grupos con tratamiento, aunque sí se apreció una disminución en las proteínas en orina en el ratas diabéticas. Una rata diabética con alteraciones en la función renal debería presentar un aumento en las proteínas en orina, reflejo de una disminución en la capacidad de filtración glomerular. Sin embargo esto no ha ocurrido en nuestro modelo. Por otro lado, se observa un aumento pero no significativo del aclaramiento de creatinina en los animales diabéticos. Éste dato se correlaciona con un aumento de la filtración glomerular, característica presente en estadios tempranos de la nefropatía diabética (Wolf, G. 2000; Kanwar, Y. S. y col 2008). Estos resultados apuntan a que en ninguno de los modelos animales empleados se ha dado un daño renal. Posiblemente una prolongación del tratamiento pudiera haber dado lugar a la instauración del mismo.

Cuando se analizó la senescencia celular en la corteza renal de estos animales se observó un aumento significativo en la expresión de p53 y p16^{INK4a} en ratas diabéticas con respecto al control. Esto podría indicar que la senescencia celular instaurada en la corteza renal de estos animales fuera previa a la insuficiencia renal, de tal modo que posiblemente la senescencia celular puede tener una implicación importante en la nefropatía diabética.

En los animales tratados con manitol, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de p53 y p16^{INK4a} con respecto al grupo control, cuando se analizaron los lisados totales de corteza renal mediante western-blot, sin embargo se observa un aumento mediante técnicas de inmunohistoquímica. Esto puede ser debido a que la senescencia inducida por el manitol no se ha producido del mismo modo en todas las células de la corteza renal. Es de destacar que la expresión de p16^{INK4a} se encuentra localizada en los glomérulos.

En general, se observó un efecto más débil en las ratas inyectadas con manitol que en los animales diabéticos. Esto puede deberse a que en la diabetes existen múltiples factores que pudieran estar implicados en la senescencia celular, no sólo los pequeños aumentos en la osmolaridad plasmática. Un ejemplo es la formación de AGEs que como se ha mostrado en este trabajo, también es capaz de inducir senescencia celular en células mesangiales.

A modo de resumen, podemos decir que tanto la HG como las sustancias osmóticamente activas, como el manitol, pueden inducir senescencia celular a nivel renal a través de unos mecanismos intracelulares similares. Esto puede indicar que parte de los efectos de la HG sobre la célula mesangial pueden deberse a pequeños cambios en la osmolaridad del medio extracelular, siendo la primera vez que se asocia este fenómeno a los efectos negativos de la HG sobre la senescencia celular y el daño renal. Si bien hay que tener en cuenta que la glucosa es una sustancia que las células son capaces de captar mediante la expresión de transportadores de membrana y metabolizar, por lo que parte de sus efectos también podrían deberse a acciones intracelulares. Por ejemplo, la HG puede inducir la activación de la enzima aldosa reductasa que transforma la HG en sorbitol. Para que se dé esta reacción es necesario el consumo de poder reductor en la célula, contribuyendo también al aumento en ROS, lo que también podría contribuir a la senescencia celular inducida por HG (Arner, R.J. y col 2006).

2. LA ALBÚMINA GLICOSILADA PROMUEVE SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS A TRAVÉS DE UN DESCENSO EN CATALASA

Las concentraciones altas de glucosa en sangre pueden dar lugar a la formación de productos de glicosilación avanzada. Los AGEs están asociados con el envejecimiento, apareciendo aumentados en sangre en pacientes con diferentes patologías relacionadas con la edad. Además, se ha demostrado que la presencia de inhibidores de AGEs ralentiza el deterioro en la función renal asociado con la edad (Semba, R.D. y col 2010). De tal modo que la presencia de AGEs en la diabetes podría ser uno de los factores principales en el envejecimiento renal prematuro asociado con esta enfermedad.

El riñón es el mayor regulador del recambio de AGEs pero también es un órgano diana de toxicidad de los mismos y casi todas las estructuras son susceptibles a ellos, incluyendo las membranas basales, el mesangio y las células endoteliales, podocitos, y túbulos (Glugliucci, A. y Bendayan, M. 1995). Los AGEs están implicados en la patogénesis de la nefropatía diabética y sus complicaciones en pacientes con enfermedad renal avanzada. Concretamente, se ha detectado una fuerte acumulación de productos glicosilados en el glomérulo de pacientes diabéticos por técnicas de inmunohistoquímica (Horie, K. y col 1997). La exposición de las células mesangiales a AGEs da lugar a diversos cambios fenotípicos que contribuyen a la progresión de la glomeruloesclerosis (Fioretto, P. y col 1995). Favorecen la síntesis de fibronectina, laminina y colágeno tipo IV en el riñón promoviendo glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial e hipertrofia. (Semba, R.D. y col 2010). Las células mesangiales expresan receptores para AGEs y la interacción AGE-RAGE parece estar implicada en la elevada producción de citoquinas, factores de crecimiento y matriz extracelular inducida por AGEs (Bohlender, J.M. y col 2005).

