



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Actividades
aminopeptidásicas en
microvesículas y
exosomas urinarios de
ratas hipertensas**

Alumno: Verónica Gutiérrez Montes

Junio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Actividades
aminopeptidásicas en
microvesículas y
exosomas urinarios de
ratas hipertensas**

Alumno: Verónica Gutiérrez Montes

Junio, 2017

Índice

1.INTRODUCCIÓN	5
1.1.1. Exosomas.....	6
1.1.1.1 Composición de exosomas.....	7
1.1.2. Biomarcadores.	8
1.1.3. Biosíntesis.	9
1.2. Aminopeptidasas.....	12
1.2.1. Alanina aminopeptidasa, (AlaAp).	12
1.2.2. Glutamil aminopeptidasa, (GluAp).....	13
1.2.3. Dipeptidil peptidasa-4, (dpp4).....	13
1.3. Hipertensión y enfermedades renales.....	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Materiales:.....	16
3.1.1. Animales de experimentación.....	16
3.1.2. Equipamiento de laboratorio:.....	16
3.1.2.1. Material inventariable:	16
3.1.2.2. Material fungible:	17
3. 2. Métodos:.....	17
3.2.1. Acondicionamiento de los animales y preparación de las muestras:	17
3.2.2. Análisis bioquímico.....	18
3.2.2.1. Determinación de AlaAp, GluAp y DPP4:.....	19
3.2.2.2. Determinación de proteína total:.....	20
3.2.2.3. Determinación de creatinina:	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Diferencias significativas en la presión arterial sistólica de ratas WKY y ratas SHR a los 2 meses de edad.....	21
4.2. Diferencias significativas en la presión arterial sistólica de ratas WKY y ratas SHR, a los 8 meses de edad.....	22
4.3 Diferencias en la concentración de proteína exosomal de ratas WKY y ratas SHR.....	22
4.4 Diferencias en la frecuencia cardíaca entre ratas WKY y ratas SHR a los 2 meses.	23
4.5 Diferencias en la frecuencia cardíaca entre ratas WKY y ratas SHR a los 8 meses.	23
4.6. Variables metabólicas al final del experimento.....	24
4.7 Variables renales y urinarias al final del experimento.....	25

4.8 Variables morfológicas al final del experimento.	26
4.9 Correlación de DPP4 con la presión arterial sistólica (PAS).	27
4.9.1 Correlación de los valores de DPP4 con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), ambos tomados a los 2 meses de edad.	27
4.9.2. Correlación de los valores de DPP4 recogidos a los 2 meses de edad con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), recogidos a los 8 meses de edad.	28
4.10. Correlación de GluAP con respecto a la presión arterial sistólica (PAS).	29
4.10.1. Correlación de los valores de GluAp con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), ambos tomadas a los 2 meses de edad.	29
4.10.2. Correlación de los valores de GluAp, tomados a los 2 meses de edad con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), tomados a los 8 meses de edad.	30
4.11. Correlación de AlaAP con respecto a la presión arterial sistólica (PAS).	31
4.11.1. Correlación de los valores de AlaAp, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) ambos tomados a los 2 meses de edad.	31
4.11.2. Correlación de los valores de AlaAp, tomados a los 2 meses de edad, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) tomados a los 8 meses de edad.	32
4.12. Concentración enzimática en exosomas.	33
4.13. Concentración enzimática en microvesículas.	34
4.14 Concentración enzimática en el sobrenadante.	35
5. DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIONES.	39
7. BIBLIOGRAFÍA:	40

RESUMEN.

Este trabajo se centra principalmente en el estudio de las enzimas urinarias glutamil aminopeptidasa (GluAP), alanil aminopeptidasa (AlaAP) y dipeptidil peptidasa-4 (DPP4), y determinar si estas actividades enzimáticas medidas en las fracciones microvesicular y exosómica de la orina, sirven como biomarcadores tempranos del daño renal asociado a la hipertensión arterial crónica. En las muestras de orina recogidas se analizó la actividad de las aminopeptidasas anteriormente citadas junto a la concentración de creatinina y proteinuria, pudiendo así observar que la proteinuria no se modificaba, mientras que la actividad de estas aminopeptidasas urinarias aumentaba de forma estadísticamente significativa en las ratas hipertensas (SHR), en comparación con las ratas normotensas (WKY). Además, se observaron diferencias en el peso, ingesta hídrica, ingesta alimenticia, presión arterial sistólica y diuresis. También se observó una correlación significativa entre la actividad aminopeptidásica urinaria y el nivel de presión arterial.

ABSTRACT.

This project is mainly focused on the study of the urinary enzymes glutamyl aminopeptidase (GluAP), alanyl aminopeptidase (AlaAP) and dipeptidyl peptidase+IV (DPP4) in order to determine if these enzymatic activities measured in microvesicular and exosomatic urine fractions, serve as an early biomarket for kidney damage associated with chronic arterial hypertension. In the urine samples collected, the activity of the previously cited aminopeptidase was analysed, along with the concentration of creatinine and proteinuria, this lead us to believe that the proteinuria was not modified; meanwhile the activity of these urinary aminopeptidasas increased by a statistically significant amount in the hypertensive rats (SHR), in comparison with normotensive rats (WKY). In addition, differences in weight, water intake, dietary intake, systolic blood pressure and diuresis were also observed. A significant correlation between the aminopeptidase activity in urine and the blood pressure level was also detected.

Key Words: AlaAp, GluAp, DPP4, Aminopeptidasas, Exosomas, Microvesículas, Hipertensión.

1.INTRODUCCIÓN

Actualmente son muchos los equipos de investigación dedicados al estudio del cuerpo humano con el fin de avanzar en el conocimiento del mismo, para así lograr descifrar el total funcionamiento de este. Hace aproximadamente dos décadas, se realizó un estudio en el que se describió un tipo de microvesícula, constituida por un complejo multiproteico, denominada exosoma. A día de hoy se sabe que estas estructuras desempeñan un sin fin de funciones biológicas dentro del organismo.

1.1. Vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares (VE) son partículas formadas por una bicapa lipídica originadas tanto en el interior celular como en la membrana plasmática. Estas estructuras poseen proteínas, lípidos y RNA que pueden afectar fisiológicamente a las células bañadas por determinados fluidos proximales. El tamaño, composición y contenido de estas estructuras puede variar en relación al tipo celular, al estado en el que se encuentre la célula y a las condiciones ambientales. Dentro de las mismas podemos diferenciar entre exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos, en función del tamaño que posean y básicamente difieren en su composición y origen subcelular (48,1).

Participan en la comunicación intercelular mediante el traspaso célula-célula de material proteico y genético procedente de la célula de origen. (figura 1).

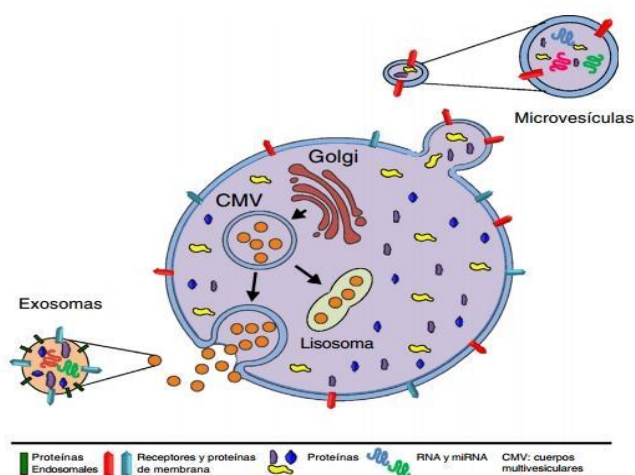


Figura 1 - Origen y composición de las vesículas extracelulares.

Figura 1. Origen y composición de las vesículas extracelulares.

1.1.1. Exosomas.

Conocemos como exosomas a pequeñas microvesículas extracelulares (EVs) secretadas por las células, que se constituyen por una bicapa lipídica, que pueden ser localizadas en diferentes tipos de fluidos corporales como son la saliva, la orina, el plasma, etc (18).

Son estructuras con un tamaño aproximado de 30-150 nm. Este tipo de vesículas han despertado bastante interés en el ámbito de la investigación, pues son una puerta al conocimiento del correcto funcionamiento del organismo, tanto en la biología general, como en la inmunología.

Este tipo de partículas tienen un origen endocítico y están presentes en la mayoría de los fluidos corporales cumpliendo la función de transportador para diferentes tipos de moléculas, como pueden ser proteínas, lípidos, ARNm, ARN no codificante, ADN, etc. Este tipo de vesículas tienen la capacidad de variar su contenido en función de las determinadas condiciones fisiológicas y/o patológicas así como del tipo de célula de la que procedan, contienen ARN y microARN pero están desprovistos de ADN.

Tienen su origen en el proceso de formación de los cuerpos multivesiculares o bien mediante la evaginación de la membrana plasmática (también denominados ectosomas). Cuando ha finalizado la formación de los mismos, se procede a la liberación al espacio extracelular, paso que les permitirá comenzar con la función que han de realizar, bien liberándose directamente por exocitosis mediante diferentes tipos de células como células dendríticas, reticulocitos, linfocitos B, varios tipos de células madre, células epiteliales o endoteliales o mediante la fusión de los cuerpos multivesiculares, (44), (46), (35), (50), (51-56), (10).

Los exosomas están implicados en la comunicación célula-célula pudiendo transferir la información de varias formas: fusionándose con la membrana citoplasmática, mediante la interacción ligando-receptor o bien por fagocitosis. Gracias a esta función se ha podido comprobar la importante actividad que desempeñan los exosomas en el cáncer, al transferir proteína oncogénica y ácidos nucleicos, a las células receptoras y de esta forma modificando y

controlando su actividad. A estas funciones hay que añadirle la capacidad que poseen los exosomas para desempeñar el papel de biomarcadores en enfermedades como el cáncer o enfermedades inmunodeficientes como el SIDA.

1.1.1.1 Composición de exosomas.

Como hemos explicado anteriormente, en función del tipo celular, los exosomas tendrán una determinada composición u otra. Sin embargo, existe un conjunto proteico que reaparece en diferentes análisis proteómicos y que nos indican que parecen estar presente en los exosomas, sea cual sea su origen celular.

En este conjunto proteico podemos diferenciar:

- Proteínas citosólicas, que a su vez se diversifican en proteínas Rabs y Anexinas. Proteínas Rabs: pertenecientes a las GTPasas, llevan a cabo la regulación del acoplamiento del exosoma, así como la fusión de membranas (28). Estas proteínas cuando se activan interaccionan con otras proteínas implicadas en el transporte vesicular y en complejos proteicos, los cuales desempeñan un papel relevante en la fusión de la vesícula con la membrana aceptora. Anexinas: son estructuras implicadas en el tráfico y fusión de membranas.

- Proteínas de choque térmico: Son proteínas que desempeñan su papel en la presentación del antígeno, participando así en la incorporación del péptido al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), entre las cuales podemos diferenciar: Hsp60, Hsp70, HspA5, Cct2 y Hsp90.
- Proteínas implicadas en la biogénesis de cuerpos multivesiculares: donde diferenciamos Alix, Tsg101 y clatrina.

