



No. 14-094179- -00007-0000

Fecha: 2016-01-05 15:39:31 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTE(YII) Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 53

61

As. 128.086

Señor

**DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **14 094.179**– solicitud de patente de invención a favor de **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**. Título: **MÉTODO PARA MONITOREO, DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON HIPOXIA UTILIZANDO NFAT5.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 10121 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 1^{ro} de Septiembre de 2015.

Como primera medida, ponemos a su consideración un nuevo pliego reivindicatorio que consta de catorce (14) reivindicaciones, las cuales se mantienen completamente soportadas por las divulgaciones del capítulo descriptivo y no exceden ni amplían de ninguna manera el alcance de la invención previamente reclamada.

En relación con dicho nuevo pliego reivindicatorio, solicitamos respetuosamente sean tenidas en cuenta las siguientes modificaciones llevadas a cabo con el fin de solucionar todas y cada una de las objeciones emitidas por el señor Examinador en contra de la anterior divulgación:

- La reivindicación 7 fue completamente eliminada debido a que la invención allí reclamada hacía referencia a métodos de tratamiento. Por su parte, el lenguaje de la reivindicación 6 fue modificado evitando hacer referencia a materia no patentable, corrigiendo por tanto la excepción a la patentabilidad objetada.
- Acatando la sugerencia del señor Examinador, las reivindicaciones 3, 10 y 11 fueron restringidas indicando con precisión métodos de laboratorio aplicables a la etapa (b) del método reivindicado, los cuales se encuentran debidamente soportados por la descripción.
- Asimismo, la redacción de las reivindicaciones 4, 5, 12 y 13 fue ajustada para definir con mayor claridad el objeto y alcance de la presente invención y manteniendo estrecha concordancia con la información comprendida en la descripción.
- Tal y como recomienda el señor Examinador, el encabezado de las reivindicaciones 8 a 16 fue corregido refiriéndose ahora a un ***“Kit de diagnóstico”*** en concordancia con la información proporcionada por el capítulo descriptivo de la presente solicitud.
- Teniendo en cuenta que *“las instrucciones para usar el equipo”* no constituyen una característica técnica esencial de la invención aquí reclamada, la reivindicación 14 fue eliminada.

De conformidad con dichas modificaciones, anexamos al presente memorial una nueva versión del capítulo descriptivo cuyo lenguaje ha sido adecuado de manera tal que permita una total comprensión de la materia divulgada por la presente solicitud para que el versado en la materia pueda reproducirla o ejecutarla sin ningún inconveniente.

Puesto que dicha nueva descripción únicamente presenta cambios de redacción, es decir que no alteran el alcance inicial de la invención divulgada, solicitamos respetuosamente sea admitida a trámite en cumplimiento de los requisitos estipulados para las modificaciones de este tipo.

Así pues, solicitamos respetuosamente sean retiradas todas y cada una de las objeciones que cuestionan la claridad y concisión de la presente divulgación, la cual hemos modificado pertinentemente para que cumpla a cabalidad con dichos requisitos.

Novedad y Nivel inventivo

En opinión del señor Examinador, el documento D1 (*Methods for Treating Disease by Modulating an Osmotic Stress Pathway*, US 20080039416) anticipa el objeto de las reivindicaciones 1 y 8 (nueva reivindicación 7) y por tanto, estas carecen de novedad.

En contraste con su apreciación, consideramos que las divulgaciones del documento D1 no resultan de ninguna manera equiparables al objeto aquí reivindicado, el cual se diferencia apropiadamente de dicho arte previo.

Más en detalle, afirmamos que dicho documento D1 no anticipa de manera exacta todas y cada una de las características técnicas esenciales de la presente invención y por tanto, falla en desvirtuar su novedad; hecho que solicitamos respetuosamente sea reconocido mediante el retiro de tal objeción.

Para referencia del señor Examinador, reproducimos a continuación las nuevas reivindicaciones 1 y 7, las cuales insistimos resultan completamente novedosas a pesar de las divulgaciones del documento D1:

"Método in vitro para detectar hipoxia en una muestra que comprende material celular, en donde el método comprende

- a) proporcionar una muestra que comprende material celular;*
- b) concentrar los factores de transcripción NFAT5 que puedan estar presentes en la muestra; y*
- c) detectar y/o cuantificar los factores de transcripción NFAT5 concentrados en la etapa (b), en donde detectar y/o cuantificar los niveles elevados de los factores de transcripción NFAT5, comparados con condiciones de normoxia, indica que el material celular fue expuesto a condiciones de hipoxia"*

Adaptado del nuevo pliego reivindicatorio, reivindicación 1

“Kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o el nivel de NFAT5 para determinar el inicio de un trastorno o condición relacionado con hipoxia en un paciente, en donde el kit comprende un medio para concentrar los factores de transcripción NFAT5 presentes en una muestra del cuerpo del paciente; y un medio para detectar y/o cuantificar los factores de transcripción NFAT5 en la muestra concentrada”

Adaptado del nuevo pliego reivindicatorio, reivindicación 7

Comparando la materia reivindicada frente a las enseñanzas del documento D1 es posible notar que este falla en describir exactamente la materia que aquí se reivindica, razón por la que insistimos en que la novedad de la misma no se ve perjudicada en ningún momento por tales divulgaciones.

En conexión con lo anterior, llamamos la atención sobre el hecho de que la referencia citada ignora por completo el concepto técnico que da origen a cada una de las modalidades de la presente invención, es decir, el rol que juega NFAT5 en la respuesta celular a la hipoxia o a las condiciones de baja oxigenación.

Debido a esto, es evidente que el documento D1 no podría haber inspirado el desarrollo de la presente invención, sobre todo teniendo en cuenta que esta referencia aborda y analiza la relación existente entre el estrés osmótico y la expresión de NFAT5/TonEBP y su relevancia en cuadros de cáncer y de enfermedades autoinmunes, **alejándose** por tanto del campo técnico que concierne a la presente solicitud.

Luego entonces, afirmamos que además de desconocer la caracterización puntual que da lugar a la invención descrita a lo largo de este nuevo pliego reivindicatorio, el documento D1 se **aleja** del objeto de la presente solicitud y por tanto no podría servir como punto de partida para el desarrollo obvio de la misma, como presume el señor Examinador.

Adicionalmente, vale la pena destacar que el párrafo [0015] del citado documento D1 enuncia abiertamente que dicha anterioridad se encuentra enfocada en el desarrollo de métodos de diagnóstico relacionados con el cáncer y enfermedades autoinmunes en donde la elevación de NFAT5/TonEBP es diagnóstico de cáncer, materia que no

encuentra relación alguna con el objeto de la presente solicitud y que por tanto no podría brindar al versado en la materia la información necesaria para que este pueda dar lugar a la presente invención de manera obvia o sin implicar el uso de su propia habilidad inventiva.

En este orden de ideas, concluimos que el documento D1 no hace otra cosa que **alejar** al versado en la materia del objeto de la presente solicitud, razón por la que el mismo no constituye soporte documental suficiente a las objeciones del señor Examinador en contra de su novedad y nivel inventivo.

Igualmente, reiteramos que dicha referencia nunca enseña o sugiere el importante rol que juega la NFAT5 en la respuesta celular a la hipoxia y que por tal razón la misma desconoce el concepto técnico inventivo que caracteriza a la presente invención, demostrando una vez más la poca relevancia de sus divulgaciones como anterioridad relevante para el estudio de la patentabilidad de la materia divulgada en esta solicitud.

Con base en lo anterior, solicitamos sea reconocido que la invención descrita a lo largo de este nuevo pliego reivindicatorio cumple satisfactoriamente con los requisitos de novedad y nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1, las cuales resultan insuficientes para desvirtuar su patentabilidad.

Similar a este caso, encontramos que las divulgaciones del documento D2 (*Podocyte specific assays and uses thereof*, WO 2011057172) tampoco se relacionan con el campo técnico que atañe a la presente solicitud, pues las mismas describen un método que permite medir la actividad de NFAT en la muestra para a su vez medir o cuantificar la actividad de la calcineurina.

Tal y como es evidente, el documento D2 describe un método enfocado específicamente en la determinación de **calcineurina**, marcador que no tiene relación, ni enseña o sugiere el rol que NFAT5 juega en la respuesta celular a la hipoxia y que da origen a los desarrollos expuestos a lo largo de la presente solicitud.