Los AGEs son capaces de inducir muerte celular por apoptosis y aumentar la expresión de VEGF en célula mesangial humana en cultivo pudiendo contribuir, en parte, a una hiperfiltración glomerular y una disfunción renal temprana (Yamagishi, S. y col 2011). Otros estudios han demostrado la parada de ciclo celular a través de p21 en células mesangiales tras el tratamiento con AGEs, mediante la activación del receptor TGF- β y expresión de STAT5 (Brizzi, M.F. y col 2004). Por otro lado, también los AGEs pueden estimular la expresión de MCP-1. Un incremento en esta proteína está

asociado con la infiltración de monocitos en el mesangio, como se ha observado en fases tempranas de nefropatía diabética (Yamagishi, S. y col 2002).

Los AGEs también estimulan la liberación de IGF-1, IGF-2, FDGF y TGF- β en células mesangiales, que dan lugar a la producción de colágeno IV, laminina y fibronectina. Inducen la producción de TGF- β en podocitos y células de túbulo proximal. Se ha visto que la producción de TGF- β tiene un papel importante en la patogénesis de la glomeruloesclerosis y fibrosis túbulointersticial (Yamagishi S. y col 2011). *In vivo*, la administración de AGEs a ratones sanos durante 4 semanas indujo hipertrofia glomerular con un aumento en la expresión de colágeno IV, laminina B1 y TGF- β (Yang, C.W. y col 1994).

El objetivo de nuestro trabajo fue explorar la posibilidad de que los AGEs pudieran inducir parte de su daño a través de mecanismos relacionados con la senescencia celular. Los experimentos se realizaron con albúmina glicosilada humana, una de las proteínas glicosiladas más abundantes en el organismo.

Nuestros resultados mostraron un aumento en la actividad β -galactosidasa y en la expresión de p53 y p21 pero no de p16^{INK4a} tras el tratamiento con AG, indicando que la senescencia celular inducida por AG fue dependiente únicamente de la vía de senescencia p53-p21. Estudios previos han demostrado que el colágeno glicosilado puede inducir senescencia de células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HuVEC; del inglés *human umbilical vein endothelial cells*), sin embargo, los mecanismos involucrados podrían ser diferentes debido a que en este caso tanto p21 como p16^{INK4a} se encuentran incrementados (Chen, J. y col 2002; Chen, J. y col 2006).

La mayor parte de los efectos de los AGEs están mediados por la interacción con su receptor específico RAGE. Para comprobar si el efecto sobre la senescencia celular fue debido a esta interacción, se bloqueó la interacción AG-RAGE mediante dos métodos. El primero de ellos, fue utilizar un anticuerpo bloqueante anti-RAGE que compite con AG al interactuar específicamente con RAGE. El segundo fue mediante el uso de la técnica de ARN de interferencia. La interferencia de ARN (ARNi) es un fenómeno provocado por la capacidad del ARN de doble cadena (ARNds) de suprimir la expresión de una proteína determinada estimulando la degradación específica de sus ARN diana (Parrish, S. y col 2000). De tal modo que el uso de un ARNi específico contra RAGE, disminuirá de manera significativa la disponibilidad de RAGE en la membrana impidiendo, por tanto, que la AG se una a él y ejerza su efecto sobre la célula. El bloqueo de la interacción AG-RAGE mediante estos métodos previno el

aumento en p53 lo que indica que la senescencia celular inducida por AG en CMH, fue dependiente de su unión a RAGE.

Con el fin de conocer los mecanismos intracelulares que pudieran estar provocando el aumento en p53 inducido por los AGEs, se estudió el posible papel de los ROS. Los AGEs aumentan la expresión de la NADPH oxidasa y daña la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial (Shen, G.X. 2010). Los ROS están estrechamente relacionados con el desarrollo de senescencia celular y envejecimiento (Colavitti, R. y Finkel, T. 2005; Oliveira, B.F. y col 2010). Además del aumento en la producción de ROS, la AG disminuyó el contenido celular de catalasa inhibiendo la respuesta antioxidante frente a ROS, lo que podría contribuir al aumento de los niveles de ROS celulares. No existen datos previos que hayan indicado un efecto directo de los AGEs sobre los niveles de catalasa celular y por esta razón se profundizó en los mecanismos involucrados. Primero testamos y confirmamos que la AG tenía un efecto en la disminución de catalasa a través de su interacción con RAGE.