- Proteínas específicas: MHCI, MHCII, implicadas en exosomas que proceden de células presentadoras de antígenos. CD86, identificadas en exosomas que proceden de DCs. Proteínas transmembrana, donde diferenciamos cadenas α y β de integrinas, peptidasas, e inmunoglobulinas ICAM1 (40, 30, 16).
- Otros: Se han encontrado también enzimas implicadas en señales de traducción, enzimas metabólicas, ATPasas, proteínas citoesqueléticas.

1.1.2. Biomarcadores.

En los años 90 se produjo el hallazgo de un innovador sistema de comunicación intercelular, mediante el cual se llevaba a cabo la liberación al espacio extracelular de vesículas provistas de partículas biológicamente activas, como proteínas, miRNA, mRNA, metabolitos, etcétera. Dichas vesículas tienen la ardua tarea de controlar procesos fisiológicos, desarrollo y evolución de enfermedades.

Numerosos estudios han detallado que existen proteínas asociadas con enfermedades renales, detectadas en exosomas urinarios, lo cual aportaría una fuente de información que otorga un papel fundamental a los exosomas como biomarcadores, no sólo en enfermedades renales, sino también estarían implicados en la detección del cáncer, así como en patologías, enfermedades infecciosas.

La mayor parte de las células que componen un determinado organismo liberan fisiológicamente las vesículas al medio, como forma de comunicación célula-célula. Concretamente las vesículas extracelulares detectadas en la orina dan una visión acerca del estado en el que se encuentra el sistema urinario, desempeñando con ello un magnífico papel como fuente de información para el estudio fisiológico y patológico del sistema renal.

Son distintas las funciones que pueden desempeñar las vesículas extracelulares, como por ejemplo patogénesis, administración de vectores génicos, fármacos o excelentes biomarcadores (29, 13, 6).

Estas vesículas pueden variar su composición (plaquetas, células inmunológicas, neuronas, etc) y ubicación (plasma, saliva, orina), en relación al trabajo que realizan, (17, 53). Entre ellas diferenciamos exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos. El distinto origen subcelular del transporte eléctrico representa una composición y función específica para cada tipo de EV, de tal forma que cada uno de ellos posee un conjunto determinado de proteínas comunes, vinculados con la biosíntesis y el transporte desde la célula origen (26).

Así mismo, analizando el proteoma y el contenido en ácidos nucleicos de las EVs, se conoce el estado en el que se encuentra la célula o el tejido de origen, así como la situación fisiológica de la misma, (12, 14, 24, 42).

Uno de los fluidos ideales para determinar y analizar biomarcadores es la orina, pero hay que tener en cuenta que esta está constituida por una mezcla de proteínas, sales, metabolitos, urea y otros compuestos cuya concentración varía en función de la fisiología o en presencia de enfermedades renales, (2, 34). Esta concentración proteica está estrechamente relacionada con la tasa de filtración glomerular (GFR), de la reabsorción tubular, de la dieta que lleve a cabo el individuo, el nivel de hidratación, etc. Con todo ello, cuando se realiza un análisis de orina, en función de los resultados obtenidos podríamos interpretar que una alteración en la concentración de una determinada proteína indicaría la presencia de un posible trastorno tisular o un trastorno fisiopatológico.

Estudios realizados en muestras de orina han determinado que aproximadamente un 3% de las proteínas presentes en la orina, se encuentran dentro de las vesículas extracelulares, por ello la información que pueden aportar los biomarcadores aquí presentes es apenas detectable al estar diluidos en la muestra entera orina.

Por ello, la evaluación de ciertos biomarcadores específicos presentes en la orina y relacionados con las vesículas extracelulares son de gran interés a la hora de diagnosticar alteraciones renales (6).

1.1.3. Biosíntesis.

Diferentes estudios han determinado que los exosomas poseen un origen endosómico y todos aquellos que han sido aislados han planteado la hipótesis de que este tipo de estructuras poseen proteínas únicamente procedentes del citosol. Así mismo, se han encontrado también gran cantidad de proteínas citosólicas (detectadas en exosomas) desempeñando un papel en la vía endocítica, como son Rab5/Rab7, anexinas y Tsg1001. Todo esto, respalda la idea de que los exosomas tienen un origen endosómico.

Es interesante aclarar que en la composición de los exosomas, únicamente está presente un tipo de proteína endosómica-lisosómica, ya que estos carecen de proteasas lisosomales. A día de hoy, no se sabe con certeza el mecanismo que regula la composición de los exosomas, pero lo que sí se sabe es que la ubiquitin- ligasa desempeña un importante papel en la elección de las determinadas proteínas durante la formación de los exosomas, la cual determinará a su vez la orientación que tendrá la membrana, de tal forma que si la formación de los exosomas tiene lugar mediante invaginación hacia el interior de la membrana endosómica, los exosomas poseerán proteínas citosólicas a la misma vez que las proteínas transmembrana, presentes en la membrana exosómica, tendrán la misma orientación que la membrana plasmática.

Todo ello indica que la invaginación durante la formación de los exosomas genera una orientación inversa de la membrana. Este modelo de invaginación inversa tiene lugar en el proceso de apoptosis, al desprenderse de la membrana plasmática las vesículas de diferentes tamaños (4), así como en la liberación de estas vesículas, tras activarse las plaquetas (22).

Son diferentes los procesos mediante los cuales se produce la liberación de determinadas proteínas al espacio extracelular. Uno de los procesos más comunes es aquel mediante el cual se lleva a cabo la liberación de macromoléculas a través de la membrana plasmática, en un proceso conocido como exocitosis (Keller S. et al., 2006).

Conocemos como exocitosis al transporte desde el interior de la célula hacia el medio extracelular de moléculas empaquetadas en vesículas. La membrana vesicular, también denominada membrana secretora, se fusiona con la membrana plasmática liberando su contenido al medio extracelular. Este mecanismo genera a su vez la liberación de hormonas por parte de las células, como son la insulina, enzimas digestivas, neurotransmisores, etc.

El proceso de exocitosis se puede desencadenar bajo dos situaciones:

- Mediante producción permanente de vesículas que se liberan sin necesidad de algún estímulo (vesículas que transportan proteínas constituyentes de la matriz extracelular).
- Mediante producción de vesículas que son liberadas frente a un estímulo específico (enzimas digestivas, neurotransmisores y hormonas).

Existen varios tipos de exocitosis, entre ellas existe una vía endocítica que posee un importante papel en la biogénesis de los cuerpos multivascuales (MVB), (25).

Este proceso consiste en la internalización a través de mecanismos de invaginación de la membrana plasmática, por una vía endocítica que da lugar a los endosomas tempranos, (7) los cuales variarán su destino en función del papel que realicen; pueden reciclarse, haciendo que regresen a la superficie celular, pueden trasladarse a la red trans-golgi, (27, 8) o bien pueden dirigirse hacia la ruta de endosomas tardíos y lisosomas, (49, 33).

Para explicar la forma en la que se originan los exosomas nos centramos en el tercer destino, donde son los exosomas tempranos los que pueden dar lugar a invaginaciones de membrana, ocasionando una curvatura en la misma, hacia la cara interna del endosoma, dando lugar así a la formación de vesículas intraluminales.

Es por este proceso por el cual se originan los cuerpos multivesiculares.

Parte de las proteínas transmembrana, durante este proceso, quedan adosadas en las fracciones de membrana invaginada, mientras que otros componentes citosólicos se unen a las vesículas intraluminales, (33, 54).

Otra de las vías por las que se transfieren los endosomas tempranos hasta los lisosomas, es llevada a cabo mediante mecanismos específicos que hacen que esta vía genere MVB (cuerpos multivesiculares) exocíticos, que presentarán vesículas intraluminales con membranas ricas en complejos proteicos de tetraspaninas, así como moléculas presentadoras de antígenos de tipo MHC.

Recientes estudios han determinado que en la formación de exosomas están implicadas las ceramidas y estas son independientes de la cascada de acción de los complejos ESCRT. Por otro lado, LBPA (ácido lysobisphosphatidic fosfolípido no convencional) y alix desempeñan un papel crucial en la formación de MVB exocíticos, de manera que este proceso depende el gradiente de pH presente en membranas endosómicas in vivo y es controlado por alix, el cual a su vez controla la organización de LBPA presentes en dichos endosomas. LBPA controla a su vez la formación de ILV en la membrana endosómica tardía, la cual regula los procesos de fusión de vesículas y de membranas plasmáticas.

Por ello, determinamos que tanto LBPA como alix son partícipes selectivamente en el tráfico y reparto de lípidos y proteínas desde los endosomas a diferentes destinos, (38).

1.2. Aminopeptidasas.

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas ubicuamente dispuestas, aptas para llevar a cabo la hidrólisis de aminoácidos aminotermiales tanto de péptidos como de polipéptidos, que desempeñan una función crucial en su control tanto a nivel central, como en tejidos periféricos y/o sangre. Las funciones que estas desempeñan dan una visión del estado en el que se encuentran sus sustratos endógenos, (5).

Debido a su actividad catalítica, actúan tanto en la desactivación peptídica como en el cambio de su actividad, generando un nuevo péptido que difiere en características determinadas con su precursor.

1.2.1. Alanina aminopeptidasa, (AlaAp).

La alanina aminopeptidasa (AlaAp) lleva a cabo la catálisis de la liberación de aminoácidos N-terminales, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y distintos aminoacil-beta-naftilamidas. Son abundantes en tejidos y fluidos biológicos y poseen un pH óptimo de 6.8. Estudios han demostrado que la mayor parte de la actividad circulante es procedente del hígado, mientras que la actividad que se ha detectado en orina, se cree que tiene origen en el riñón. Altos niveles séricos de esta enzima sirven como indicadores de la presencia de patologías, como

adenocarcinoma de colon o páncreas, síndrome nefrótico o en el embarazo, (23). Frente a enfermedades hepato-biliares, tiene un característico aumento de su actividad. (9).

1.2.2. Glutamil aminopeptidasa, (GluAp).

La glutamato aminopeptidasa (GluAp) lleva a cabo la catálisis de forma específica para la hidrólisis de residuos no sustituidos de Glu y Asp-beta-naftilamida, así como de péptidos. Frecuentemente los residuos glutamilos son más fáciles de hidrolizar que los asparilos. Son inhibidos por agentes quelantes como EDTA o EGTA y amastina. Es activado por Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, etc y su pH óptimo es 7.5. Se localiza en el suero y en distintos órganos de animales y posiblemente sea la aminopeptidasa responsable de la rápida destrucción de la angiotensina II.

La aminopeptidasa A (GluAp y AspAp) están estrechamente unida a la membrana y extensamente distribuida en diferentes tejidos corporales, siendo principalmente abundante a nivel renal (20).

1.2.3. Dipeptidil peptidasa-4, (DPP4).

Dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) se trata de una exopeptidasa sérica, perteneciente a la extensa familia de las proteasas. Se conocen 10 familias de proteasas que son únicas en organismos superiores, dentro de este particular grupo la mayor parte de ellas desempeñan procesos intra y extracelulares.

Desarrollan la función de catalizadoras en la liberación de un N-terminal dipéptido, siempre y cuando el último residuo del mismo sea una prolina, hidroxiprolina, deshidroprolina o alanina. Únicamente podrán unirse a su sitio activo oligopéptidos que se encuentren en la conformación trans.