Por tanto, afirmamos que dicha referencia falla igualmente en sugerir al versado en la materia el desarrollo de la presente invención pues ignora abiertamente el concepto

técnica inventiva detrás de la misma, el cual gira en torno a la relación existente entre NFAT5 y la respuesta celular obtenida en condiciones de hipoxia o baja oxigenación.

Así las cosas, concluimos que las objeciones emitidas por el señor Examinador carecen de todo fundamento ya que ninguno de los documentos D1 o D2 citados proporciona enseñanzas suficientes y contundentes como prueba de la supuesta falta de novedad y nivel inventivo de la presente invención, cuyo objeto reiteramos se diferencia de manera apropiada de dicho arte previo.

Ya que ninguna de las referencias citadas proporciona el debido soporte documental a las objeciones de novedad y nivel inventivo, pues las mismas se relacionan con materia ajena a la presente solicitud y además fallan en advertir al versado en la materia de los hallazgos y desarrollos que dan origen a esta divulgación, solicitamos de manera respetuosa sea reconocida la poca relevancia que implican los documentos D1 y D2 en el análisis de la patentabilidad de la presente invención.

Por último, en complemento de la argumentación precedente, es nuestra intención señalar que además de cumplir a cabalidad con los requisitos de novedad y nivel inventivo, la presente invención manifiesta un indicio adicional de nivel inventivo, el cual solicitamos sea tenido en cuenta como prueba contundente de su patentabilidad.

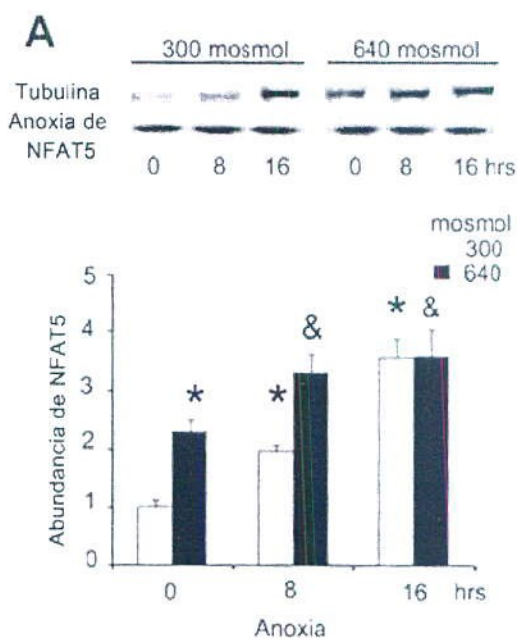


Figura 1A

Adaptada del capítulo descriptivo de la presente solicitud

De acuerdo con los resultados consignados en esta Figura 1A, destacamos que la presente invención se origina del descubrimiento inesperado de que la anoxia aumenta la expresión de NFAT5 en ausencia de estrés osmótico, haciendo posible a su vez aumentar aún más la expresión de NFAT5 mediante la administración de estrés osmótico solo.

Teniendo en cuenta que ninguno de los documentos D1 o D2, o cualquier otra referencia perteneciente al estado de la técnica anticipa o sugiere mínimamente la **relación existente entre la anoxia, el estrés osmótico y la expresión de NFAT5** ilustrada en la anterior figura y estudiada por esta solicitud, concluimos que la misma representa un hallazgo inesperado y sorprendente que como tal, ratifica la patentabilidad de la materia reivindicada.

A la luz de este **efecto técnico sorprendente**, solicitamos respetuosamente sea reconocido el nivel inventivo de la invención aquí reclamada, la cual insistimos resulta completamente meritoria del privilegio de patente.

Del mismo modo, consideramos pertinente agregar que en nuestra opinión, el examen conducido por el señor Examinador evidencia un enfoque altamente subjetivo en la medida que se limita a identificar, de manera aislada e inconexa, los diferentes elementos que definen la composición reivindicada en dos documentos del estado de la técnica, sin que estos realmente brinden instrucciones concretas respecto a **cómo** conseguiría el versado en la materia desarrollar una invención como la reivindicada sin la necesidad de aplicar su capacidad inventiva.

En este orden de ideas, afirmamos que la presente invención fue juzgada bajo un análisis en retrospectiva que estudia de manera superficial las divulgaciones del arte previo y presume, sin ningún fundamento, que la misma podría haber sido derivada de manera obvia cuando en realidad ninguno de los documentos D1 o D2 anticipa o sugiere cada uno de los elementos característicos de la invención reclamada a lo largo de este nuevo pliego reivindicatorio, y mucho menos referencia los efectos técnicos derivados de la misma.

Considerando entonces la argumentación presentada a lo largo de este memorial, concluimos que la novedad y nivel inventivo de la presente invención se mantienen vigentes a pesar de las objeciones y comentarios expresados en el Oficio técnico, las cuales hemos solucionado y aclarado de manera pertinente mediante las modificaciones y aclaraciones aquí expuestas.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la Decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar hipoxia en una muestra que comprende material celular, en donde el método comprende
 - a) proporcionar una muestra que comprende material celular;
 - b) concentrar los factores de transcripción NFAT5 que puedan estar presentes en la muestra; y
 - c) detectar y/o cuantificar los factores de transcripción NFAT5 concentrados en la etapa (b), en donde detectar y/o cuantificar los niveles elevados de los factores de transcripción NFAT5, comparados con condiciones de normoxia, indica que el material celular fue expuesto a condiciones de hipoxia.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es seleccionada del grupo consistente de una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de fluido cervical gingival, una muestra de saliva, una muestra de fluido sinovial, y una muestra de líquido amniótico.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (b) comprende concentrar los factores de transcripción NFAT5 presente en la muestra, usando métodos de inmunopurificación, métodos de inmunoprecipitación, centrifugación, tubos de centrífuga, ultracentrifugación, microfiltración, cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, y otros medios de microfiltro hasta 0.22 µm.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) se realiza usando un anticuerpo primario dirigido a NFAT5, y opcionalmente un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta y dirigido contra el anticuerpo primario, en donde la etiqueta del anticuerpo secundario conjugado se selecciona del grupo consistente de un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y un compuesto infrarrojo.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la etapa (c) se realiza usando el anticuerpo primario, y donde el anticuerpo primario se conjuga directamente con una etiqueta seleccionada del grupo consistente de un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y/o un compuesto infrarrojo.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el método incluye un paso para evaluar una condición y/o trastorno relacionado con hipoxia en

base a la presencia y/o nivel de los factores de transcripción NFAT5 detectados y/o cuantificados en la etapa (c).

7. Kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o el nivel de NFAT5 para determinar el inicio de un trastorno o condición relacionado con hipoxia en un paciente, en donde el kit comprende un medio para concentrar los factores de transcripción NFAT5 presentes en una muestra del cuerpo del paciente; y un medio para detectar y/o cuantificar los factores de transcripción NFAT5 en la muestra concentrada.

8. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque la muestra del cuerpo es seleccionada del grupo consistente de una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de fluido cervical gingival, una muestra de saliva, una muestra de fluido sinovial, y una muestra de líquido amniótico.

9. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el medio para concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra comprenden medios de inmunopurificación, o inmunoprecipitación, y donde el kit comprende anticuerpos, amortiguador de reacción adecuado, agentes o soluciones de bloqueo y soluciones madre de NFAT5.

10. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el kit comprende tubos de centrífuga, cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, otros medios de microfiltro hasta 0.22 micrómetros, o una combinación de éstos, que serán usados en métodos de laboratorio y dispositivos útiles para separar elementos más grandes de la muestra, como medios de concentración para los factores de transcripción.

11. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque los medios para detectar y/o cuantificar los factores de transcripción de NFAT5 comprenden un anticuerpo primario dirigido a NFAT5, y opcionalmente un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta y dirigido al anticuerpo primario; en donde la etiqueta del anticuerpo secundario es seleccionada del grupo consistente de un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y un compuesto infrarrojo.

12. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque el anticuerpo primario es conjugado directamente con una etiqueta seleccionada del grupo consistente de un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y un compuesto infrarrojo.

13. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque además comprende medios para obtener una muestra del cuerpo de un paciente.
14. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque los medios para obtener la muestra del cuerpo son seleccionados del grupo consistente de una sonda urinaria, un recipiente para recibir una muestra de orina, agujas, tubos Vacutainer, tubos, y jeringas para la obtención de sangre.