La expresión de catalasa se redujo en algunas condiciones experimentales involucrando a la activación del receptor IGF-1 y a la inactivación de la familia de factores de transcripción FoxO (Kwon, E.S. y col 2010; Storz, P. 2011). Por otra parte, la vía IGF-1-FoxO fue la primera en relacionarse con el envejecimiento (Kenyon, C. 2005). La activación de la cascada de señalización de IGF-1 se ha descrito en células mesangiales tratadas con alta glucosa, dando lugar al aumento en la producción de TGF- β e hipertrofia en ratas a las que se indujo una diabetes experimental (Pugliese, G. y col 1996; Levin-Iaina, N. y col 2011). También se ha visto que la AG induce la liberación de factores inflamatorios e IGF-1 en células mesangiales (Pugliese, G. y col 1997). Bajo nuestras condiciones experimentales, la AG indujo la liberación de IGF-1 y la activación su receptor, IGF-1R. IGF-1R tras la unión de su ligando es susceptible de autofosforilación en diversos residuos de tirosina de su subunidad β . Estos residuos, pueden ser reconocidos por diversas moléculas de transducción celular activando múltiples cascadas de señalización (Avogaro, A. y col 2010). Nosotros hemos demostrado que la inhibición farmacológica de la autofosforilación de IGF-1R previene el aumento en p53 y el descenso en catalasa y que *klotho*, un inhibidor endógeno de la señalización de IGF-1, tiene el mismo efecto.

Klotho se ha descrito como un gen anti-envejecimiento, y una mutación del mismo produce un fenotipo similar al envejecimiento en ratón (Kuro-o, M. y col 1997).

El gen *klotho* codifica para una proteína transmembrana que puede sufrir una ruptura proteolítica y liberarse al medio extracelular para actuar como un factor humoral que inhibe la señalización de insulina/IGF-1, siendo esta función propuesta como parte de sus propiedades anti-envejecimiento (Wolf, I. y col 2008). Además, la proteína *klotho* recombinante reduce la senescencia dependiente de p53 en HuVEC, pero los mecanismos involucrados aún están por describir (Ikushima, M. y col 2006). Como las células mesangiales no expresan *klotho* de manera endógena, se forzó su expresión mediante la transfección estable de un plásmido que contiene la isoforma de membrana de *klotho*. La expresión de *klotho* en CMH previno la senescencia, el aumento en p53 y el descenso en catalasa inducido por AG. La expresión ectópica de *klotho* por transfección génica *in vivo* (Mitani, H. y col 2002) o adición de proteína recombinante de *klotho* (Doi, S. y col 2011) ha sido utilizado para prevenir el daño renal inducido por angiotensina II y los procesos fibróticos en ratón, respectivamente. Estos resultados, junto con los nuestros, identifican a la proteína *klotho* recombinante como un potencial agente terapéutico para daño renal.

Para identificar las vías intracelulares que median el efecto de la AG sobre la catalasa y p53, se exploraron las vías PI3K/Akt y la de Ras/Raf/MAPK, las cuales están reguladas por la activación del IGF-1R. La adición de AG a CMH inhibió la fosforilación de Akt y FoxO1, sugiriendo un incremento en la translocación nuclear y activación de FoxO1. La reducción en la fosforilación de Akt inducida por AGEs ha sido también descrita en células endoteliales progenitoras (Liang, C. y col 2009). p53 podría inhibir la vía PI3K-Akt a través de la activación de PTEN (Feng, Z. y col 2007). Recientemente ha sido descrito un aumento de FoxO4 por AGEs (An, X.F. y col 2011) y la actividad transcripcional de FoxO1/3, que aumentan la expresión de p53 (Furukawa-Hibi, Y. y col 2005). FoxO es susceptible de regulación no sólo por Akt sino también por estrés oxidativo a través de otras moléculas de señalización como la deacetilasa Sirt1. Además Sirt1 es capaz de regular la actividad transcripcional de p53 favoreciendo la expresión del inhibidor de ciclo celular p21 (Yi, J. y Luo, J. 2010). Estos resultados indican la posibilidad de que FoxO1 pudiera mediar el proceso de senescencia inducido por AG a través del aumento en la expresión de p53, aunque serán necesarios experimentos adicionales para aclarar este punto.

Por otro lado, la otra posible vía susceptible de activación por IGF-1R es Ras-Raf-Erk1/2. Hemos observado una activación de esta vía de forma prolongada durante más de 48h tras la administración de AG. La activación oncogénica de Ras y la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) podrían ser un

mecanismo subyacente de la parada de ciclo celular que depende de p53 (Smicht, A.M. y col 1999; Goldin, A. y col 2006). En nuestras manos, la activación de Ras fue inhibida por la transfección de klotho, y la inhibición de la actividad de Ras y MEK previno la reducción de catalasa y el aumento en la expresión de p53, confirmando el papel de esta vía en la senescencia celular inducida por AG. El papel de las proteínas Ras en la inducción de senescencia mediante la alteración de los niveles intracelulares de ROS han sido anteriormente descritos (Lee, A.C. y col 1999), pero es la primera vez que se relaciona la activación constitutiva de Ras y Erk 1/2 con el descenso en el contenido de catalasa. La expresión de Ras en fibroblastos humanos da lugar a un incremento en los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (Lee, A.C. y col 1999). Este aumento en los niveles de H₂O₂ podría deberse al descenso en catalasa que hemos observado en nuestros experimentos, sin embargo los mecanismos subyacentes en este efecto estarían todavía por determinar en futuros experimentos.