DPP4 es conocida como la proteína de unión adenosina-deaminasa y también lleva a cabo la activación del antígeno CD26 de las células T. Este tipo de molécula es expresada en diferentes tipos de células, particularmente en glándulas exocrinas y en epitelios de absorción.

La sección hidrofóbica S1 posee un catalizador de residuos, el cual es el que determina la especificidad por el sustrato. Igualmente, DPP4 es partícipe en procesos relacionados con la adhesión de la matriz celular, la migración y la

invasión de células endoteliales presentes en las matrices colágenas, la co-estimulación en la activación de las células T, así como en la interacción con determinados tipos de virus.

1.3. Hipertensión y enfermedades renales.

Varios de los estudios realizados hasta la fecha han demostrado cómo la HTA supone un factor de riesgo variable tanto en el desarrollo de la ERC, como en su desarrollo, (15, 19, 45). Por tanto, existen múltiples evidencias epidemiológicas que demuestran la relación entre la aparición y progresión de la ERC y la HTA.

En estos experimentos observacionales se detectó que la presencia de HTA determina un factor de riesgo vinculado a la progresión de la ERC y que lo hace de forma independiente a la función renal basal, la edad y la excreción urinaria de albúmina, (46). Ante esto, se determinó que existen claras evidencias epidemiológicas en las que se demuestran la estrecha relación entre la aparición y la progresión de la ERC y la presencia de HTA. El aumento de la presión arterial está relacionado con el desarrollo de la ERC mediante dos factores: la transmisión de la elevación de la presión arterial sistémica a la microvascularización renal y la presencia de proteinuria (contenido elevado de proteínas en la orina), (10, 32).

En un riñón sano existe un mecanismo que lo autorregula para mantener el flujo de sangre y la presión capilar intraglomerular de una forma constante, a pesar de la presencia de fluctuaciones en la presión arterial media, entre 80 y 160 mmHg, (8). Dicho mecanismo supone una herramienta crucial en la protección glomerular, ya que modelos animales de experimentación han demostrado que el incremento de la presión intraglomerular está vinculada con la susceptibilidad para desarrollar daño renal, (31).

Dicha respuesta de autorregulación en la circulación glomerular necesita de la colaboración de dos mecanismos:

- Mecanismo reflejomiotogénico,
- Mecanismo feedback túbulo-glomerular.

La hipertensión en el capilar glomerular está asociada con el desarrollo de esclerosis glomerular y deterioro progresivo de la función renal.

Por otra parte, la proteinuria, marcador de daño renal asociado con la HTA, es por sí mismo un factor de progresión de la ERC. El acúmulo de proteínas filtradas en las células tubulares activa rutas proinflamatorias, profibróticas y citotóxicas que contribuyen a la lesión túbulo-intersticial y fenómenos de cicatrización renal, (50). Así, la HTA favorece la progresión de la ERC mediante el empeoramiento de la función renal y el aumento de la proteinuria. La proteinuria a su vez favorece el daño renal, (31, 32, 41).

Los sistemas autorreguladores se encuentran modificados ante la presencia de determinadas patologías, como la HTA, diabetes, mellitus, ERC, etc, (47). Un riñón afectado por una patología específica posee una disfunción en sus mecanismos de autorregulación a nivel de la arteriola aferente que ocasiona el traspaso de este incremento de la presión arterial sistémica al interior del glomérulo.

2. OBJETIVOS

A día de hoy, la mecánica que interviene en el control de la hipertensión vasculorenal (HTV) no se conoce en su totalidad, pudiendo así estar involucrado el metabolismo de determinados péptidos vasoactivos. A dichos elementos se le ha atribuido un posible papel en la regulación del nivel elevado de presión en la hipertensión vasculorenal. El hecho de que la actividad aminopeptidasa desempeñe un papel crucial en el metabolismo de los péptidos locales, implicados en el mantenimiento de la presión sanguínea, da opción a poder realizar un estudio detallado de los mismos, lo que facilitaría la comprensión de la relación existente entre el sistema cardiovascular y el sistema renal. En el presente trabajo estudiaremos los efectos de la actividad enzimática de alanil aminopeptidasa (AlaAP), glutamil aminopeptidasa (GluAP) y dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) sobre enfermedades de hipertensión renal crónica y enfermedades de disyunción renal.

Nuestra hipótesis de partida en este experimento es entender la relación que guarda la actividad aminopeptidásica de AlaAP, GluAP y DPP4 con respecto a la aparición, detección y evolución de enfermedades renales. Una vez conocido su efecto, se podría determinar el uso de estas enzimas como biomarcadores tempranos de la enfermedad, estudiando así el origen y evolución de la misma y el papel que estas enzimas desempeñan en diversos procesos estrechamente relacionados con ella.

Tomando como base nuestro objetivo principal, se plantearán los correspondientes objetivos específicos:

- Conocer si existen diferencias en la ingesta hídrica, peso y diuresis entre los distintos grupos de experimentación (ratas SHR y ratas WKY).
- Estudiar si existen diferencias en la concentración de creatinina y proteinuria en las muestras de orina recogidas, en base a la fracción exosomal.
- Diagnosticar la posible relación entre la variación de concentración enzimática y/o actividad aminopeptidásica y el desarrollo de la enfermedad renal, en las fracciones de orina recogidas a lo largo del experimento (1 cada mes, durante 8 meses).
- Estudiar el efecto de esta alteración enzimática sobre el determinado estadio de la enfermedad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales:

3.1.1. Animales de experimentación.

- Grupo control: integrado por 10 ratas Wistar-Kyoto (WKY)
- Grupo experimental: integrado por 10 ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

3.1.2. Equipamiento de laboratorio:

3.1.2.1. Material inventariable:

- ULTRACENTRÍFUGA PF09.
- Equipo de análisis fluorimétrico ÓPTIMA
- SPINREACT SPIN 120.

3.1.2.2. *Material fungible:*

- Reactivos.
- Microplacas.
- Pipetas.
- Utillaje de laboratorio.

3. 2. Métodos:

3.2.1. Acondicionamiento de los animales y preparación de las muestras:

El conjunto de animales utilizados para llevar a cabo los diferentes experimentos procedía de Laboratorios Janvier SL. Una vez recibidos en las instalaciones de la Universidad de Jaén, se organizaron en dos grupos; el primero de ellos, el grupo control, lo constituían 10 ratas Wistar-Kyoto (WKY) y el segundo de ellos lo formaban 10 ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que serían nuestros individuos de interés, en cuanto a experimentación se refiere. Ambos grupos se alojaron en el edificio A1 del campus universitario (Centro de Producción y Experimentación Animal) con un tiempo de vida de 8 semanas y se prolongó su estancia durante las 24 semanas siguientes. Una vez correctamente colocados en sus respectivas jaulas se les impusieron unas condiciones ambientales con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y una temperatura ambiente constante.

Durante la duración del experimento, todos los individuos han tenido libre acceso tanto a la comida como al agua. Durante las 24 semanas que estuvieron alojados en el animalario, una vez al mes se los instalaba en jaulas metabólicas durante un periodo de 24 horas, con el fin de recoger las muestras pertinentes que nos facilitasen datos sobre la ingesta alimenticia, la cantidad de agua consumida, el peso y la diuresis de cada individuo. Las muestras de orina recogidas fueron procesadas en los laboratorios del edificio B3, donde se centrifugaron a 1000g durante un periodo de 10 minutos a una temperatura de 4°C para retirar células enteras, bacterias, cristales y material contaminante. Una vez finalizada la centrifugación el sobrenadante generado en cada muestra, fue recogido y conservado a -80°C para su posterior uso.

3.2.2. Análisis bioquímico.

La determinación de la actividad aminopeptidásica se llevó a cabo a través de una técnica de fluorimetría cinética, mediante el uso de glutamil- β -naftilamida, alanil- β -naftilamida y glicil prolil-4-metoxi- β -naftilamida, como sustratos para analizar la actividad de glutamil aminopeptidasa (GluAp), alanil aminopeptidasa (AlaAp) y dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), respectivamente.

Para medir la actividad enzimática en las muestras recogidas y poder comparar los resultados obtenidos en las SHR con el grupo control se realizaron una serie de procedimientos con un determinado protocolo:

- Se pipetearon 2 ml de cada muestra en tubos eppendorfs, obteniendo así 20 tubos correctamente marcados (1-10 muestras control, 11-20 muestras SHR), que fueron centrifugados a 17000 g durante 15 minutos para obtener un precipitado enriquecido en microvesículas.

- El sobrenadante procedente de la centrifugación anterior se centrifugó a 50000 rpm (180000 g), a una temperatura de 4°C, durante 60 minutos.

- El sobrenadante generado en la centrifugación fue separado del pellet y se congeló para su posterior uso. El pellet obtenido se usó para el estudio de los exosomas.

- Se realizó la resuspensión del pellet en cada una de las muestras con un volumen 10 veces menor al volumen de orina de partida, es decir, 200 μ l, utilizando tampón Tris 20mM, pH=8.6. A continuación se homogeneizaron las muestras, se dispusieron nuevamente en tubos eppendorf y se congelaron.

- Posteriormente se midió la actividad enzimática en los exosomas extraídos. En este apartado, se examinó la actividad de tres enzimas diferentes: AlaAp, GluAp y DPP4.

3.2.2.1. Determinación de AlaAp, GluAp y DPP4:

Para determinar la actividad aminopeptidásica, en primer lugar se midió la fluorimetría emitida por β -naftilamina y por 4-metoxi- β -naftilamina a la concentración de 0 a 200 nmol/ml cada 60 segundos durante un periodo de 30 minutos.

Una vez realizada la curva estándar, se preparó la disolución del sustrato de la reacción pesando 21.43 mg de alanil- β -naftilamida, que se disolvió en 1 ml de disolvente DMSO (dimetilsulfóxido), originando una disolución 100 mM. Este sustrato se congeló en alícuotas de 100 μ l.

A continuación, se preparó la solución de incubación para lo cual se disolvieron 100 μ l del sustrato congelado previamente en 9.9 ml de tampón Tris 50mM, pH=8.7, por lo que la concentración final del sustrato fue de 1 mM.

Tras ello, se utilizó una microplaca de 96 pocillos, en la que se rellenaron 20 pocillos para cada una de las enzimas estudiadas, donde en cada uno de ellos se añadieron 20 μ l de cada enzima, más 80 μ l de la solución de incubación preparada anteriormente.

Esta serie de pasos se siguieron también para el análisis de GluAp y DPP4, aunque los sustratos utilizados en este caso fueron glutamil- β -naftilamina y glicilprolil-4-metoxi- β -naftilamina.

Finalizados todos los procesos y con la microplaca correctamente rellena, se pasó al análisis informático mediante el equipo ÓPTIMA, el cual nos indicó la actividad de cada enzima presente en la muestra exosomal. Para ello se analizó la fluorescencia emitida cada minuto durante 30 minutos y este dato se comparó con la fluorescencia emitida por la curva estándar de β -naftilamina para el caso de GluAp y AlaAp, o de 4-metoxi- β -naftilamina para el caso de la DPP4. Una vez conocida la concentración del producto fluorescente presente en la muestra se representó frente al tiempo, y se tomó la pendiente de la parte lineal como la actividad enzimática en nmol/ml/min (mU/min).