MÉTODO PARA MONITOREO, DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON HIPOXIA UTILIZANDO NFAT5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método y un kit para monitoreo, diagnóstico y/o pronóstico de trastornos relacionados con hipoxia utilizando NFAT5.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor nuclear de células T activadas 5 (NFAT5, TonEBP, u OREBP) es un gen humano que codifica un factor de transcripción que regula la expresión de los genes involucrados en el estrés osmótico.

La proteína de NFAT5 se expresa básicamente en todos los tejidos y tipos de células, particularmente en tejidos que a menudo se someten a estreses osmóticos, tales como los riñones, ojos, y piel. El mecanismo molecular de la respuesta de NFAT5 en el estrés osmótico es bien conocido, pero NFAT5 también está involucrado en otros roles biológicos, tales como el desarrollo embrionario, la migración celular inducida por integrina, y la proliferación celular. El mecanismo por el cual NFAT5 actúa en estos otros procesos no es muy conocido actualmente.

El NFAT5 (Factor nuclear de células T activadas 5) ha sido identificado como el factor de transcripción necesario para la supervivencia de las células renales en las condiciones desafiantes de la médula renal (Miyakawa H, 1999; Woo SK, 2000b). La proteína de NFAT5 se expresa altamente en la médula renal (Sykes, 2007). La delección de ambos alelos del gen que codifica para NFAT5 en ratones es embrionariamente letal, y aquellos ratones que sobreviven tienen atrofia profunda y progresiva de la médula renal (López-Rodríguez C, 2004). Ratones transgénicos (Tg) que sobre-expresan OREBPdn (forma dominante negativa de la función de TonEBP) específicamente en las células epiteliales de los túbulos recolectores renales tienen capacidad reducida para concentrar la orina, y muestran atrofia progresiva de la médula renal y estrechamiento cortical, lo cual en la mayoría de los casos está acompañado de hidronefrosis severa y pérdida de la estructura medular (Lam A, 2004).

NFAT5 es un miembro de la familia Rel de activadores de la transcripción, que incluye el factor nuclear κ B (NF κ B) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT). La hipertonidad aumenta el ARNm de NFAT5 en MDCK (Woo S, 2000b), HeLa (Ko BC, 2000) y células del

ducto recolector medular interior de ratón (mIMCD3) (Cai Q, 2005). La hipertonicidad aumenta transitoriamente el ARNm de NFAT5 y la abundancia de proteína (Woo S, 2000a), alcanzando el pico 4-12 h después de la hipertonicidad, dependiendo del tipo de célula. A 300 mOsm, NFAT5 está presente en el núcleo y citoplasma, pero después de la hipertonicidad se mueve rápidamente en el núcleo, induciendo su actividad transcripcional. En el riñón de rata, la localización nuclear de NFAT5 disminuye después de la carga de agua y aumenta después de la deshidratación (Cha JH, 2001). El gen objetivo NFAT5 contiene al menos un consenso de elemento de respuesta osmótica (ORE) (Ferraris J, 1994; Ferraris J, 1996; Ferraris J, 1999; Woo S, 2000a; Dahl SC, 2001) y sitio AP-1 (Irrazabal C, 2008). Adicionalmente, NaCl alto aumenta la actividad de transactivación de NFAT5 (Ferraris J, 2002a; Irrazabal CE, 2010). La activación de NFAT5 por estrés hipertónico provoca la inducción de varios genes implicados en la tolerancia osmótica, tal como aldosa reductasa (AR) (Burg M, 2007).

Existen reguladores moleculares corriente arriba positivos y negativos (Colla E, 2006; Chen Y, 2007) de la activación dependiente de tonicidad de la actividad de transactivación de NFAT5. Los reguladores positivos incluyen: AMPc dependiente de la proteína quinasa (PKA) (Ferraris J, 2002b); proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 (MAPK) (Ko BC, 2002); Fyn, un miembro de la familia SRC de proteínas tirosina quinasas citoplasmáticas, no receptoras (Ko BC, 2002); Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) (Irrazabal C, 2004, Zhang Z, 2005); fosfatidil 3-quinasa Clase IA (PI3K-IA) (Irrazabal C, 2006) y PLC γ 1 (Irrazabal 2010). Experimentos realizados utilizando células HEK293 y Jurkat demuestran que la PI3-K clase IA está corriente arriba de ATM en la activación de NFAT5 inducida por NaCl alto (Irrazabal C, 2006).

El paradigma actual postula que NFAT5 presenta activación dependiente de tonicidad dependiente de estrés oxidativo: antioxidantes que reducen ROS suprimen la activación inducida por NaCl alto de la actividad transcripcional de NFAT5 (Zhou X, 2005; Zhou X, 2006). El mecanismo de concentración de la orina en el riñón implica un aumento de la osmolalidad, asociado con PaO₂ bajo, lo cual permite que aumenten las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Rosas-Rodríguez JA, 2010). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que ATM (regulador de NFAT5) es activado durante la hipoxia e hipoxia-reoxigenación en células cancerosas (Hammond EM, 2004; Bencokova Z, 2009). Sin embargo, no existe información sobre el efecto de hipoxia sobre NFAT5. Nuestra hipótesis postula que la baja concentración de oxígeno podría inducir la activación de NFAT5. Para estudiar el efecto de la baja concentración de oxígeno sobre la expresión y actividad de NFAT5, utilizamos cultivos primarios de células

de IMCD y HEK293 de rata, desarrolladas en medios isotónicos e hipertónicos. También analizamos el efecto de la hipoxia sobre la muerte celular cuando NFAT5 fue derribado. Adicionalmente, sometimos a prueba el efecto *in vivo* de la hipoxia sobre la actividad de NFAT5 en un modelo experimental de isquemia/reperfusión (I/R) renal en la rata. En los riñones I/R medimos el ARNm y la abundancia de proteína de NFAT5, uno de sus genes corriente abajo (aldosa reductasa, AR) y dos de sus activadores corriente arriba (ATM y PI3K). Nuestros resultados demuestran que NFAT5 es activado *in vitro* e *in vivo* por hipoxia e isquemia/reperfusión.

Infarto de miocardio (MI) es la principal causa de muerte e incapacidad a nivel mundial y continúa siendo un principal problema de salud pública a pesar de los avances considerables en el diagnóstico y manejo a través de las últimas décadas (Thygesen K, 2007). Los principales determinantes del resultado del paciente después de MI son el tamaño de infarto de miocardio y remodelación del ventrículo izquierdo (LV). Mientras que el tamaño de infarto es determinado en una fase aguda después de MI, la remodelación del LV es un proceso de mala adaptación crónica, caracterizado por hipertrofia de miocardio, fibrosis, dilatación ventricular progresiva y deterioro del rendimiento cardíaco a través del tiempo, lo cual conlleva eventualmente a insuficiencia cardíaca congestiva. Uno de los elementos involucrados en la condición isquémica de MI es la hipoxia y no existe información sobre el rol de NFAT5 durante el MI.

En general, el sistema nervioso central (SNC) adulto posee una capacidad limitada para regeneración después de lesión, incluyendo isquemia. Después de una lesión isquémica, la recuperación del tejido neural está acompañada de la formación de astrogliosis reactiva; este proceso es vital para aislar el tejido necrótico de sus entornos no lesionados, pero concurrentemente, impide de modo marcado los procesos regenerativos. Poco después de la isquemia, ocurren una serie de desbalances radicales iónicos, neurotransmisores y oxidativos que conllevan a la activación de microglia y posteriormente a un aumento del número de astrocitos reactivos. Ambos tipos de células liberan citoquinas y otros productos solubles (Tian DS, 2007) que juegan un rol importante en procesos consecutivos, incluyendo la apoptosis de oligodendrocitos (Yang Y, 2011) y neuronas (Pettigrew LC, 2008). No existe información sobre el rol potencia de NFAT5 durante hipoxia en el SNC.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El documento WO2007114449A1 publicado en 2007 divulga que el entorno de baja glucosa y entorno de baja glucosa e hipoxia alrededor de un tumor también contribuye a su resistencia a la quimioterapia, y la inhibición del gen inducido por baja glucosa conlleva a la apoptosis de las