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la AG induce senescencia en células mesangiales humanas, disminuyendo el contenido en catalasa, e incrementando los niveles de ROS intracelulares a través de la activación del receptor de IGF-1 y la vía de Ras/Raf/Erk1/2.

Los resultados del presente trabajo han permitido dilucidar parte de los mecanismos intracelulares implicados en el desarrollo de senescencia celular prematura en células mesangiales humanas en la diabetes y el envejecimiento. Un moderado estrés osmótico provocado por las altas concentraciones de glucosa sanguíneas y los productos de glicosilación avanzada, como la albúmina glicosilada, contribuyen al desarrollo de la senescencia celular prematura en células mesangiales humanas pudiendo ser responsables, en parte, del envejecimiento renal.

CONCLUSIONES

- La exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa y productos de glicosilación avanzada, dos compuestos que pueden estar presentes en pacientes diabéticos, inducen senescencia en células mesangiales humanas mediante mecanismos intracelulares diferentes.
- Las altas concentraciones de glucosa promueven un leve aumento en la osmolaridad del medio extracelular. Este cambio en la osmolaridad es el causante de la senescencia celular inducida por HG, a través de la producción de ROS y la activación constitutiva del oncogén Ras y las quinasas activadas por mitógenos Erk1/2 y p38.
- La albúmina glicosilada induce senescencia en células mesangiales humanas a través de la activación de la vía de IGF-1 y un descenso en la expresión de la enzima antioxidante catalasa. El efecto se previene induciendo la expresión del gen anti-envejecimiento Klotho, lo que puede abrir camino a una posible diana terapéutica para frenar la progresión de la enfermedad renal en la diabetes y en el envejecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

A

-
- Abboud HE: **Mesangial cell biology**. *Exp Cell Res* 2012.
- Alarcon-Vargas D, Ronai Z: **p53-Mdm2--the affair that never ends**. *Carcinogenesis* 2002, **23**(4):541-547.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC: **Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(24):13742-13747.
- Alfieri RR, Petronini PG: **Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses**. *Pflugers Arch* 2007, **454**(2):173-185.
- An XF, Zhou L, Jiang PJ, Yan M, Huang YJ, Zhang SN, Niu YF, Ten SC, Yu JY: **Advanced glycation end-products induce heparanase expression in endothelial cells by the receptor for advanced glycation end products and through activation of the FOXO4 transcription factor**. *Mol Cell Biochem* 2011, **354**(1-2):47-55.
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E: **The IGF system**. *Acta Diabetol* 2011, **48**(1):1-9.
- Arner RJ, Prabhu KS, Krishnan V, Johnson MC, Reddy CC: **Expression of myo-inositol oxygenase in tissues susceptible to diabetic complications**. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **339**(3):816-820.
- Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP: **Insulin signaling and life span**. *Pflugers Arch* 2010, **459**(2):301-314.

B

-
- Bak M, Thomsen K, Christiansen T, Flyvbjerg A: **Renal enlargement precedes renal hyperfiltration in early experimental diabetes in rats**. *J Am Soc Nephrol* 2000, **11**(7):1287-1292.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: **Mitochondria, oxidants, and aging**. *Cell* 2005, **120**(4):483-495.

- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A: **Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species.** *Physiol Rev* 2009, **89**(1):27-71.
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M: **Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.** *J Immunol* 1983, **130**(4):1910-1917.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R: **Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes.** *Cardiovasc Res* 2004, **63**(4):582-592.
- Baynes JW: **Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.** *Diabetes* 1991, **40**(4):405-412.
- Ben-Porath I, Weinberg RA: **The signals and pathways activating cellular senescence.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**(5):961-976.
- Bjorck L, Kronvall G: **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.** *J Immunol* 1984, **133**(2):969-974.
- Blackburn EH: **Switching and signaling at the telomere.** *Cell* 2001, **106**(6):661-673.
- Blagosklonny MV: **Cell cycle arrest is not senescence.** *Aging (Albany NY)* 2011, **3**(2):94-101.
- Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C: **Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase.** *FEBS Lett* 2009, **583**(19):3221-3224.
- Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G: **Advanced glycation end products and the kidney.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**(4):F645-659.
- Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K *et al*: **Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice.** *PLoS One* 2008, **3**(3):e1759.
- Bortner CD, Cidlowski JA: **Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes.** *Am J Physiol* 1996, **271**(3 Pt 1):C950-961.

- Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Calvi C, Gambino R, Cassader M, Salvidio G, Deferrari G, Camussi G, Pegoraro L *et al*: **RAGE- and TGF-beta receptor-mediated signals converge on STAT5 and p21waf to control cell-cycle progression of mesangial cells: a possible role in the development and progression of diabetic nephropathy.** *FASEB J* 2004, **18**(11):1249-1251.
- Brookes S, Rowe J, Ruas M, Llanos S, Clark PA, Lomax M, James MC, Vatcheva R, Bates S, Vousden KH *et al*: **INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence.** *EMBO J* 2002, **21**(12):2936-2945.
- Brown JP, Wei W, Sedivy JM: **Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts.** *Science* 1997, **277**(5327):831-834.
- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**(6):857-868.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME: **Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a).** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(3):952-965.
- Burg MB, Kador PF: **Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes.** *J Clin Invest* 1988, **81**(3):635-640.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI: **Cellular response to hyperosmotic stresses.** *Physiol Rev* 2007, **87**(4):1441-1474.