3.2.2.2. Determinación de proteína total:

Para determinar la concentración de proteína total, se preparó una curva patrón que nos permitiese la comparación de datos obtenidos del análisis del resto de muestras. Dicha curva se preparó mediante la utilización de albúmina de 0 a 1.5 mg/ml y tampón TRIS 20 mM, pH= 8.6. En cada pocillo se depositaron 5 µl de estándar de albúmina, 25 µl de reactivo 1 y 200 µl de reactivo 2, ambos incluidos en el kit DC-protein assay de Bio-Rad.

Una vez realizada la misma, se utilizó nuevamente el programa informático ÓPTIMA para realizar la lectura de absorbancia, y se determinó la proteína total presente en cada fracción siguiendo el mismo procedimiento, y utilizando la curva patrón de albúmina para calcular dicha concentración.

3.2.2.3. Determinación de creatinina:

La evaluación de la concentración de creatinina se determinó mediante un autoanalizador bioquímico, Spin 120, el cual usa la técnica colorimétrica que se basa en la reacción de Jaffé.

3.2.2.4. Determinación de proteinuria:

La evaluación de proteinuria se llevó a cabo mediante el uso del autoanalizador bioquímico Spin 120, el cual usa la técnica colorimétrica basada en el rojo de pirogalol.

4. RESULTADOS.

4.1. Diferencias significativas en la presión arterial sistólica de ratas WKY y ratas SHR a los 2 meses de edad.

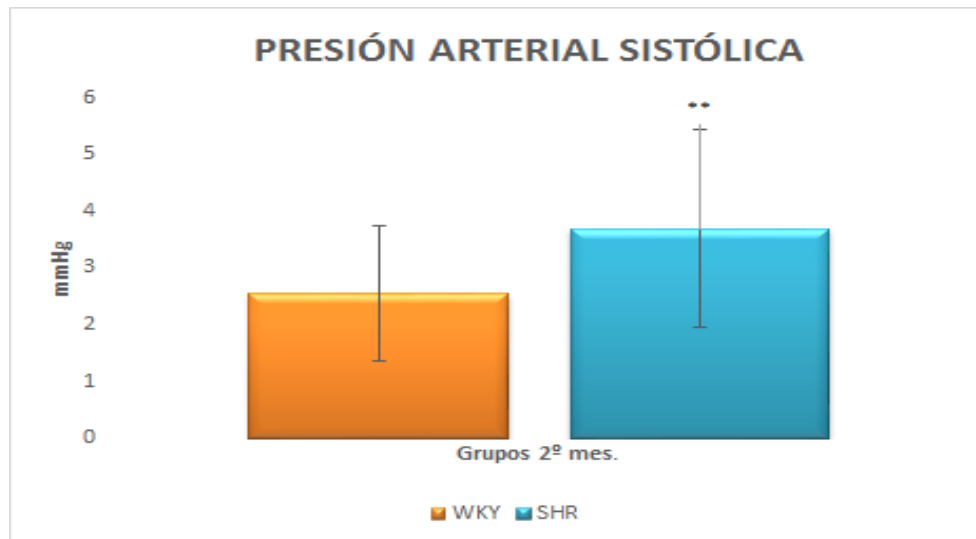


TABLA 1. Gráfico comparativo de las presiones arteriales sistólicas del grupo experimental y grupo control, tomadas a los 2 meses de edad.

Al comparar la presión arterial sistólica (PAS) entre los dos grupos experimentales, WKY y SHR, observamos que desde edades tempranas ya existen diferencias significativas entre ellos. Siendo mayor la presión arterial en el grupo experimental de ratas espontáneamente hipertensas. Observando un nivel de significancia ****p<0.01 vs WKY.**

4.2. Diferencias significativas en la presión arterial sistólica de ratas WKY y ratas SHR, a los 8 meses de edad.



TABLA 2. Gráfico comparativo de las presiones arteriales sistólicas del grupo experimental y grupo control, tomadas a los 8 meses de edad.

Nuevamente, este gráfico nos muestra diferencias significativas en la presión arterial sistólica (PAS) de los grupos control (WKY) y experimental (SHR) a los 8 meses de edad. Observando un nivel de significancia de **p<0.001 vs WKY**.

Este dato nos servirá más adelante para comprobar si existe relación entre determinados niveles de presión arterial sistólica y el posible daño renal causado a raíz de la misma.

4.3 Diferencias en la concentración de proteína exosomal de ratas WKY y ratas SHR.

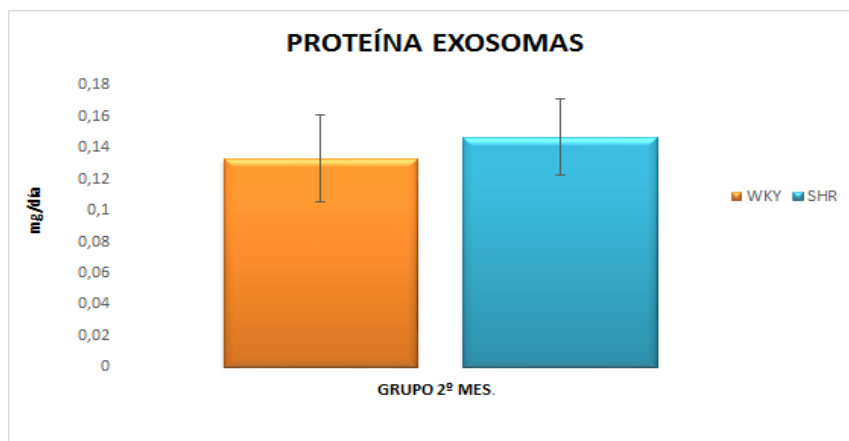


TABLA 3. Gráfico comparativo de la cantidad de proteína contenida en los exosomas de ratas WKY y ratas SHR, tomadas a los 2 meses de edad.

Se observa como desde edades muy tempranas existe una diferencia entre la cantidad de proteína en exosomas de ratas WKY y ratas SHR, pero esta no llega a ser significativa.

4.4 Diferencias en la frecuencia cardíaca entre ratas WKY y ratas SHR a los 2 meses.

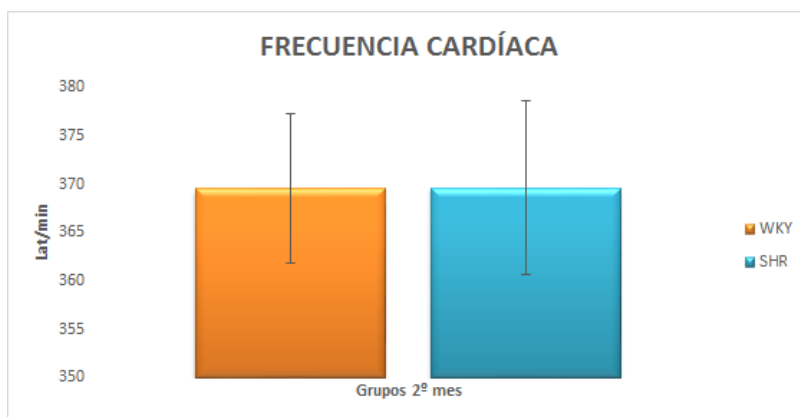


Tabla 4. Gráfico comparativo de los datos de frecuencia cardíaca entre ratas WKY y ratas SHR, tomados a los 2 meses de edad.

Observamos como la diferencia en la frecuencia cardíaca, medida en lat/min, entre las ratas WKY y las SHR es mínima, sin llegar por tanto a ser significativa, en medidas tomadas a los 2 meses de edad.

4.5 Diferencias en la frecuencia cardíaca entre ratas WKY y ratas SHR a los 8 meses.

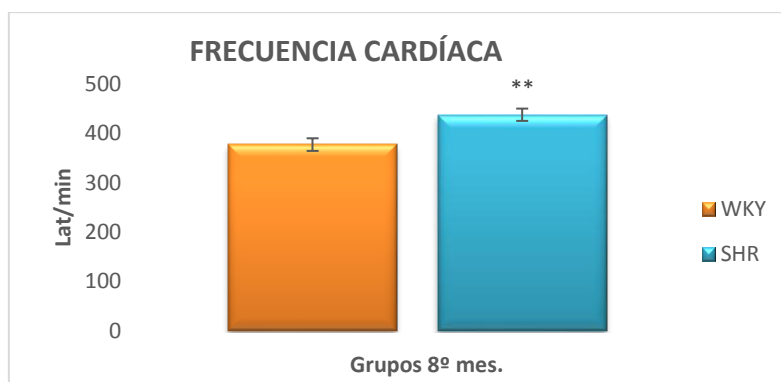


TABLA 5. Gráfico comparativo de la frecuencia cardíaca tomada en ratas WKY y ratas SHR, a los 8 meses de edad.

Este gráfico sí que nos muestra que hay diferencias significativas en las frecuencias cardíacas de los distintos grupos de ratas a los 8 meses de edad.

Observamos que hay mayor frecuencia cardíaca en el grupo experimental, de ratas SHR, que en el grupo control de ratas WKY. Esta diferencia posee un nivel de significancia de $**p < 0.01$. Con lo cual deducimos que la cantidad de latidos por minuto en ratas espontáneamente hipertensas es significativamente mayor

que en ratas WKY. Esto nos ayudará a saber si este hecho produce algún efecto en el daño renal, o de lo contrario no interfiere.

4.6. Variables metabólicas al final del experimento.

	WKY (n=10)	SHR (n=10)
Peso (g)	537,474 ±11,074	471,645 ± 11,574 ***
Ingesta alimenticia (g/100g de rata)	3,900 ± 0,304	5,256 ± 0,220 **
Ingesta hídrica (ml/100 g de rata)	4,030 ±0,288	7,401 ±0,304***
Diuresis (ml/100 g de rata)	1,497 ± 0,047	3,006 ±0,3670 **
Balance hídrico (ml/100 g de rata)	2,532 ± 0,297	4,394 ± 0,464**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WKY.

TABLA 6. Tabla que recoge todos los datos obtenidos en relación a la ingesta alimenticia, hídrica, diuresis y balance hídrico, al final del experimento.

Esta tabla recoge los valores medios de cada uno de los grupos experimentales, junto a su error relativo para los distintos parámetros medidos en relación con las variables metabólicas, al final de experimento.

Podemos observar como en todos los parámetros medidos existen diferencias significativas en el grupo experimental SHR, con respecto al control WKY.

Observamos como las ratas SHR, tienen un peso corporal menor que las WKY, a pesar de que tienen una ingesta hídrica y calórica mayor. Por otro lado, esto podría explicarse observando que también poseen un mayor grado de diuresis, y un balance hídrico más elevado.

4.7 Variables renales y urinarias al final del experimento.

	WKY (n=10)	SHR (n=10)
Urea (mg/dl)	7.066 ± 0.035	6.979 ± 0.039
Creatinina (mg/dl)	0.048 ± 0.002	0.036 ± 0.001***
CrCl (ml/min)	1.297 ± 0.061	1.755 ± 0.152*
CrCl (ml/min/100g)	0.241 ± 0.009	0.371 ± 0.031**
CrCl (ml/min/g kidney)	0.457 ± 0.015	0.636 ± 0.048**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WKY.

TABLA 7. Tabla que recoge los datos urinarios y renales obtenidos al final del experimento, en ambos grupos experimentales, WKY y SHR.

Esta tabla recoge los valores medios obtenidos en relación a las variables urinarias y renales, tanto en el grupo control (WKY) como en el experimental (SHR).