células tumorales. El documento proporciona microarrays para la detección de un microentorno de baja glucosa o un microentorno de baja glucosa e hipoxia, un método de tratamiento de tumores sólidos y un método de detecciones de tumores sólidos. El documento mencionó que NFAT5 es activado en condiciones de baja glucosa e hipoxia. Encontramos que la activación de NFAT5 es independiente de la concentración de glucosa; por lo tanto, el método y kit de la presente invención pueden identificar un rango más amplio de trastornos que están asociados con hipoxia dependiente o independiente del nivel de glucosa. El método y kit de la presente invención es una manera más rápida, más fácil y más económica para detectar los trastornos relacionados con hipoxia, debido a que sólo involucra la determinación de la presencia y/o nivel de NFAT5 en un líquido corporal tratado adecuadamente, y no requiere el uso de un microarray que involucra un grupo de genes o proteínas. La presente invención también muestra que NFAT5 puede responder a condiciones de hipoxia más extremas que HIF1, debido a que en las células HEK293 (4 horas de hipoxia), la inducción de NFAT5 fue máxima a 1% de O₂; sin embargo, la inducción de HIF1 fue máxima a 2.5% de O₂, a pesar de que es inducida a 1% de O₂. Por otro lado, NFAT5 es inducida por hipertonicidad e hipoxia, pero HIF1 es inducida sólo por hipoxia; por lo tanto, NFAT5 tiene una respuesta más general a diferentes noxas. Además, NFAT5 se expresa básicamente en todos los tejidos, y HIF1 no. Esta situación permite que NFAT5 reaccione más rápido a HIF1 que la noxa. Finalmente, encontramos que la activación de NFAT5 por hipoxia es independientemente de HIF1.

Los trabajos comparativos “Evaluación comparativa de marcadores clínicos moleculares de lesión renal temprana en trasplante de riñón” y “Exosomas urinarios, un nuevo sustrato para buscar biomarcadores de insuficiencia renal temprana en trasplante de riñón” expuesto en el XXVI Congreso de Nefrología-Hipertensión-Trasplante” (Chile, Noviembre 2009), divulgan investigaciones previas del inventor de la presente invención. NFAT5 se determinó como un biomarcador de lesión renal aguda; sin embargo, en la presente invención, NFAT5 tiene una aplicación más amplia, como un biomarcador para cualquier trastorno asociado con hipoxia, tal como, pero sin carácter limitativo, apoplejía, ataque cardíaco, cáncer, trastornos cardíacos, trastornos circulatorios oclusivos, arteriosclerosis, infarto de miocardio, trastornos relacionados con reperfusión isquémica, retinopatía diabética, artritis reumatoide, condiciones asociadas con trasplante de órganos, trastornos inflamatorios, sufrimiento neonatal, isquemia, anemia, infecciones, y retardo de crecimiento intrauterino.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para el monitoreo, diagnóstico, y/o pronóstico de trastornos relacionados con hipoxia utilizando NFAT5, caracterizado porque el método comprende los pasos de a) proporcionar una muestra corporal; b) concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra; c) detectar NFAT5 en la muestra tratada.

La invención además comprende un kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o nivel de NFAT5, para la determinación simple del inicio de un trastorno o condición relacionado con hipoxia en un paciente, caracterizado porque el kit comprende medios para concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra y medios para detectar NFAT5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para el monitoreo, diagnóstico y/o pronóstico de trastornos relacionados con hipoxia utilizando NFAT5, caracterizado porque el método comprende los pasos de a) proporcionar una muestra corporal; b) concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra; c) detectar y/o cuantificar NFAT5 en la muestra tratada.

En una materialización física, la muestra corporal es sangre, orina, líquido crevicular gingival, saliva, líquido sinovial, y/o líquido amniótico.

La presente invención considera como medios para concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra, métodos de laboratorio y dispositivos útiles en separar elementos más grandes de la muestra, que podrían interferir en la fase de detección más adelante. Por ejemplo, los elementos de interferencia pueden ser células del paciente. Los métodos de inmunopurificación y/o inmunoprecipitación se pueden considerar como medios de concentración. Los tubos de centrifuga se pueden considerar como medios de concentración, debido a que el procesamiento en una centrifuga de laboratorio permite eliminar partículas más grandes, tales como por ejemplo células. En una materialización física, la muestra se somete a centrifuga por 5 a 30 minutos a 5000-10000 rpm. En otra materialización física, la muestra se somete a ultracentrifuga por 30 a 120 minutos a 30000-45000 rpm.

La microfiltración se puede considerar como medio de concentración. Los cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, u otros medios de microfiltro, hasta de 0.22 μm también se consideran como medios de concentración.

En otra materialización física de la invención, el método considera, como medio para detectar y/o cuantificar NFAT5, un anticuerpo primario dirigido a NFAT5, y un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta, dirigido al anticuerpo primario. La etiqueta del anticuerpo

secundario puede ser un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y/o un compuesto infrarrojo.

Opcionalmente, el anticuerpo primario puede ser conjugado directamente con una etiqueta, en cuyo caso no se necesita el anticuerpo secundario. El anticuerpo primario también puede ser conjugado con un marcador radioactivo, un compuesto químico, y/o un compuesto infrarrojo.

El método opcionalmente incluye un paso para evaluar una condición y/o trastorno relacionado con hipoxia en un paciente para el monitoreo, diagnóstico, pronóstico y/o determinación de un tratamiento en el paciente en base a la presencia y/o nivel de NFAT5.

NFAT5 puede utilizarse como un biomarcador para cualquier trastorno asociado con hipoxia, tal como, pero sin carácter limitativo, apoplejía, ataque cardíaco, cáncer, trastornos cardíacos, trastornos circulatorios oclusivos, arteriosclerosis, infarto de miocardio, trastornos relacionados con reperfusión isquémica, retinopatía diabética, artritis reumatoide, condiciones asociadas con trasplante de órganos, trastornos inflamatorios, sufrimiento neonatal, isquemia, anemia, infecciones, y/o retardo de crecimiento intrauterino.

La Tabla 1 presenta algunas condiciones asociadas con hipoxia que pueden ser evaluadas utilizando determinación de NFAT5 y el líquido corporal donde debe determinarse NFAT5.

Tabla 1: Condiciones asociadas con hipoxia y líquido corporal asociado

Condición	Líquido corporal
Apoplejía	sangre / orina
Ataque cardíaco	sangre / orina
Cáncer	sangre / orina
Trastornos cardíacos	sangre / orina
Trastornos circulatorios oclusivos	sangre / orina
Arteriosclerosis	sangre / líquido sinovial
Infarto de miocardio	sangre / orina
Trastornos relacionados con reperfusión isquémica	sangre / orina
Retinopatía diabética	sangre / orina

Condición	Líquido corporal
Artritis reumatoide	sangre / líquido sinovial
Condiciones asociadas con trasplante de órganos	sangre / líquido sinovial
Trastornos inflamatorios	sangre / orina
Sufrimiento neonatal	sangre / orina / líquido amniótico
Isquemia	sangre / orina
Anemia	sangre / orina
Infecciones	sangre / orina / saliva / líquido crevicular gingival
Retardo de crecimiento intrauterino	sangre / orina / líquido amniótico

La invencion además comprende un kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o nivel de NFAT5, para la determinación simple del inicio de un trastorno o condición relacionada con hipoxia en un paciente, caracterizado porque el kit comprende medios para concentrar los factores de transcripción presentes en una muestra corporal y medios para detectar y/o cuantificar NFAT5.

En una materialización física, la muestra corporal es sangre, orina, líquido crevicular gingival, saliva, líquido sinovial, y/o líquido amniótico.

Opcionalmente, el kit de diagnóstico comprende medios para obtener una muestra corporal de un paciente. En una materialización física particular, los medios para obtener la muestra corporal se seleccionan de, pero sin carácter limitativo, una sonda urinaria, un recipiente para recibir una muestra de orina, agujas, preferiblemente agujas Vacutainer, tubos, y jeringas o una combinación de los mismos.

El kit de a presente invención incluye medios para concentrar los factores de trascripción presentes en la muestra. Los medios de inmunopurificación y/o inmunoprecipitación se consideran medios de concentración; por lo tanto, en una materialización física, el kit de la

presente invención comprende anticuerpos, y amortiguador de reacción idónea para permitir que los anticuerpos interactúen con los dominios de proteínas a las cuales se dirigen. El kit también comprende agentes o soluciones bloqueadoras y soluciones madre de NFAT5. En otra materialización física, el kit también puede comprender tubos de centrífuga, cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, otros medios de microfiltro, de hasta 0.22 micrómetros, o una combinación de los mismos, para ser utilizados en métodos y dispositivos de laboratorio útiles en separar elementos más grandes de la muestra, que se pueden considerar medios de concentración.