C

- Campisi J: **Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors.** *Cell* 2005, **120**(4):513-522.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F: **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(9):729-740.
- Campisi J: **Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective.** *Curr Opin Genet Dev* 2011, **21**(1):107-112.

- Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR: **Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(50):19796-19801.
- Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS: **Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells.** *Circ Res* 2002, **90**(12):1290-1298.
- Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, Bloomgarden NA, Darzynkiewicz Z, Goligorsky MS: **Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, **290**(4):H1575-1586.
- Chomczynski P: **A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.** *Biotechniques* 1993, **15**(3):532-534, 536-537.
- Colavitti R, Finkel T: **Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence.** *IUBMB Life* 2005, **57**(4-5):277-281.

D

- d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP: **Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response.** *Genes Dev* 2004, **18**(15):1781-1799.
- DeNicola GM, Tuveson DA: **RAS in cellular transformation and senescence.** *Eur J Cancer* 2009, **45 Suppl 1**:211-216.
- Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R: **Telomeres, telomerase and cancer: an update.** *Virchows Arch* 2000, **437**(1):1-16.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A *et al*: **Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication.** *Nature* 2006, **444**(7119):638-642.

- Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, Medina J, Boyano-Adanez MC, Arilla E, Torrecilla G, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M: **Effects of somatostatin on cultured human mesangial cells.** *Endocrinology* 1995, **136**(8):3444-3451.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O *et al*: **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(20):9363-9367.
- Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB: **Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(8):2317-2322.
- Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N *et al*: **Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice.** *J Biol Chem* 2011, **286**(10):8655-8665.
- Drummond K, Mauer M: **The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2002, **51**(5):1580-1587.
- Duan C, Ren H, Gao S: **Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation.** *Gen Comp Endocrinol* 2010, **167**(3):344-351.

E

- Einarson MB, Pugacheva EN, Orlicki JR: **GST Pull-down.** *CSH Protoc* 2007, **2007**:pdb prot4757.
- Elledge SJ: **Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.** *Science* 1996, **274**(5293):1664-1672.
- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR: **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu Rev Cell Biol* 1991, **7**:663-698.

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.** *Biochim Biophys Acta* 1971, **251**(3):427-434.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T: **Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.** *Cell* 1983, **33**(2):389-396.

F

Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ: **The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways.** *Cancer Res* 2007, **67**(7):3043-3053.

Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Mauer M: **Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression.** *Kidney Int* 1995, **48**(6):1929-1935.

Funayama R, Ishikawa F: **Cellular senescence and chromatin structure.** *Chromosoma* 2007, **116**(5):431-440.

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N: **FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal* 2005, **7**(5-6):752-760.

G

Gable KL, Maddux BA, Penaranda C, Zavodovskaya M, Campbell MJ, Lobo M, Robinson L, Schow S, Kerner JA, Goldfine ID *et al*: **Diarylureas are small-molecule inhibitors of insulin-like growth factor I receptor signaling and breast cancer cell growth.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(4):1079-1086.

Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Diaz-Araya G, Lavandero S: **A rapid and strong apoptotic process is triggered**

- by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes.** *Cell Tissue Res* 2001, **304**(2):279-285.
- Gardner RD, Burke DJ: **The spindle checkpoint: two transitions, two pathways.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**(4):154-158.
- Ghodsi A, Stein C, Derksen T, Martins I, Anderson RD, Davidson BL: **Systemic hyperosmolality improves beta-glucuronidase distribution and pathology in murine MPS VII brain following intraventricular gene transfer.** *Exp Neurol* 1999, **160**(1):109-116.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA: **Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury.** *Circulation* 2006, **114**(6):597-605.
- Goyal MM, Basak A: **Human catalase: looking for complete identity.** *Protein Cell* 2010, **1**(10):888-897.
- Gugliucci A, Bendayan M: **Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry.** *J Histochem Cytochem* 1995, **43**(6):591-600.

H

- Ha H, Kim KH: **Future of interventions in diabetic nephropathy: antioxidants.** *Perit Dial Int* 1999, **19 Suppl 2**:S228-233.
- Ha H, Lee HB: **Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose.** *Kidney Int Suppl* 2000, **77**:S19-25.
- Haigis MC, Sinclair DA: **Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance.** *Annu Rev Pathol* 2010, **5**:253-295.
- Haigis MC, Yankner BA: **The aging stress response.** *Mol Cell* 2010, **40**(2):333-344.
- Hancock JF: **Ras proteins: different signals from different locations.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(5):373-384.