Podemos observar cómo en todas las variables existen diferencias significativas en el grupo SHR con respecto al WKY, exceptuando los niveles de urea (mg/dl) donde la diferencia no llega a tomar significancia.

Donde sí que existen diferencias es en la concentración de creatinina, la cual posee significancia en las cuatro modalidades de medida, lo que nos deja ver que las diferencias son tan claras, que no importa el parámetro con el que se mida, porque siempre se va a obtener significancia.

4.8 Variables morfológicas al final del experimento.

	WKY (n=10)	SHR (n=10)
Peso corporal (g)	537,474 ± 11,074	471,645 ± 11,574 ***
Peso riñón (g)	1,415 ± 0,030	1,378 ± 0,054
Peso corazón (g)	1,195 ± 0,022	1,5185 ± 0,035 ***
Longitud de la tibia (cm)	5,79 ± 0,043	5,565 ± 0,049 **
Peso riñón / longitud de la tibia (mg/cm)	244,507 ± 5,225	247,153 ± 8,094
Peso corazón / longitud de la tibia (mg/cm)	206,423 ± 3,048	272,696 ± 4,737***
Peso riñón / peso corporal (mg/g)	2,635 ± 0,041	2,921 ± 0,087*
Peso corazón/ peso corporal (mg/g)	2,227 ± 0,028	3,230 ± 0,081 ***

***p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WKY.**

TABLA 8. Tabla que recoge los datos obtenidos tras sacrificar a ambos grupos de ratas, WKY y SHR y analizar el peso corporal, peso de riñón y corazón, longitud de la tibia, así como la relación entre ellos.

Esta tabla recoge todos los datos obtenidos al final del experimento en relación a las variables morfológicas. Aquí observamos que existen diferencias significativas en todas las variables analizadas, exceptuando el peso del riñón, y la relación entre el peso del riñón y la longitud de la tibia.

Podemos observar cómo en este caso, nuevamente las ratas SHR poseen un peso corporal más bajo que las WKY y sin embargo cuando se sacrificaron y posteriormente se pesó el corazón de las ratas pertenecientes a ambos grupos, el peso medio del corazón de las ratas SHR era significativamente mayor. Lo mismo ocurre con la longitud de la tibia, así como la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia y la relación entre el peso del corazón y el peso corporal. Por último, existen también diferencias entre el peso del riñón y el peso corporal, aunque con un nivel de significancia menor que el resto.

4.9 Correlación de DPP4 con respecto a la presión arterial sistólica (PAS).

4.9.1 Correlación de los valores de DPP4 con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), ambos tomados a los 2 meses de edad.

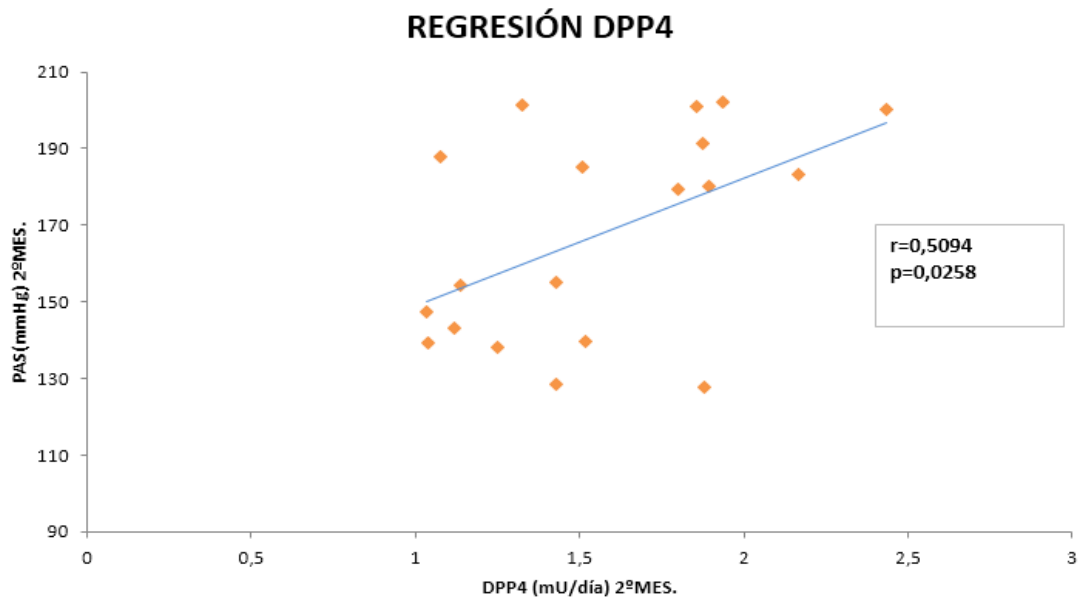


TABLA 9. Gráfico de dispersión de los valores de DPP4 presentes en exosomas, con respecto a la presión arterial sistólica (PAS) medida a los 2 meses de edad.

Observamos una correlación significativa, ya que el p es inferior a 0.05. Como obtenemos un valor de r superior a 0, deducimos que existe una correlación positiva y como este valor de r es próximo a 0.5, estamos ante una correlación moderada.

4.9.2. Correlación de los valores de DPP4 recogidos a los 2 meses de edad con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), recogidos a los 8 meses de edad.

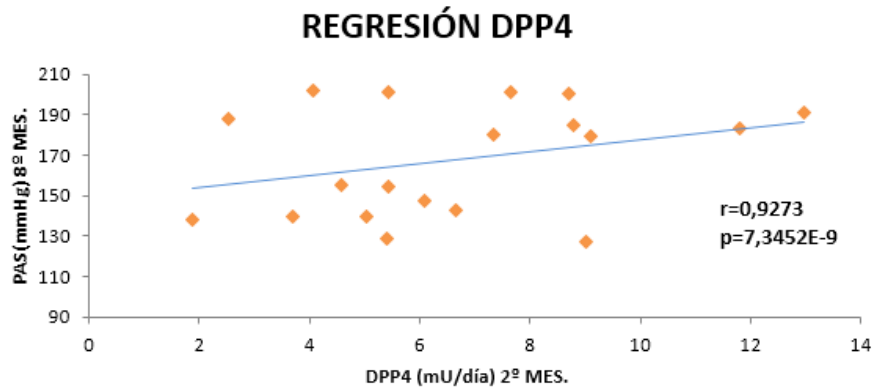


TABLA 10. Gráfico de dispersión de los valores de DPP4 presentes en exosomas, a los 2 meses de edad, con respecto a la presión arterial sistólica (PAS) medida a los 8 meses de edad.

Este gráfico nos muestra una correlación entre los valores de DPP4 recogidos en exosomas de ratas SHR con 2 meses de edad y los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos en las mismas ratas, a los 8 meses de edad.

Observamos un valor de p inferior a 0.05 lo que indica que existe una correlación significativa y un valor de r próximo a 1 lo cual nos muestra que existe una correlación positiva fuerte. Esto quiere decir que los valores de DPP4 presentes en los exosomas de ratas SHR con apenas 2 meses de edad son predictivos de los niveles de presión que estas ratas tendrán a los 8 meses de edad.

Estos datos nos hacen confirmar la teoría de que la actividad aminopeptidásica de DPP4 en exosomas urinarios sirve como biomarcador temprano de enfermedades asociadas a la hipertensión renal crónica.

4.10. Correlación de GluAP con respecto a la presión arterial sistólica (PAS).

4.10.1. Correlación de los valores de GluAp con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), ambas tomadas a los 2 meses de edad.

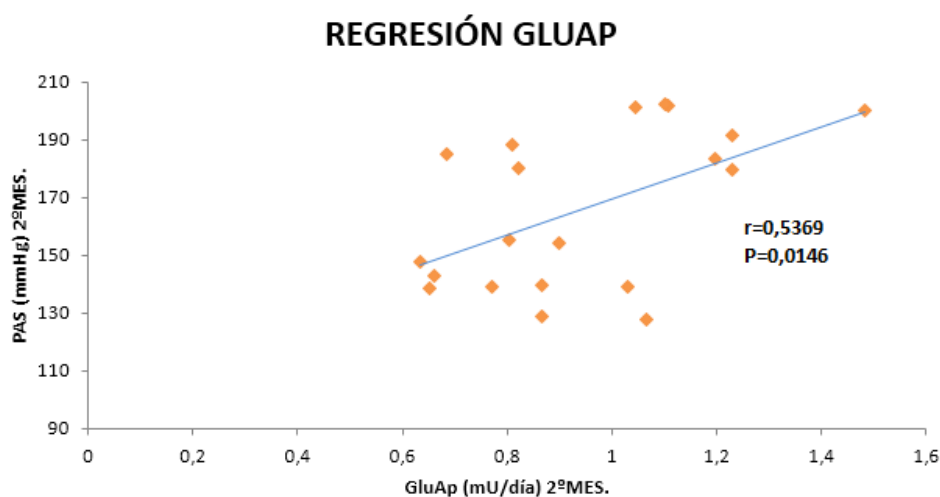


TABLA 11. Gráfico de dispersión de los valores de GluAP presentes en exosomas con respecto a la presión arterial sistólica (PAS), ambos medidos a los 2 meses de edad.

Observamos una correlación significativa, ya que el valor de p es inferior a 0.05. Como observamos un valor de r superior a 0, deducimos que existe una correlación positiva, como este valor de r es próximo a 0.5, describe una correlación moderada.

4.10.2. Correlación de los valores de GluAp, tomados a los 2 meses de edad con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS), tomados a los 8 meses de edad.

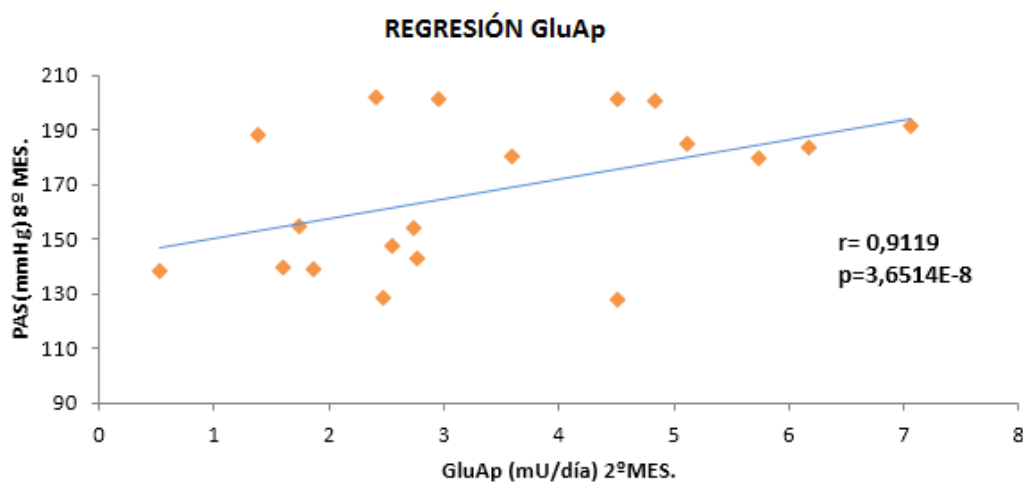


TABLA 12. Gráfico de dispersión de los valores de GluAP presentes en exosomas recogidos a los 2 meses de edad, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos a los 8 meses de edad.