En otra materialización física de la invención, el kit considera, como medios para detectar y/o cuantificar NFAT5, un anticuerpo primario dirigido a NFAT5, y un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta, dirigido al anticuerpo primario. La etiqueta del anticuerpo secundario puede ser un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radioactivo, un compuesto químico, y/o un compuesto infrarrojo.

Opcionalmente, el anticuerpo primario puede ser conjugado directamente con una etiqueta, en cuyo caso, no se necesita el anticuerpo secundario. El anticuerpo primario también puede ser conjugado con un marcador radioactivo, un compuesto químico, y/o un compuesto infrarrojo.

El kit de la invención opcionalmente comprende instrucciones para utilizar el kit.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Anoxia aumenta la abundancia de proteína de NFAT5 y promueve la translocación nuclear. **A.** Células de IMCD primarias de rata en medio isotónico (300mOsM) o hipertónico (640 mOsM) fueron expuestas a anoxia (reemplazo de O_2 por N_2) por 0, 8, ó 16 horas. Preparamos homogenatos de proteína total y determinamos la abundancia de proteína de NFAT5 mediante Western Blot. En la sección superior se muestra una imagen representativa y el grafico muestra la media $\pm$ SEM. * o & $P \leq 0.05$; $n=5$. (*frente a 300mosmol/normoxia y & frente a 640mosmol/normoxia). **B.** Distribución celular de NFAT5 después de 2 horas de anoxia evaluada en células de IMCD primarias mediante inmunofluorescencia. B1: Etiquetado de NFAT5 (Alexa488); B2: núcleos (Hoechst); B3: Fusión. **C.** Células HEK293 que expresan de modo estable ORE-X (un gen informante específico de NFAT5) cultivado a 300 mosmol o 500 mosmol por 16 horas; durante este tiempo, las células fueron expuestas por 0, 8 ó 16 horas a anoxia, y se usó ensayo informante de luciferasa para evaluar la actividad de transcripción; Media $\pm$ SEM. (* o &, $P < 0.05$; $n=5$). **D.** Células HEK293 cultivadas a 300 mosmol fueron expuestas por 2 horas a anoxia (a) o normoxia (n). Fracciones nucleares y citoplasmáticas

fueron separadas por NE-PER y se determinó abundancia de NFAT5 mediante Western Blot. El gráfico de barras representa Media $\pm$ SEM. * indica $P < 0.05$; $n = 5$.

Figura 2: Hipoxia induce NFAT5 después que HIF-1 α . Células HEK293 cultivadas a 300 mosmol fueron expuestas por 0, 4, 8, y 16 horas a hipoxia (2.5% de PO₂). La expresión del gen HIF-1 α se determinó mediante qRT-PCR (A) y Western Blot (B). La expresión del gen NFAT5 se determinó mediante qRT-PCR (C) y Western Blot (D). La abundancia de proteína se normalizó mediante tubulina (Tub). Media $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$; $n = 5$.

Figura 3: Reguladores de proteína de NFAT5, ATM y PI3-K, fueron inducidos en células HEK293 mediante hipoxia. Células HEK293 cultivadas a 300 mosmol fueron expuestas por 0, 4, 8 y 16 horas a hipoxia (2.5% of PO₂). **A.** La respuesta de la fosforilación de ATM (normalizada por ATM total) en el transcurso del tiempo se midió mediante Western Blot. **B.** La respuesta en el transcurso del tiempo de la activación de PI3-K se midió mediante Western Blot de abundancia de proteína p110 α (normalizada por tubulina: Tub). **C.** La fosforilación de AKT-308 (normalizada por AKT total) se midió mediante Western Blot. En la sección superior se muestra una imagen representativa. Media $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$; $n = 5$.

Figura 4: NFAT5 tiene un rol protector contra hipoxia. Células HEK293 cultivadas a 300 mosmol fueron transfectadas con control y ARNsi de NFAT5. 48 horas después de la transfección, las células fueron expuestas por 8 horas a 2.5% de PO₂. **A.** Western Blot de NFAT5, M30 y caspasa-3 segmentada se midieron en lisato celular. **B.** La actividad de deshidrogenasa láctica (LDH) se sometió a ensayo en medio de cultivo celular mediante determinación espectrométrica de NADH. Media $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$; $n = 5$.

Figura 5: Función renal después de I/R experimental **A.** Daño tisular evaluado mediante coloración con PAS. Bordo en cepillo, aplanamiento del epitelio y mitosis estuvieron presentes en los riñones de animales I/R. **B.** Creatinina sérica tratada con placebo (mg/dl) y 24-96 horas post-isquemia. **C.** Proporción de orina y plasma (U/P) de osmolalidad de animales tratados con placebo y 24-96 horas post-isquemia. Media $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$; $n = 5$.

Figura 6: NFAT5 y HIF-1 α son inducidos en riñones post-isquémicos. **A.** Secciones de riñones de animales tratados con placebo y de animales I/R (72 horas) se incubaron con anti-NFAT5 de conejo. Se muestran imágenes representativas de medula tratada con placebo y de animales I/R. El suero pre-inmune no se manchó significativamente (no se muestran los datos). Barra de escala = 100 μ m. Las flechas indican la localización del marcador correspondiente para NFAT5. **B.** La abundancia de ARNm de NFAT5 en corteza y médula de riñones se

determinó mediante qRT-PCR. **C.** La abundancia de proteína NFAT5 en corteza y médula de riñones se determinó mediante Western Blot. **D.** La abundancia de proteína HIF-1 α en corteza y médula de riñones se determinó mediante Western Blot. En la sección superior se muestra una imagen representativa. Todos los valores son Media $\pm$ SEM. * o & indica $P < 0.05$; $n = 5$ (* frente a médula tratada con placebo y & frente a corteza tratada con placebo).

Figura 7: I/R Experimental indujo expresión de Aldosa Reductasa (AR) renal. **A.** Abundancia de proteína AR en homogenatos de proteína de corteza y médula de riñón de rata determinada mediante Western Blot. En la sección superior se muestra una imagen representativa. **B.** Abundancia de ARNm de AR en corteza y médula renal medida mediante qRT-PCR. Media $\pm$ SEM. * o & indica $P < 0.05$; $n = 5$ (*frente a médula tratada con placebo & frente a corteza tratada con placebo).

Figura 8: Reguladores de proteína de NFAT5, ATM y PI3-K, fueron inducidos en riñones post-isquémicos. La abundancia de proteína ATM y PI3-K (p110 α) se midió mediante Western Blot en corteza y médula de riñón de rata. **A.** En la sección superior se muestra una imagen representativa ($n = 5$). **B.** Abundancia de ATM relativa. **C.** Abundancia de p110 α relativa Media $\pm$ SEM. * o & indica $P < 0.05$; $n = 5$ (* frente a médula tratada con placebo & frente a corteza tratada con placebo).

Figura 9: Infarto de miocardio indujo NFAT5. Los niveles de ARNm de NFAT5 se midieron mediante qRT-PCR en el ventrículo izquierdo de animales tratados con placebo y animales con infarto de miocardio (MI) ($n = 5$, $p > 0.05$).

Figura 10: Hipoxia indujo NFAT5 en cultivos primarios de neuronas corticales. Los niveles de proteína de NFAT5 se midieron mediante Western Blot en neuronas corticales primarias cultivadas de rata, expuestas a normoxia (21% de O₂) e hipoxia (1% de O₂) por 8 horas ($n = 3$, $p > 0.05$).

Figura 11: Hipoxia indujo NFAT5 en cultivos primarios de linfocitos purificados. Los niveles de proteína de NFAT5 se midieron mediante Western Blot en linfocitos cultivados primarios de seres humanos, expuestos a normoxia (21% de O₂) e hipoxia (1% de O₂) por 8 horas ($n = 3$, $p > 0.05$).

Figura 12: Hipoxia indujo NFAT5 en cultivos primarios de fibroblasto. Los niveles de proteína de NFAT5 se midieron mediante Western Blot en fibroblasto de piel cultivado primario de seres humanos, expuestos a normoxia (21% de O₂) e hipoxia (1% de O₂) por 8 horas ($n = 3$, $p > 0.05$).

SECCIÓN EXPERIMENTAL

En esta sección se brindan ejemplos ilustrativos como guía; por lo tanto, no debe considerarse que estos ejemplos son limitantes.