- Harley CB, Futcher AB, Greider CW: **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature* 1990, **345**(6274):458-460.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS *et al*: **Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice.** *Nature* 2009, **460**(7253):392-395.
- Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Feraille E, Martin PY: **Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(6):1521-1531.
- Hayflick L: **The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains.** *Exp Cell Res* 1965, **37**:614-636.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y: **IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice.** *Nature* 2003, **421**(6919):182-187.
- Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K: **Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **236**(2):327-332.
- Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ: **Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?** *Free Radic Biol Med* 2008, **44**(3):235-246.
- Huang HC, Preisig PA: **G1 kinases and transforming growth factor-beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes-induced renal growth.** *Kidney Int* 2000, **58**(1):162-172.

I

- Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T: **Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **339**(3):827-832.

Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y: **Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane.** *FEBS Lett* 2004, **565**(1-3):143-147.

Iwasa H, Han J, Ishikawa F: **Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.** *Genes Cells* 2003, **8**(2):131-144.

K

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG: **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metab* 2005, **1**(1):15-25.

Kaneko M, Carper D, Nishimura C, Millen J, Bock M, Hohman TC: **Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and Chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions.** *Exp Cell Res* 1990, **188**(1):135-140.

Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR: **Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2008, **233**(1):4-11.

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R: **A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type.** *Nature* 1993, **366**(6454):461-464.

Kenyon C: **The plasticity of aging: insights from long-lived mutants.** *Cell* 2005, **120**(4):449-460.

Kenyon CJ: **The genetics of ageing.** *Nature* 2010, **464**(7288):504-512.

Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G: **daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans.** *Science* 1997, **277**(5328):942-946.

Klapper W, Parwaresch R, Krupp G: **Telomere biology in human aging and aging syndromes.** *Mech Ageing Dev* 2001, **122**(7):695-712.

- Kohler B, Schumacher V, Schulte-Overberg U, Biewald W, Lennert T, l'Allemand D, Royer-Pokora B, Gruters A: **Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygous mutation in the WT1 gene.** *Pediatr Res* 1999, **45**(2):187-190.
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM: **Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B.** *Nature* 1999, **398**(6728):630-634.
- Krtolica A, Campisi J: **Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma.** *Int J Biochem Cell Biol* 2002, **34**(11):1401-1414.
- Kuan CJ, al-Douahji M, Shankland SJ: **The cyclin kinase inhibitor p21WAF1, CIP1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy.** *J Am Soc Nephrol* 1998, **9**(6):986-993.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E *et al*: **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.** *Nature* 1997, **390**(6655):45-51.
- Kuro-o M: **Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006, **15**(4):437-441.
- Kuro-o M: **Klotho.** *Pflugers Arch* 2010, **459**(2):333-343.
- Kuro-o M: **Overview of the FGF23-Klotho axis.** *Pediatr Nephrol* 2010, **25**(4):583-590.
- Kuro-o M: **Klotho and the aging process.** *Korean J Intern Med* 2011, **26**(2):113-122.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H *et al*: **Suppression of aging in mice by the hormone Klotho.** *Science* 2005, **309**(5742):1829-1833.
- Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW *et al*: **Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.** *J Biol Chem* 2006, **281**(10):6120-6123.
- Kurosu H, Kuro OM: **The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors.** *Mol Cell Endocrinol* 2009, **299**(1):72-78.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD: **Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.** *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 20):3613-3622.

Kwon ES, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA: **A new DAF-16 isoform regulates longevity.** *Nature* 2010, **466**(7305):498-502.

L

Le Roith D: **The insulin-like growth factor system.** *Exp Diabesity Res* 2003, **4**(4):205-212.

Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T: **Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species.** *J Biol Chem* 1999, **274**(12):7936-7940.

Levin-Iaina N, Iaina A, Raz I: **The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats.** *Diabetes Metab Res Rev*, **27**(3):235-243.

Liang C, Ren Y, Tan H, He Z, Jiang Q, Wu J, Zhen Y, Fan M, Wu Z: **Rosiglitazone via upregulation of Akt/eNOS pathways attenuates dysfunction of endothelial progenitor cells, induced by advanced glycation end products.** *Br J Pharmacol* 2009, **158**(8):1865-1873.

Lin CL, Wang FS, Kuo YR, Huang YT, Huang HC, Sun YC, Kuo YH: **Ras modulation of superoxide activates ERK-dependent fibronectin expression in diabetes-induced renal injuries.** *Kidney Int* 2006, **69**(9):1593-1600.

Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira, II, Schimel D, Kuo CJ *et al*: **Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging.** *Science* 2007, **317**(5839):803-806.

Lloyd AC: **Limits to lifespan.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(2):E25-27.

Loew O: **A New Enzyme of General Occurrence in Organisms.** *Science* 1900, **11**(279):701-702.