Este gráfico nos muestra una correlación entre los valores de GluAp recogidos en exosomas de ratas SHR con 2 meses de edad y los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos en las mismas ratas, a los 8 meses de edad.

Observamos un valor de p inferior a 0.05 lo que indica que existe una correlación significativa y un valor de r próximo a 1 lo cual nos muestra que existe una correlación positiva fuerte. Esto quiere decir que los valores de GluAp presentes en los exosomas de ratas SHR con apenas 2 meses de edad son predictivos de los niveles de presión que estas ratas tendrán a los 8 meses de edad.

Estos datos nos hacen confirmar la teoría de que la actividad aminopeptidásica de GluAp en exosomas urinarios sirve como biomarcador temprano de enfermedades asociadas a la hipertensión renal crónica.

4.11. Correlación de AlaAP con respecto a la presión arterial sistólica (PAS).

4.11.1. Correlación de los valores de AlaAp, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) ambos tomados a los 2 meses de edad.

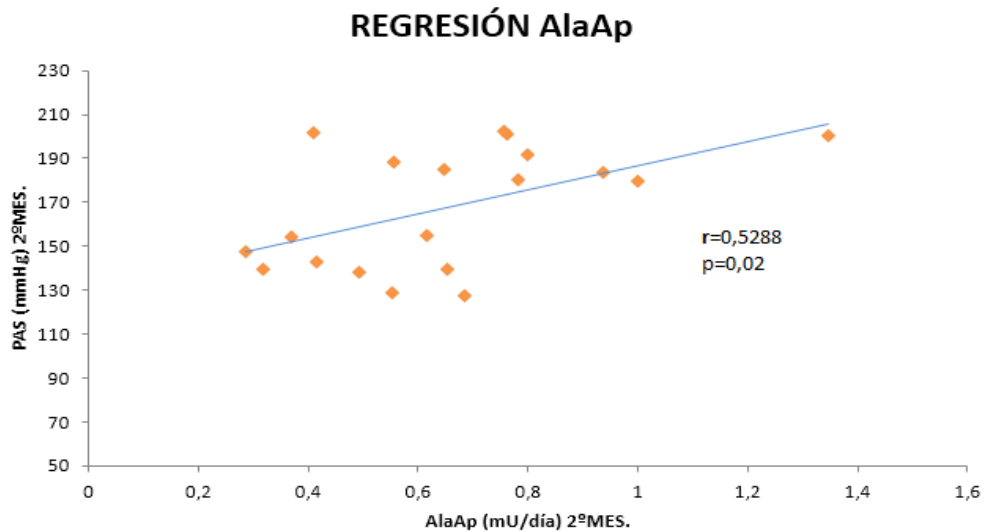


TABLA 13. Gráfico de dispersión de los valores de AlaAp presentes en exosomas, con respecto a la presión arterial sistólica (PAS), ambos medidos a los 2 meses de edad.

Observamos una correlación significativa, ya que el valor de p es inferior a 0.05. Como observamos un valor de r superior a 0, deducimos que existe una correlación positiva, dado que este valor de r es próximo a 0.5, estamos ante una correlación moderada.

4.11.2. Correlación de los valores de AlaAp, tomados a los 2 meses de edad, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) tomados a los 8 meses de edad.

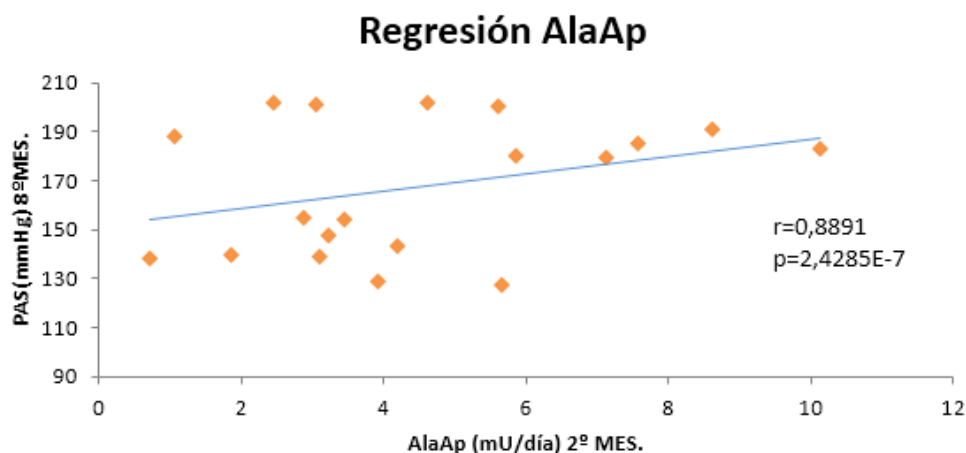


TABLA 14. Gráfico de dispersión de los valores de AlaAp presentes en exosomas recogidos a los 2 meses de edad, con respecto a los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos a los 8 meses de edad.

Este gráfico nos muestra una correlación entre los valores de AlaAp recogidos en exosomas de ratas SHR con 2 meses de edad y los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos en las mismas ratas, a los 8 meses de edad.

Observamos un valor de p inferior a 0.05 lo que indica que existe una correlación significativa y un valor de r próximo a 1 lo cual nos muestra que existe una correlación positiva fuerte. Esto quiere decir que los valores de AlaAp presentes en los exosomas de ratas SHR con apenas 2 meses de edad son predictivos de los niveles de presión que estas ratas tendrán a los 8 meses de edad.

Estos datos nos hacen confirmar la teoría de que la actividad aminopeptidásica de AlaAp en exosomas urinarios sirve como biomarcador temprano de enfermedades asociadas a la hipertensión renal crónica.

4.12. Concentración enzimática en exosomas.

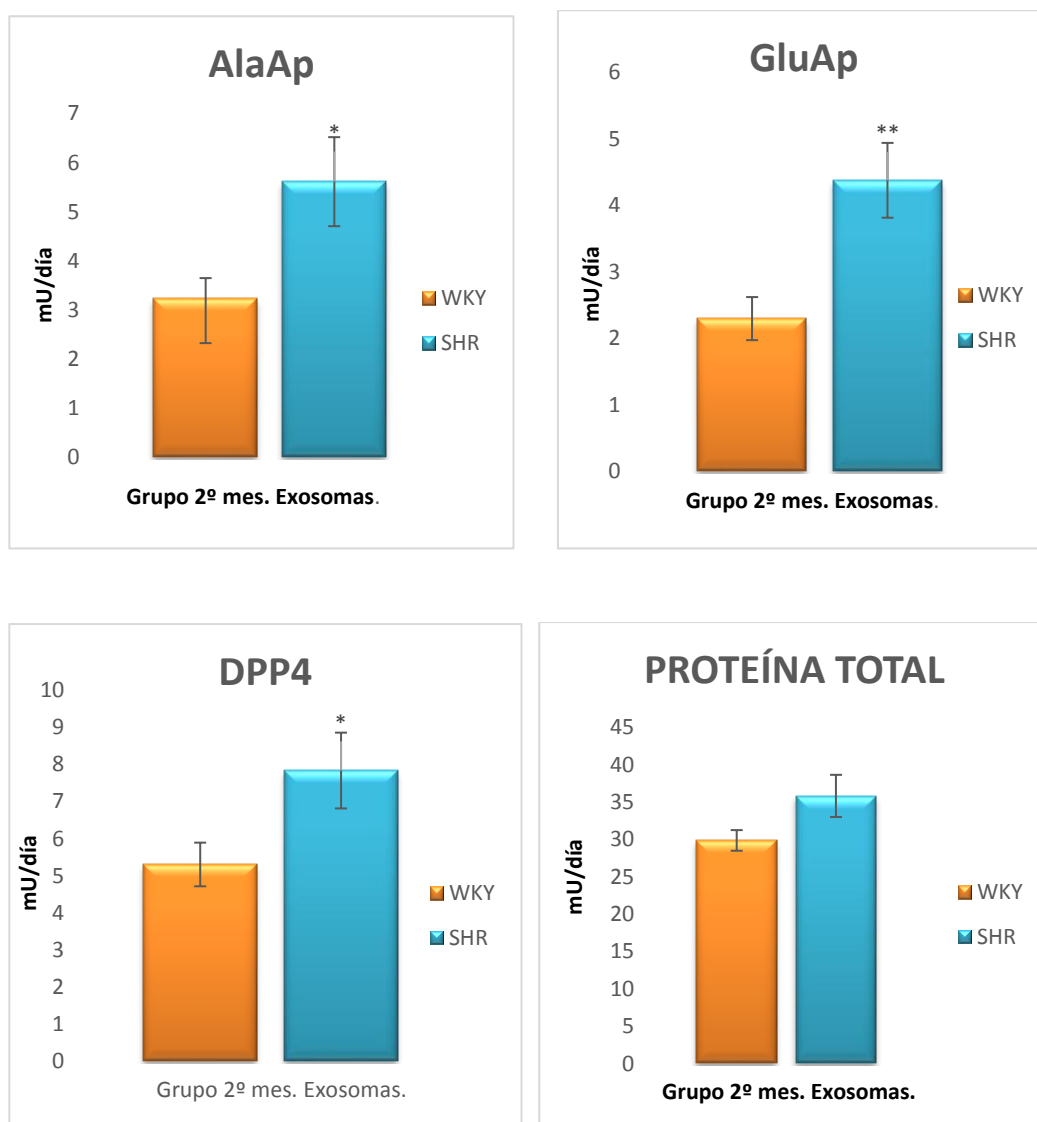


TABLA 15. Gráfico comparativo de la concentración de las distintas fracciones enzimáticas presentes en exosomas de ratas pertenecientes al grupo control WKY y ratas pertenecientes al grupo experimental SHR, a los 2 meses de edad.

En este gráfico podemos observar como en la comparativa de la concentración de Glutamil aminopeptidasa en exosomas de ratas WKY con respecto a la concentración en ratas SHR, existen diferencias significativas, con $p < 0.01$.

Mientras que también encontramos diferencias significativas, aunque un poco menores, en la comparativa de la concentración de Alanil aminopeptidasa y DPP4, en ratas WKY y ratas SHR, con un valor de $p < 0.05$.

No se observa significancia en las diferencias de las concentraciones de proteína total entre exosomas de ratas WKY y ratas SHR.