Ejemplo 1: NAFT5 es inducido en hipoxia renal.

Animales.

Ratas Sprague-Dawley machos adultos (250 g, n=5 para cada grupo de I/R: 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas) se albergaron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales se sometieron en el momento del inicio de la lesión isquémica bilateral y después de completar los experimentos. Los animales tuvieron alimento a discreción y agua controlada y se mantuvieron en las instalaciones del centro animal de la Universidad. Todos los procedimientos experimentales estuvieron de acuerdo con los estándares institucionales e internacionales para el cuidado humano y uso de animales de laboratorio (Aseguramiento de Bienestar de Animales Publicación A5427-01, Oficina para la Protección de Riesgos de Investigación, División de Bienestar de Animales, Los Institutos Nacionales de Salud).

Lesión por isquemia/reperfusión renal.

Los animales se anestesiaron con ketamina:xilazina (25:2.5 mg/kg, ip), manteniendo una temperatura corporal de 37°C. Ambos riñones fueron expuestos mediante una incisión lateral, y ambas arterias renales fueron ocluidas con una grapa vascular no traumática por 30 minutos. Después de 30 minutos de sujeción con grapa, se retiraron las grapas, se re-estableció el flujo de sangre renal, se suturaron ambas incisiones, y se permitió que las ratas se recuperen en una sala caliente. Las ratas se sometieron a eutanasia bajo anestesia (ketamina:xilazina) 24, 48, 72 y 96 horas después de la reperfusión; ambos riñones se retiraron y procesaron para inmunohistoquímica, PCR de tiempo real y prueba Western Blot (Irrarazabal C, 2006; Villanueva V, 2006). Un grupo de animales tratados con placebo fue incluido; los riñones de estos animales fueron expuestos mediante una incisión lateral, pero estos no recibieron oclusión de arteria renal.

Cultivo y Tratamiento Celular

Células primarias cultivadas se obtuvieron de la médula interior renal de ratas Sprague-Dawley machos (120-150 g de peso corporal). El tejido papilar se picó finamente con una cuchilla quirúrgica bajo condiciones estériles. El tejido fue digerido en un medio de cultivo de 10 ml (DMEM/F12 de Ham, 5 mg/ml de transferencia, 5 mg/ml de insulina humana, 50 nM de hidrocortisona, 5 pM de triiodotironina, 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin)

más 20 mg de colagenasa y 7 mg de hialuronidasa a 37°C en un agitador por 90 minutos. Después que el tubo se sometió a centrifuga a 1000 rpm por 1 minuto, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se suspendió en DMEM/F12 de Ham. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente, el sedimento se suspendió en medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal (FBS) y se cultivó en una placa de cultivo de 30 mm. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Células HEK293 y células HEK293 que expresaban de modo estable ORE-X (un gen informante específico de NFAT5, HEK293OREX; Irarrazabal C, 2006) se cultivaron en un medio de 300 mosmol/kg de acuerdo con las instrucciones de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Hipoxia en cultivos celulares

Las células cultivadas se incubaron en medio isotónico (300 mOsm) o hipertónico (500 ó 640 mOsm) por 24 horas. Se agregó NaCl al medio de cultivo isotónico para hacer hipertónicas a las soluciones. Después de 24 horas de cultivo en medio isotónico o hipertónico, las células se incubaron en condiciones anóxicas o hipóxicas (2.5%) para experimentos en el transcurso del tiempo (0, 4, 8 ó 16 horas a 37°C). Se obtuvieron condiciones hipóxicas o anóxicas reemplazando el oxígeno con N₂, utilizando una incubadora de CO₂ Heracell 150i (Thermo Scientific).

Ensayos con Luciferasa

Células HEK293 se cultivaron como se describe anteriormente. La solución de cultivo se cosechó y el sobrenadante se recuperó mediante centrifugación a 2000 rpm. Células HEK293-OREX (Irarrazabal C, 2004, 2006, 2010) se cultivaron en medio isotónico (300 mOsm) o hipertónico (640 mOsm) por 16 horas. En ambas condiciones osmóticas, las células fueron expuestas a anoxia (0, 8 ó 16 horas a 37°C) como se describe anteriormente. La actividad de luciferasa se midió con el Sistema de Ensayo con Luciferasa (Promega, Madison, WI) utilizando el BiotexLuminometer. La actividad de luciferasa se expresó en unidades de luz relativas (RLU) por µg de proteína celular total.

Actividad de Deshidrogenasa Láctica (LDH)

La fuga de LDH dentro del medio de cultivo se midió utilizando ensayo con LDH, en base a la oxidación de NADH en presencia de LDH debido a la transformación de piruvato en lactato. La concentración de NADH se midió a 340 nm utilizando el Espectrofotómetro 1300 GenQuant™ (GE Healthcare).

Análisis Western Blot

La proteína total se midió utilizando el Kit de Ensayo con Proteína BCA, (Pierce, Rockford, IL). Las secciones de corteza y médula de riñón de la mitad de un riñón se homogenizaron con un homogenizador Ultra-Turrax en un amortiguador de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% de Triton X-100, inhibidor de proteasa (Complete Mini, Roche Applied Science, Indianápolis, IN), y cócteles del inhibidor de la fosfatasa (Cócteles del Inhibidor de la Fosfatasa 1 & 2, Sigma, St. Louis, MO). Los homogenatos luego se sometieron a centrifuga (15,000 X g, 10 min) y el sobrenadante se almacenó (-70°C) para SDS_PAGE y análisis Western Blot. Las proteínas se separaron en 7.5 ó 10% de geles de Tris-Glicina y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA). El análisis Western Blot se realizó de acuerdo con condiciones estándar (Irrarrazabal C, 2010). En resumen, después del bloqueo de unión no específica, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-NFAT5 (NFAT5) de conejo (Affinity BioReagents, Golden, CO), anti-AR de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-tubulina de conejo (Cell Signalling), anti-Caspasa-3 (Asp175) (Cell Signalling), anti-M30 CytoDEATH (ROCHE), anti-ATM (Cell Signalling), anti-phospho ATM (Cell Signalling), anti-p110alpha (Cell Signalling), anti-AKT (Cell Signalling), anti-phosphoAKT-308 (Cell Signalling) o anti-HIF1 α de ratón (Abcam) durante toda la noche a 4°C. Después de lavar con 0.1% de Tween-20 en PBS, las manchas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP) adecuada por 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron utilizando una técnica de quimioluminiscencia mejorada (PerkinElmer, Life Sciences, Boston, MA). Las manchas se escanearon y se análisis densitométrico se realizó utilizando el dominio público NIH Image program v1.61 (US National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nihimage>).

Microscopía por fluorescencia.

Se desarrollaron células IMCD de rata de primer paso en Cámara-Diapositivas de 8 cavidades (Lab-Tek, Nunc). Después de 24 horas de cultivo en medio isotónico (300 mOsM), las diapositivas de cultivo tisular se incubaron por 2 horas en anoxia (O₂ remplazado por N₂, incubadora con CO₂ de Heracell 150i; Thermo Scientific). Después de este tiempo, el medio de cultivo se retiró rápidamente, se agregó el reactivo de fijación (100% de metanol frío) y las células se almacenaron durante toda la noche a -20°C. Luego, las células se lavaron, incubaron en presencia de solución bloqueadora (1 hora, temperatura ambiente) e incubaron con anticuerpo anti-NFAT5 (1 hora, temperatura ambiente). Después de lavar, se agregó el anticuerpo secundario (1 hora de Alexa 488-Green, dilución de 1:200, Invitrogen). Los núcleos se mancharon con Hoechst (Sigma). Las diapositivas se montaron y la distribución celular de

NFAT5 se analizó mediante microscopía por fluorescencia utilizando un microscopio vertical Olympus BX61WI con una unidad de disco giratorio Olympus DSU. Las imágenes se registraron con la cámara de video de dispositivo acoplado con carga enfriada (SIS-FVT2, OLYMPUS) y se analizaron utilizando el software de imágenes (CellM&CellR, OLYMPUS).

Análisis inmunohistoquímica y determinación de daño tisular.