M

- Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Novoa JM: **Involvement of small Ras GTPases and their effectors in chronic renal disease.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(3):477-492.
- McCarty MF: **Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging.** *Med Hypotheses* 2004, **63**(2):334-339.
- McManus ML, Churchwell KB, Strange K: **Regulation of cell volume in health and disease.** *N Engl J Med* 1995, **333**(19):1260-1266.
- Melk A: **Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications.** *Nephrol Dial Transplant* 2003, **18**(12):2474-2478.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS: **BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.** *Nature* 2005, **436**(7051):720-724.
- Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB: **Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, **278**(2):F209-218.
- Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M *et al*: **In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage.** *Hypertension* 2002, **39**(4):838-843.
- Miyai A, Yamauchi A, Nakanishi T, Sugita M, Takamitsu Y, Yokoyama K, Itoh T, Andou A, Kamada T, Ueda N *et al*: **Na⁺/myo-inositol cotransport is regulated by tonicity in cultured rat mesangial cells.** *Kidney Int* 1995, **47**(2):473-480.
- Morgan DO: **Principles of CDK regulation.** *Nature* 1995, **374**(6518):131-134.
- Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT, d'Azzo A: **Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein.** *J Biol Chem* 1989, **264**(34):20655-20663.

N

Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM: **The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression.** *J Biol Chem* 2000, **275**(49):38275-38280.

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW: **Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence.** *Cell* 2003, **113**(6):703-716.

Nasmyth K, Peters JM, Uhlmann F: **Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids.** *Science* 2000, **288**(5470):1379-1385.

O

Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E: **The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression.** *J Med Invest* 2004, **51**(3-4):146-153.

Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM: **The role of oxidative stress in the aging process.** *ScientificWorldJournal* 2010, **10**:1121-1128.

Olsen CL, Gardie B, Yaswen P, Stampfer MR: **Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion.** *Oncogene* 2002, **21**(41):6328-6339.

P

Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A: **Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference.** *Mol Cell* 2000, **6**(5):1077-1087.

Pines J: **Cyclins: wheels within wheels.** *Cell Growth Differ* 1991, **2**(6):305-310.

Pines J: **Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations.** *Adv Cancer Res* 1995, **66**:181-212.

- Plovins A, Alvarez AM, Ibanez M, Molina M, Nombela C: **Use of fluorescein-di-beta-D-galactopyranoside (FDG) and C12-FDG as substrates for beta-galactosidase detection by flow cytometry in animal, bacterial, and yeast cells.** *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**(12):4638-4641.
- Pugliese G, Pricci F, Locuratolo N, Romeo G, Romano G, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Di Mario U: **Increased activity of the insulin-like growth factor system in mesangial cells cultured in high glucose conditions. Relation to glucose-enhanced extracellular matrix production.** *Diabetologia* 1996, **39**(7):775-784.
- Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Pugliese F, Mene P, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Vlassara H *et al*: **Upregulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism.** *Diabetes* 1997, **46**(11):1881-1887.

R

- Raccach D, Coste T, Cameron NE, Dufayet D, Vague P, Hohman TC: **Effect of the aldose reductase inhibitor tolrestat on nerve conduction velocity, Na/K ATPase activity, and polyols in red blood cells, sciatic nerve, kidney cortex, and kidney medulla of diabetic rats.** *J Diabetes Complications* 1998, **12**(3):154-162.
- Rapp R, Deger A, Blum W, Koch R, Weber U: **Characterization of the protein which binds insulin-like growth factor in human serum.** *Eur J Biochem* 1988, **172**(2):421-425.
- Rodier F, Campisi J: **Four faces of cellular senescence.** *J Cell Biol* 2011, **192**(4):547-556.
- Rosas-Rodriguez JA, Valenzuela-Soto EM: **Enzymes involved in osmolyte synthesis: how does oxidative stress affect osmoregulation in renal cells?** *Life Sci* 2010, **87**(17-18):515-520.

Royall JA, Ischiropoulos H: **Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells.** *Arch Biochem Biophys* 1993, **302**(2):348-355.

S

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**(4839):487-491.

Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM: **Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach.** *Nephrol Dial Transplant* 1997, **12**(4):664-668.

Salih DA, Brunet A: **FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**(2):126-136.

Sansone RA, Sansone LA: **Getting a Knack for NAC: N-Acetyl-Cysteine.** *Innov Clin Neurosci* 2011, **8**(1):10-14.

Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G: **The IGF axis and hepatocarcinogenesis.** *Mol Pathol* 2001, **54**(3):138-144.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H: **Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula.** *J Mol Med (Berl)* 2006, **84**(11):901-910.

Schlondorff D: **Roles of the mesangium in glomerular function.** *Kidney Int* 1996, **49**(6):1583-1585.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D: **Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis.** *Circ Res* 1999, **84**(5):489-497.

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H *et al*: **Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria.** *Science* 2005, **308**(5730):1909-1911.