4.13. Concentración enzimática en microvesículas.

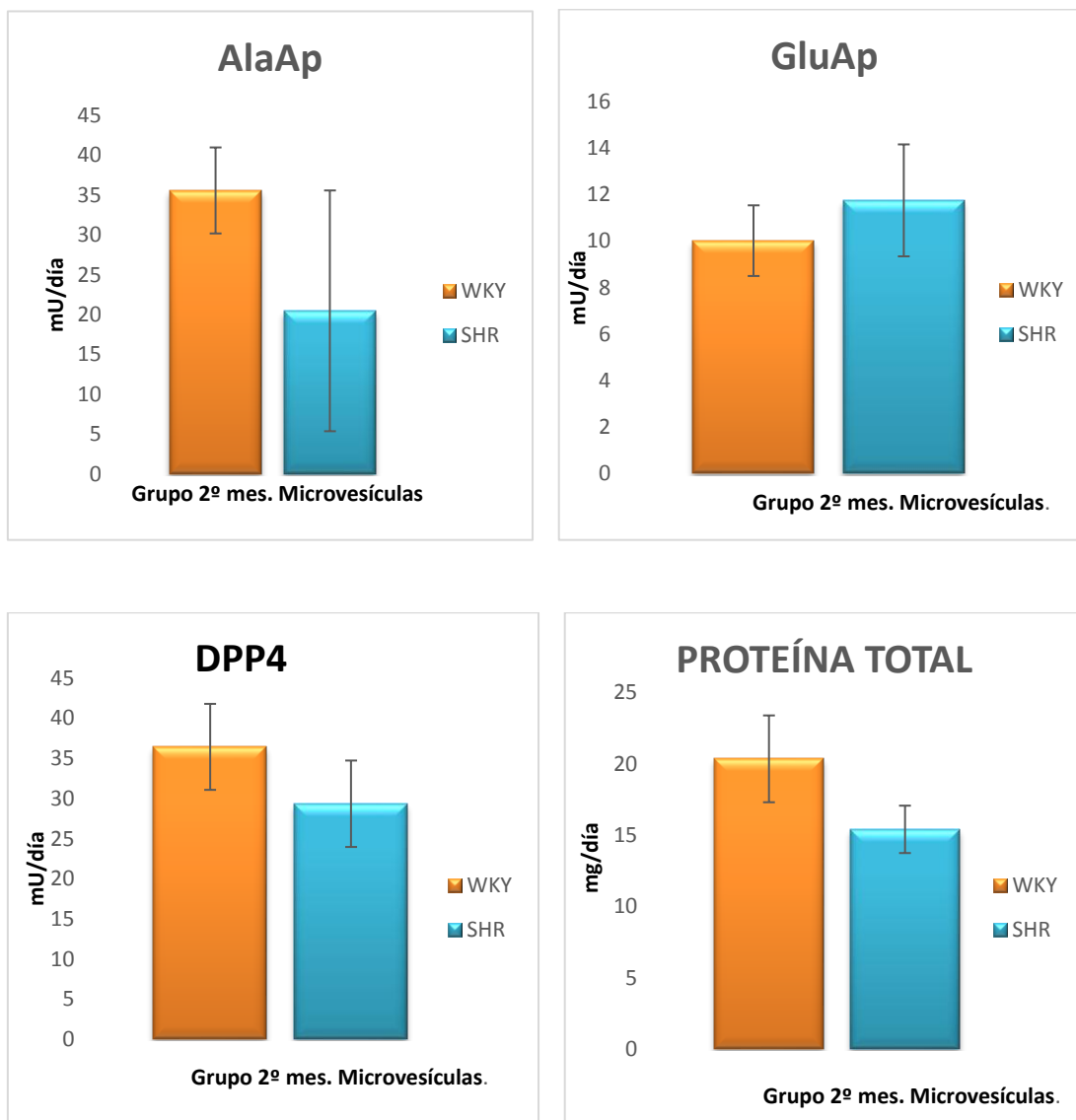


TABLA 16. Gráfico comparativo de la concentración de las distintas fracciones enzimáticas presentes en las microvesículas recogidas del grupo control WKY y el grupo experimental SHR, a los 2 meses de edad.

Este gráfico nos muestra que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones enzimáticas en microvesículas de ratas WKY y ratas SHR. Podemos observar cómo el grupo control (WKY) tiene mayor concentración enzimática en sus microvesículas, que el grupo experimental (SHR).

4.14 Concentración enzimática en el sobrenadante.

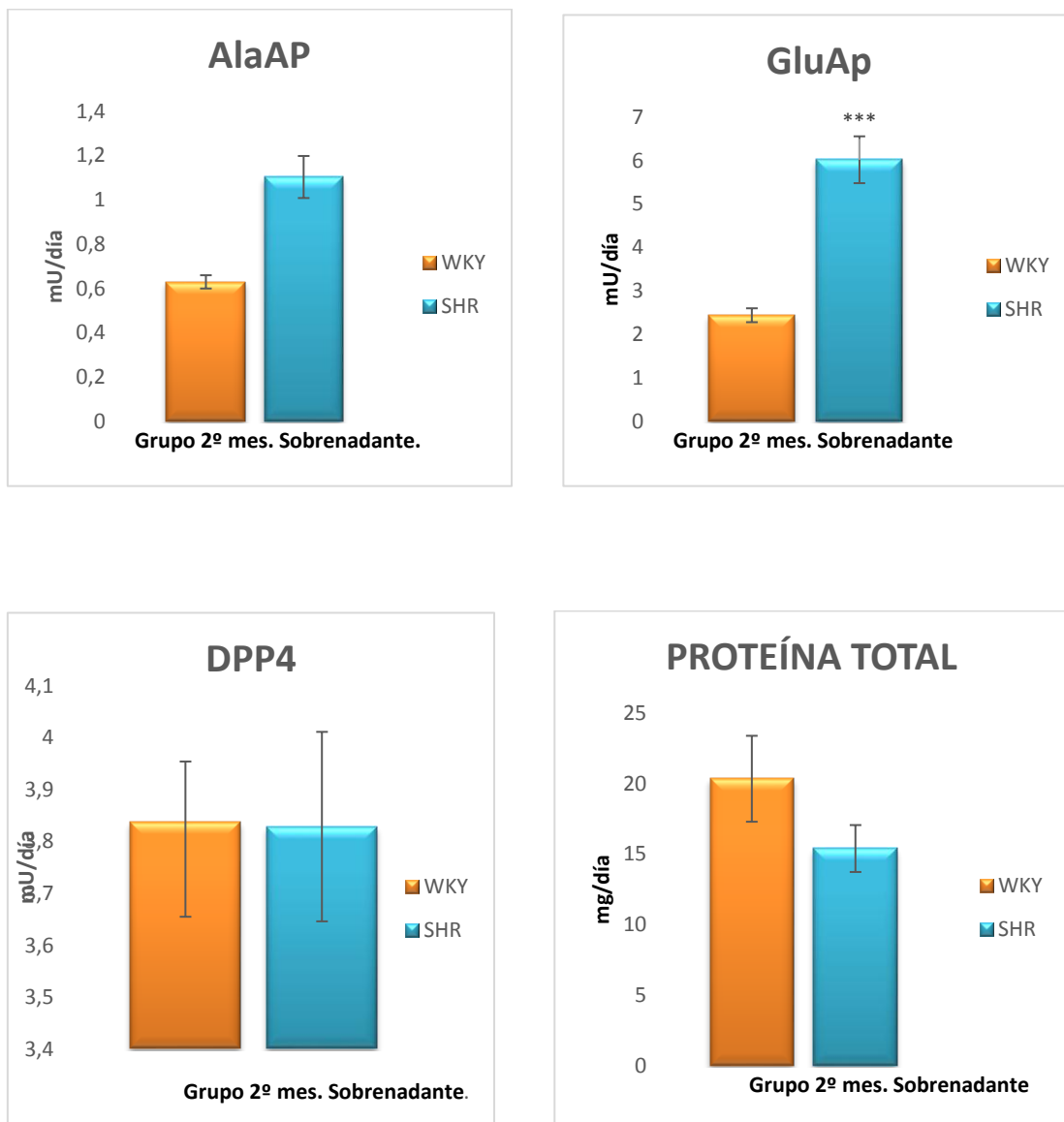


TABLA 17. Gráfico comparativo de la concentración de las distintas fracciones enzimáticas presentes en el sobrenadante de las muestras de orina recogidas del grupo control WKY y el grupo experimental SHR, a los 2 meses de edad.

Este gráfico nos muestra nuevamente, como no existe significancia entre las diferencias en la concentración enzimática presente en el sobrenadante recogido en los dos grupos experimentales.

5. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este trabajo han consistido en que las actividades de las enzimas GluAP, AlaAP y DPP4 se encuentran aumentadas en la fracción exosómica de la orina en un modelo de hipertensión experimental, como es el de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y que esta actividad aumenta de manera temprana, ya que a los 2 meses de edad de los animales ya se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las ratas SHR y las ratas control Wistar Kyoto (WKY). Además, los aumentos en las actividades enzimáticas que hemos determinado, guardan correlación significativa con el nivel de presión arterial sistólica que se ha medido en estos animales, tanto con la presión arterial determinada a los 2 meses como con la presión arterial obtenida al final del experimento.

El hecho de que estas enzimas se encuentren aumentadas en la fracción exosómica urinaria de estos animales podría deberse a que se está produciendo una lesión en las células del túbulo renal, ya que estas enzimas han sido descritas como marcadores tempranos del daño tubular en otros trabajos previos (3, 36, 39).

En nuestros resultados, sin embargo, no hemos obtenido diferencias significativas entre las actividades enzimáticas presentes en el sobrenadante, ni en las actividades de la fracción microvesicular para AlaAp y DPP4, aunque sí que se ha encontrado aumentada significativamente la actividad de GluAp. Pese a que el significado fisiopatológico de estos marcadores es muy similar, estas diferencias pueden deberse a varias causas, como puede ser la mayor presencia de GluAp en las células epiteliales del túbulo renal (43), o variaciones propias de la técnica de determinación utilizada (menos interferencias por parte de otras sustancias, mejor acoplamiento enzima-sustrato, etc).

Además de los aumentos enzimáticos que hemos observado en la fracción exosómica urinaria, también hemos encontrado una correlación muy elevada entre la excreción de estas enzimas a los 2 meses de edad de la rata con el nivel

de presión arterial. La afectación tubular renal y su relación con el grado de presión arterial han sido descritos por Hulstrom et al (2012), (11).

Por lo tanto, nuestros hallazgos están en consonancia con esta afirmación, ya que a mayor actividad enzimática, mayor lesión tubular tendrá el animal y mayor nivel de presión arterial nos encontraremos.

Asimismo, se han encontrado diferencias significativas en las variables metabólicas, donde podemos observar cómo existen disimilitudes en la ingesta alimenticia, ingesta hídrica, diuresis y balance hídrico, entre las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y las ratas normotensas (WKY). Esta situación conduce a una disparidad morfológica entre ambos grupos experimentales.

Podemos percibir la existencia de diferencias significativas en el peso corporal entre ratas SHR y ratas WKY, siendo menor en el primer caso, diferencias en el peso del corazón, en el peso del riñón y en la longitud de la tibia. Debido a que este modelo de experimentación animal posee porcentajes muy bajos de grasa corporal, para analizar correctamente la relación que guarda el peso corporal con los efectos de la enfermedad, primero se determinó la longitud de la tibia, la cual nos indicaría si el peso corporal, así como el peso del corazón y del riñón, son proporcionales al tamaño del animal. Los resultados obtenidos indican que efectivamente la longitud de la tibia guarda relación con el peso del riñón, pero no con el peso del corazón. Esto se debe a que este modelo animal experimenta un fenómeno denominado hipertrofia cardíaca, en el cual el músculo cardíaco crece de forma anormal. Por ello, el interés de medir la longitud de la tibia reside en normalizar el peso de los órganos, enfocado al peso total del animal. Todos estos resultados guardan conformidad con los detallados en estudios realizados anteriormente, como es el caso de Saleh FH (2001), (37).