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica en secciones incrustadas con Paraplasto mediante procesamiento tisular de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. En resumen, las secciones tisular se desparafinaron, rehidrataron, enjuagaron en 0.05 M solución salina amortiguada con tris-fosfato (TPS) (pH 7.6) e incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 22°C. Luego, cada una de las secciones se lavó tres veces por 5 minutos, seguido por 30 minutos de incubación a 22°C con el anticuerpo secundario correspondiente y con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Las señales inmunoreactivas se revelaron utilizando 3,3'-diaminobenzidina al 0.1% (peso/vol) y solución de peróxido de hidrógeno al 0.03% (vol/vol). Se utilizó tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) para determinar el daño tisular.

PCR de Tiempo Real

El ARN total se aisló utilizando TRIzol (GIBCO, Life Sciences) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó ADNc a partir de ARN total (0.5 µg) utilizando un sistema de transcripción inversa (hexámeros aleatorios, Improm II Reverse Transcriptase System; Promega). Se realizó PCR en muestras de ADNc de 8 ng y 80 ng por reacción de 20:1 por triplicado para cada experimento (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega). Se detectaron amplicones para Detección por Fluorescencia en Tiempo Real (Rotor-Gene Q, Qiagen). Los cebadores utilizados para qPCR fueron:

para aldosa reductasa (AR):

SEQ ID NO: 1: 5'ATTCGTCCACCACAGCTTCAGACT-3' y

SEQ ID NO: 2: 5'AGCAATGAGGACATGGCCACTCTA-3';

para NFAT5:

SEQ ID NO: 3: 5'TTCATCTCATTGCTCAGCG-3' y

SEQ ID NO: 4: 5'-GGGAGAAGATCATAGACAGATTTC-3';

para HIF-1α:

SEQ ID NO: 5: 5'-ACCTCTGGACTTGCCTTTC-3' y

SEQ ID NO: 6: 5'-TTTTTCTTGTCGTTTCGCGC-3'. y

para 18S (limpieza):

SEQ ID NO: 7: 5'-TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGA-3' y

SEQ ID NO: 8: 5'TCTTGGCAAATGCTTTCGCTCTGG-3'.

El sistema de detección registra el número de ciclos de PCR (Ct) requeridos para producir una cantidad de producto igual a un valor de umbral, el cual es una constante. A partir de los valores de Ct, calculamos la abundancia relativa de ARNm en cada condición experimental, y los valores se normalizaron para la abundancia relativa de cada transcripción en tejido de animales tratados con placebo emparejados, como se describe (Irrarrazabal C, 2010).

Análisis Estadístico

Los datos se expresan como promedio $\pm$ SEM. Los valores de diferentes grupos se evaluaron con la prueba t de Student paramétrica cuando se compararon dos grupos y Anova para múltiples comparaciones con una prueba de Fisher post-hoc cuando se compararon más de dos grupos. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

Efecto de hipoxia sobre NFAT5.

Analizamos el efecto de anoxia sobre la abundancia de proteína de NFAT5 en cultivos primarios de células túbulo recolector medular interior (IMCD) de riñón de rata. Las células de IMCD se cultivaron en medio isotónico (300 mOsM) o hipertónico (640 mOsM) por 24 horas. Como se esperaba, la hipertonidad aumentó la abundancia de NFAT5 en células primarias de IMCD (Figura 1A, 0 horas de anoxia). En medio isotónico, anoxia indujo una abundancia de proteína de NFAT5 de 120 y 250% sobre el control, después de 8 y 16 horas de anoxia, respectivamente (Figura 1A).

En la condición hipertónica (24 horas), 8 horas de anoxia provocó una inducción adicional de abundancia de proteína de NFAT5 (Figura 1A, 8 horas de anoxia). De modo interesante, 16 horas de anoxia indujeron abundancia de proteína de NFAT5 independiente de la tonicidad (Figura 1A, 16 horas de anoxia).

Sometimos a prueba el efecto de PaO_2 bajo sobre la activación de NFAT5. Primero, evaluamos su translocación nuclear en células primarias de IMCD bajo anoxia. Utilizando microscopía por fluorescencia, observamos que la localización nuclear de NFAT5 se indujo después de 2 horas de anoxia (Figura 1B), lo cual sugiere la activación de NFAT5 en este momento. Luego,

evaluamos la actividad transcripcional de NFAT5 utilizando células HEK293OREX (que expresan de modo estable un gen informante) (Irrarrazabal C, 2010). En medio isotónico, 16 horas de anoxia aumentaron 4 veces la actividad transcripcional de NFAT5 (Figura 1C). En medio hipertónico, anoxia (16 horas) indujo 9.6 veces la actividad transcripcional sobre la condición de normoxia (21% de oxígeno y 500 mosmol; Figura 1C). Estos resultados muestran que anoxia indujo la actividad transcripcional de NFAT5 independiente de tonicidad. Utilizando células HEK293 y análisis Western Blot, confirmamos la translocación nuclear de NFAT5 provocada por anoxia (Figura 1D), observada con células de IMCD expuestas a anoxia (Figura 1B).

Para ganar cierta percepción dentro de los mecanismos potenciales que conllevan a la activación de NFAT5 mediante oxígeno bajo, evaluamos el curso de tiempo de activación de NFAT5 y el factor de transcripción clásico inducido por hipoxia (HIF-1 α) en respuesta a hipoxia (2.5% de O₂). Observamos inducción de ARNm de HIF-1 α y proteína que se inició después de 4 horas de hipoxia, con un máximo de 8 horas (2.5% de O₂, Figura 2A y 2B). Sin embargo, la inducción de ARNm y proteína de NFAT5 se observó sólo después de 8 horas de hipoxia y continuó aumentando hasta 16 horas (Figura 2C y 2D). Luego, estudiamos las vías de señalización potencial involucradas en la activación de NFAT5 mediante hipoxia. En estudios previos, demostramos que ATM y PI3-K (p110 α) son dos reguladores positivos de NFAT5 en respuesta a NaCl alto (Irrarrazabal 2004, 2006). Células HEK293 expuestas a hipoxia demostraron activación de ATM dependiente del tiempo, según se indicó mediante el aumento de fosforilación de ATM después de 8 y 16 horas de exposición a 2.5% de O₂ (Figura 3A). Además de ATM, el PI3-K también se activó mediante hipoxia en células HEK293. Observamos un aumento significativo tanto en abundancia de p110 α y fosforilación de AKT-308 que se inició después de 8 horas de hipoxia (Figura 3B and 3C).

Debido a que NFAT5 es un factor pro-supervivencia en estrés osmótico, investigamos el rol potencial de NFAT5 en tolerancia celular para hipoxia. La transfección transitoria de células HEK293 con ARNsi de NFAT5 disminuyó la abundancia de proteína de este factor de transcripción, en comparación con células transfectadas con ARNsi revuelto (control, Figura 4A). Para calcular el estado de apoptosis en hipoxia, medimos caspasa-3 segmentada y M-30 en células HEK293. Caspasas 3 y 9 activas se dirigen a las proteína K8/18 de la red de filamentos intermedia celular, y el anticuerpo monoclonal M30 CytoDEATH reconoce un neo-epítipo expuesto después de la segmentación de K18 mediante caspasas. En la cascada apoptótica, estos eventos preceden la pérdida de asimetría de membrana y fragmentación de ADN.

Caspasa-3 segmentada y M-30 se aumentaron después de 8 horas de hipoxia en células transfectadas de control; cuando NFAT5 fue derribado y las células fueron expuestas a hipoxia, estos dos marcadores apoptóticos fueron inducidos (Figura 4A). También evaluamos muerte celular midiendo la actividad de deshidrogenasa láctica (LDH) en el medio de cultivo. La actividad de LDH se aumentó en células hipóxicas (2.5% de O₂, Figura 4B). El derribo de NFAT5 mediante ARNsⁱ aumentó la actividad de LDH (Figura 4B). Estos resultados sugieren que NFAT5 tiene un rol protector contra la muerte celular inducida por hipoxia.

Expresión NFAT5 en riñones expuestos a I/R experimental.

Usamos análisis morfológicos y funcionales para evaluar el daño renal en el I/R experimental en ratas. Las secciones del riñón teñidas con PAS mostraron alteraciones en la morfología del riñón de 48 horas después de I/R (Figura 5A). Las alteraciones más evidentes fueron el aplanamiento del borde de cepillo del epitelio y un gran porcentaje de células experimentaron mitosis en células tubulares proximales. Estas alteraciones fueron casi indetectables 96 horas después de I/R (no se muestran los datos). Los animales I/R tuvieron niveles de creatinina sérica mayores que los animales de simulación después de 24 horas de I/R (1.2 mg/dl; Figura 5B), que se recuperaron después de 96 horas. La concentración en la orina, como se estimó mediante la determinación de la relación U/P osmolaridad, mostró que los animales I/R experimentales excretaron menos orina concentrada que los animales de simulación de 24 a 96 horas de I/R (Figura 5C).