- Scindia YM, Deshmukh US, Bagavant H: **Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention.** *Adv Drug Deliv Rev* 2010, **62**(14):1337-1343.
- Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V: **Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(5):1552-1564.
- Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L: **Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype?** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010, **65**(9):963-975.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW: **Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.** *Cell* 1997, **88**(5):593-602.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS: **Oxidative stress and cell cycle checkpoint function.** *Free Radic Biol Med* 2000, **28**(9):1387-1404.
- Sheikh-Hamad D, Gustin MC: **MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, **287**(6):F1102-1110.
- Shen GX: **Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase.** *Can J Physiol Pharmacol* 2010, **88**(3):241-248.
- Sherr CJ, McCormick F: **The RB and p53 pathways in cancer.** *Cancer Cell* 2002, **2**(2):103-112.
- Sherr CJ, Roberts JM: **Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.** *Genes Dev* 1995, **9**(10):1149-1163.
- Simboeck E, Ribeiro JD, Teichmann S, Di Croce L: **Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus.** *Biochem Pharmacol* 2011, **82**(10):1361-1370.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: **Advanced glycation end-products: a review.** *Diabetologia* 2001, **44**(2):129-146.

- Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA: **Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor.** *J Biol Chem* 1988, **263**(23):11486-11492.
- Storz P: **Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **14**(4):593-605.
- Suzuki K, Matsubara H: **Recent advances in p53 research and cancer treatment.** *J Biomed Biotechnol* 2011, **2011**:978312.

T

- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: **Small GTP-binding proteins.** *Physiol Rev* 2001, **81**(1):153-208.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**(9):4350-4354.
- Tsirpanlis G: **Cellular senescence, cardiovascular risk, and CKD: a review of established and hypothetical interconnections.** *Am J Kidney Dis* 2008, **51**(1):131-144.
- Tyson JJ, Csikasz-Nagy A, Novak B: **The dynamics of cell cycle regulation.** *Bioessays* 2002, **24**(12):1095-1109.
- Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G: **FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1813**(11):1938-1945.

U

- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.** *Nature* 2006, **444**(7120):770-774.

V

- Vandenberk B, Brouwers B, Hatse S, Wildiers H. **p16^{INK4a}: A central player in cellular senescence and a promising aging biomarker in elderly cancer patients.** *Journal of geriatric oncology* 2011, 259-269.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif* 2003, **36**(3):131-149.

W

- Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C: **Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway.** *Kidney Int* 2001, **60**(3):858-871.
- Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: **High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta.** *Kidney Int* 1992, **42**(3):647-656.
- Wolf G: **Cell cycle regulation in diabetic nephropathy.** *Kidney Int Suppl* 2000, **77**:S59-66.
- Wolf G, Reinking R, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ: **Erk 1,2 phosphorylates p27(Kip1): Functional evidence for a role in high glucose-induced hypertrophy of mesangial cells.** *Diabetologia* 2003, **46**(8):1090-1099.
- Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP *et al*: **Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer.** *Oncogene* 2008, **27**(56):7094-7105.
- Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM: **TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(16):5753-5760.
- Wright WE, Shay JW: **Historical claims and current interpretations of replicative aging.** *Nat Biotechnol* 2002, **20**(7):682-688.

Wu J, Zhu AX: **Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma.** *J Hematol Oncol* 2011, **4**:30.

Y

Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, Makita Z: **Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**(23):20309-20315.

Yamagishi SI, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S: **Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes.** *Biochim Biophys Acta* 2011.

Yamauchi A, Miyai A, Yokoyama K, Itoh T, Kamada T, Ueda N, Fujiwara Y: **Response to osmotic stimuli in mesangial cells: role of system A transporter.** *Am J Physiol* 1994, **267**(5 Pt 1):C1493-1500.

Yang CW, Vlassara H, Peten EP, He CJ, Striker GE, Striker LJ: **Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(20):9436-9440.

Yang H, Fogo AB: **Cell senescence in the aging kidney.** *J Am Soc Nephrol* 2010, **21**(9):1436-1439.

Yang T, Zhang A, Honeggar M, Kohan DE, Mizel D, Sanders K, Hoidal JR, Briggs JP, Schnermann JB: **Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin.** *J Biol Chem* 2005, **280**(41):34966-34973.

Yi J, Luo J: **SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1804**(8):1684-1689.

Young AR, Narita M: **SASP reflects senescence.** *EMBO Rep* 2009, **10**(3):228-230.

Z

- Zhang H: **Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging.** *J Cell Physiol* 2007, **210**(3):567-574.
- Zhang Z, Yang XY, Cohen DM: **Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction.** *Am J Physiol* 1999, **276**(5 Pt 2):F786-793.
- Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, Burg MB: **High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(25):9491-9496.
- Zhou X, Ferraris JD, Cai Q, Agarwal A, Burg MB: **Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**(2):F377-385.
- Zhou X, Ferraris JD, Burg MB: **Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, **290**(5):F1169-1176.
- Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG: **The aging kidney.** *Kidney Int* 2008, **74**(6):710-720.
- Zong H, Ward M, Stitt AW: **AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy.** *Curr Diab Rep* 2011, **11**(4):244-252.
- Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr.: **Production and actions of superoxide in the renal medulla.** *Hypertension* 2001, **37**(2 Part 2):547-553.