Por otra parte, es interesante destacar que las ratas hipertensas (SHR) al final del experimento presentan un valor de creatinina en sangre significativamente inferior al de las ratas normotensas (WKY). Este hecho coincide con la descripción de Hulstrom, (11) de que en estos animales se produce un fenómeno de hiperfiltración glomerular, es decir, se está filtrando por el glomérulo una

mayor cantidad de creatinina que la que se filtraría en condiciones normales. Esta se eliminaría por la orina, ya que la creatinina no se reabsorbe, y produciría la disminución de creatinina en la sangre. Como consecuencia, la creatinina en sangre no serviría en este caso como biomarcador del daño renal, ya que no sólo no está aumentada sino que está disminuida. Por esta misma causa, el aclaramiento de creatinina, que es el índice más utilizado para evaluar la filtración glomerular se encuentra aumentado.

De la misma manera, la concentración de proteinuria (marcador urinario tradicional de medida del daño renal) tampoco se encuentra aumentada significativamente en las muestras exosomales recogidas en ratas SHR con respecto a las muestras exosomales recogidas en ratas control, WKY. También cabe destacar que en muestras obtenidas del sobrenadante y microvesículas urinarias, esta concentración de proteína se encuentra disminuida en ratas SHR con respecto a la concentración presente en muestras de ratas WKY. El no hallarse diferencias estadísticamente significativas en la fracción microvesicular y sí en los exosomas, puede deberse a que existe una biogénesis diferente para cada una de estas dos estructuras. Los exosomas tiene origen endosómico y son liberados al medio, mientras que las microvesículas son fragmentos de membrana que se desprenden de esta, liberándose al medio extracelular (4, 22). Por ello, el origen dispar de cada estructura podría ser el causante de que encontremos la presencia de diferentes enzimas entre una y otra.

En definitiva, el daño tubular presente en estos animales no estaría provocando aumentos de creatinina ni proteinuria y no podríamos utilizar estos marcadores para su evaluación. Esto hace que la búsqueda de marcadores presentes en la orina tenga gran importancia en este modelo, en el cual no podemos analizar el nivel de creatinina, y/o proteinuria como índice de disfunción renal.

El hecho de que nuestras enzimas estén aumentadas en la fracción exosómica de la orina podría tener utilidad a la hora de hacer un seguimiento del paciente en enfermedades que vayan acompañadas de este fenómeno de hiperfiltración glomerular, como es el caso de la hipertensión esencial y la diabetes, (21).

Nuestros resultados están de acuerdo también con otros trabajos anteriores de nuestro grupo donde se demuestra la presencia de estas enzimas en las fracciones exosómica y microvesicular de orina procedente de ratas tratadas con cisplatino, un modelo experimental de daño renal agudo (36), y en donde se demostró la presencia de GluAP en estas fracciones tanto por la determinación fluorimétrica de la actividad enzimática como por ELISA y por inmunoblotting, y su relación directa con la elevación de creatinina que tiene el animal.

Creemos que se deberían de realizar más estudios vinculados a este tema, con un mayor número de casos y enfocados a otro tipo de enfermedades con diferentes patologías, para comprobar si la determinación en la fracción exosómica presenta ventajas con respecto a la determinación en el sobrenadante. Aunque podemos afirmar que existe una clara relación entre la presión arterial y el nivel de actividad enzimática, sería conveniente la realización de más estudios que apoyasen esta teoría.

6. CONCLUSIONES

1. Las actividades GluAP, AlaAP y DPP4 presentes en la fracción exosómica son biomarcadores tempranos de la lesión tubular asociada a la hipertensión experimental en ratas, estando relacionadas con el nivel de presión arterial que tienen estos animales.

2. Otros marcadores tradicionales como creatinina y proteinuria no tienen utilidad como marcadores diagnósticos tempranos en esta patología.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. A. Clayton, A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M.D. Mason, M.B. Hallett Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: The role of integrins. *Faseb J.*, 18 (2004), pp. 977-979 <http://dx.doi.org/10.1096/fj.03-1094fje> Pubmed.
2. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* (2006) 7(9): R80. doi:10.1186/gb-2006-7-9-R80.
3. Andrés Quesada, Ana Belén Segarra, Sebastián Montoro-Molina, María del Carmen de Gracia, Antonio Osuna, Francisco O'Valle, Manuel Gómez-Guzmán, Félix Vargas, and Rosemary Wangenstein. *PLoS One* 2017; 12(4): e0175462.
4. Aupeix, K., et al., The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p.1546-54.
5. Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editores. *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press; 1998.
6. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz JM ed Biol Res* (2013) 46(10):824-30. doi:10.1590/1414-431X20132964.
7. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422:37-44.
8. Ganley IG, Espinosa E, Pfeffer SR. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *The Journal of cell biology* 2008; 180:159-72.

- 9.** HAFKENSCHIED, JCM.: <<Aminopeptidases and aminoacid arylamidases>> . En: bergmeyer, HU., ed. Methods of enzymatic analysis, 3rd ed. 1984. Verlag Chmie Publ. Weinheim.
- 10.** Halbesma N, Jansen DF, Heymans MW, Stolk RP, de Jong PE, Gansevoort RT, et al. Development and validation of a general population renal risk score. Clin J Am Soc Nephrol 2011; 6:1731-8. [Pubmed].
- 11.** Hultstrom, Michael [Review] Journal of Hypertension. 30(6):1087-1091, June 2012.
- 12.** Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesicle pedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoSBiol(2012) 10(12):e1001450.doi:10.1371/journal.pbio.1001450.
- 13.** Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesicle pedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoSBiol (2012)10(12):e100/1450.doi:10.1371/journal.pbio.1001450
- 14.** Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, et al. EV pedia: a community web portal for extracellular vesicles research. Bioinformatics (2014). doi:10.1093/bioinformatics/btu 741.
- 15.** Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. N Engl J Med 1996; 334:13-8. [Pubmed]
- 16.** Klein, C., et al., Extracellular NAD(+) induces a rise in [Ca(2+)] (i) in activated human monocytes via engagement of P2Y(1) and P2Y(11) receptors. Cell Calcium, 2009. 46(4):p. 263-72.

- 17.** Lässer C, Ali khani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* (2011) 9:9.doi:10.1186/1479-5876-9-9.
- 18.** Lässer C. et al., 2011; Witwer KW. Et al., 2013.
- 19.** Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt K-U, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007;72:247-59. [PubMed].
- 20.** LOJDA, Z., and GOSSRAU, R.: <<Study on aminopeptidase A>>. *Histochemistry*, 1980. 67:267-290.
- 21.** MASCHERONI, Claudio A. Fisiopatología de la hiperfiltración glomerular en la diabetes: Parte I. *Rev. nefrol. dial. transpl.* [online]. 2014, vol. 34, n.3 [citado 2017-06-04], pp. 130-154.
- 22.** MacKenzie, A., et al., Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 2001. 15(5):p.825-35.
- 23.** McDONALD, JK, and BARRETT, AJ.: Mammalian proteases: A glossary and bibliography. 1986, vol 2. Academic, London.
- 24.** Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. Exo Carta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* (2012) 40(D1):D1241-4. doi:10.1093/nar/gkr 828.
- 25.** Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics* 2010;73:1907-20.
- 26.** Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human

colontumorcelllineLIM1215revealsatissue-specificproteinsignature. *Mol Cell Proteomics* (2010) 9(2):197–208.doi:10.1074/mcp.M900152-MCP200.

27. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004; 5:121-32.

28. Mears, R, et al., Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 4019-31.

29. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* (2011) 2:282. doi:10.1038/ncomms1285.

30. Moreschi, I., et al., Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes. *J Biol Chem*, 2006 281(42):p.31419-29.

31. Palmer BF. Impaired renal autoregulation: implications for the genesis of hypertension and hypertension-induced renal injury. *Am J Med Sci* 2001; 321:388-400. [PubMed].

32. Peralta CA, Norris KC, Li S, Chang TI, Tamura MK, Jolly SE, et al. Blood pressure components and end-stage renal disease in persons with chronic kidney disease: The Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Arch Intern Med* 2012; 172:41-7. [PubMed].

33. Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual review of cell and developmental biology* 2007; 23:519-47.

34. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* (2006) 5(10):1760–71.doi:10.1074/mcp.R600004-MCP200.

- 35.** Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:13368-73.
- 36.** Quesada A, Vargas F, Montoro-Molina S, O'Valle F, Rodríguez-Martínez MD, Osuna A, et al. Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PLoS ONE*; 7(7):e40402.
- 37.** Saleh, F. H. and Jurjus, A. R. (2001), A comparative study of morphological changes in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats treated with an angiotensin-converting enzyme inhibitor or a calcium-channel blocker. *J. Pathol.*, 193: 415–420. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH796>3.0.CO;2-F
- 38.** *Science*. 303(5657):531-534, January 23, 2004.
- 39.** Sebastián Montoro-Molina, Andrés Quesada², Piedad V. Zafra-Ruiz, Francisco O'Valle, Félix Vargas, María del Carmen de Gracia, Antonio Osuna²and, Rosemary Wangenstein. Volume 9, Issue 5-6, pages 630–635, June 2015.
- 40.** Shi, G., et al., Identification of an alternative G α q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *J Exp Med*, 2007. 204(11): p. 2705-18.
- 41.** Simons JL, Provoost AP, Anderson S, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Modulation of glomerular hypertension defines susceptibility to progressive glomerular injury. *Kidney Int* 1994; 46:396-404. [PubMed].
- 42.** Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* (2012) 1. doi:10.3402/jev.v1i0.18374.

- 43.** Song L, Ye M, Troyanovskaya M, Wilk E, Wilk S, et al. (1994) Rat kidney glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A): molecular identity and cellular localization. *Am J Physiol* 267: F546–F557.
- 44.** Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology* 1999; 147:599-610.
- 45.** Tozawa M. Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension* 2003; 41:1341-5. [Pubmed]
- 46.** Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1981; 645:63-70.
- 47.** Udani S, Lazich I, Bakris GL. Epidemiology of hypertensive kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7:11-21. [Pubmed].
- 48.** V. Muralidharan-Chari, J. Clancy, C. Plou, M. Romao, P. Chavrier, G. Raposo ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.*, 19 (2009), pp. 1875-1885 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>. Pubmed.
- 49.** van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. *Trends in cell biology* 2006; 16:514-21.
- 50.** Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, et al. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 2003; 52:1690-7.

51. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001; 121:337-49.

52. Vrijzen KR, Sluijter JP, Schuchardt MW, van Balkom BW, Noort WA, Chamuleau SA, et al. Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010; 14:1064-70.

53. WitwerKW, BuzásEI, BemisLT, BoraA, LässerC, LötvallJ, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* (2013) 2:1–25.doi:10.3402/jev.v2i0.20360.

54. Woodman PG, Futter CE. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Current opinion in cell biology* 2008; 20:408-14.

55. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmans G, Mobius W, Hoernschemeyer J, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multi-vesicular body formation. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278:10963-72.

56. Zhan R, Leng X, Liu X, Wang X, Gong J, Yan L, et al. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes. *Biochemical and biophysical research communications* 2009; 387:229-33.

AGRADECIMIENTOS:

*En primer lugar, agradecer a **mis padres**. Mi formación es fruto de su esfuerzo y apoyo incesantes. Gracias a mi Universidad, por la enseñanza y en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de ese proceso. Agradecer a mi tutora, **Rosemary Wangenstein Fuentes** por su tiempo y dedicación.*

***La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.**
Miguel de Unamuno.*