La activación de la respuesta de hipoxia se demostró previamente, usando el mismo modelo de I/R experimental en el riñón de las ratas (2-pimonidazol y HIF-1 α ; Villanueva S, 2006). La expresión de NFAT5 se evaluó en los riñones de animales I/R de simulación y experimentales mediante inmunohistoquímica, qRT-PCR y Western blot. Los análisis inmunohistoquímicos de NFAT5 mostraron mayor inmunoreactividad en la médula renal de animales I/R en comparación con animales de simulación (Figura 6A). La señal aumentó en los núcleos de células tubulares y de vasos sanguíneos (Figura 6A; ver flechas), sugiriendo la activación de NFAT5 en el riñón inducida por isquemia y reperfusión.

Usando qRT-PCR y Western blot, estudiamos la activación del transcurso de tiempo de NFAT5 en los riñones de animales de simulación y animales I/R. A las 24 horas, los riñones de animales I/R experimentales no tuvieron diferencias en ARNm de NFAT5 y abundancia de proteínas, en comparación con los animales de simulación. Sin embargo, después de 48 horas de reperfusión la abundancia de proteína NFAT5 (Figura 6B) y ARNm (Figura 6C) aumentó significativamente en la corteza y médula. También hemos evaluado la abundancia de la

proteína HIF-1 α en los riñones con I/R experimental y los resultados mostraron significativa inducción de HIF-1 α , tanto en la corteza como en la médula (Figura 6C), alcanzando el pico después de 24 horas de la reperusión. Para evaluar la actividad de NFAT5 en los riñones de animales I/R experimentales, analizamos el gen objetivo NFAT5, Aldosa Reductasa (AR). En las condiciones basales ARNm de AR y la abundancia de proteínas fue mayor en la médula que la corteza de animales de simulación (Figura 7). I/R aumentó la expresión de AR, tanto en la corteza como en la médula de los riñones con un tiempo de inducción de NFAT5 similar (Figura 7).

Finalmente, estudiamos la abundancia de la proteína ATM y PI3-K (p110 α) *in vivo* (I/R experimental) y sus actividades *in vitro* (2.5% oxígeno en células de cultivo). Los riñones de animales I/R mostraron un aumento en la abundancia de la proteína ATM y p110 α en la corteza y médula (Figura 8). Después de I/R, ambas proteínas aumentaron de acuerdo con un lapso de tiempo similar al de la inducción de NFAT5 (Figura 8B-C). Sin embargo, p110 α fue ligeramente detectable en la corteza renal (Figura 8).

Regulación superior de NFAT5 por bajo PO₂.

Nuestros resultados mostraron que anoxia o hipoxia (1 a 2.5% oxígeno) indujo a la abundancia de la proteína NFAT5 en células epiteliales y células HEK293 de riñón primarias cultivadas. La inducción de NFAT5 bajo anoxia/hipoxia se observó cuando las células epiteliales se cultivaron en un medio isotónico y también cuando las células se cultivaron en un medio hipertónico (500 ó 640 mOsm). También, observamos que la hipertonicidad e hipoxia tuvieron efectos aditivos en la inducción de NFAT5. Todos estos datos sugieren que el bajo PO₂ es un regulador positivo de la expresión de NFAT5, independientemente de la hipertonicidad en las células de riñón.

El aumento de la abundancia de NFAT5 causado por anoxia en células IMCD cultivadas se asoció con su translocación nuclear. Similarmente, observamos la translocación nuclear y el ensayo de genes informantes (OREX luciferasa) inducido por hipoxia en células HEK293, demostrando una fuerte activación de NFAT5 mediante hipoxia. Todos estos resultados indicaron que el bajo PO₂ no solo aumenta la cantidad de proteína NFAT5, sino también genera su actividad transcripcional.

Nuestros estudios en células HEK293 mostraron que a pesar de que se derribe la expresión de NFAT5 no afectó la muerte celular en condiciones isotónicas-normóxicas, la reducción en la expresión de NFAT5 causó un importante aumento de la apoptosis y necrosis después de 8 horas de hipoxia. Estos datos indicaron que NFAT5 tuvo un papel protector no identificado

previamente contra hipoxia. La hipoxia medular es el precio que los riñones de los mamíferos pagan por la eficiente concentración urinaria (Brezis M, 1993; Brezis M, 1995), y una nueva función de NFAT5 en la médula renal sería mejorar la tolerancia a hipertonicidad en un contexto hipóxico.

Regulación superior de NFAT5 en I/R experimental

Para probar si hipoxia es un regulador positivo de NFAT5 *in vivo*, usamos I/R experimental inducido por isquemia renal bilateral temporal por 30 min. Animales I/R experimentales tienen un significativo aumento de los niveles de creatinina en plasma y una reducción de la osmolalidad U/P, indicando falla renal aguda (ARF) (Figura 5). Nuestros resultados mostraron una fuerte regulación superior de la expresión de la proteína de NFAT5 tanto en la corteza y la médula de los riñones post-isquémicos (Figura 6). La inducción de NFAT5 fue posterior en comparación con la inducción de HIF1 α , pero persistió hasta 72 horas luego de la isquemia. La insuficiencia de la habilidad de la concentración urinaria (reducción de la osmolalidad U/P) en animales I/R experimentales se ha asociado con la reducción de los niveles de acuaporinas (tanto en el túbulo proximal y el ducto recolector de riñones post-isquémicos) (Kwon TH, 1999) y transportadores de sodio [Na,K-ATPase, cotransportador de Na-K-2Cl sensible a bumetanida de rata tipo 1 (BSC-1), intercambiador de Na/H tipo 3 (NHE3), y cotransportador de cloruro de sodio sensible a tiazida (TSC)] (Gong H, et al., 2004). Nuestros datos *in vivo* indican que hipoxia transitoria regula en forma superior la expresión de NFAT5 en condiciones isotónicas (corteza) y también en la médula de los riñones I/R.

La inducción de NFAT5 bajo condiciones hipóxicas *in vitro* e *in vivo* observada en el presente estudio sustenta la conclusión de que un bajo PO₂ es un regulador superior independiente de NFAT5 en células de riñón y que podría tener un rol protector.

De acuerdo con nuestros estudios en células cultivadas, se observó inmunoreactividad de NFAT5 en el núcleo de los túbulos de riñones post-isquémicos, sugiriendo que la regulación superior de la proteína NFAT5 se asocia con el aumento de la actividad transcripcional. Además, la regulación superior de NFAT5 en los riñones post-isquémicos se asoció con el aumento de la expresión de ARNm AR y de la proteína (Figura 6), indicando el aumento de la actividad de NFAT5.

Mecanismo de la activación de NFAT5 mediante hipoxia.

En el presente estudio, en células HEK293 la exposición a hipoxia causó un rápido aumento de HIF-1 α y NFAT5 (ARNm y proteína). Existe información interesante en la literatura que

sugiere una potencial interacción entre estos dos factores de transcripción: La inducción hipertónica de AQP5 y VEGF en células AT2 es transcripcionalmente regulada y mediada, al menos en parte, por HIF-1 α , sugiriendo un nuevo rol para HIF-1 α al modular las respuestas adaptativas celulares con respecto al estrés osmótico (Zhou B et al, 2007). Sin embargo, en células HEK293 no encontramos activación de HIF-1 α por un alto -NaCl. También hemos encontrado que NFAT5 puede responder a condiciones de hipoxia más extremas que HIF1, debido a las células HEK293 (4 horas de hipoxia), la inducción de NFAT5 es máxima en 1% O₂, no obstante la inducción de HIF1 es máxima en 2.5% O₂, a pesar de que es inducido al 1% O₂. Por otro lado, NFAT5 es inducido por la hipertoncicidad e hipoxia, pero HIF1 sólo es inducido por hipoxia, por lo tanto, NFAT5 tiene una respuesta más general a diferentes noxas. Asimismo, NFAT5 se expresa basalmente en todos los tejidos, y HIF1 no. Esta situación permite que NFAT5 reaccione más rápido que HIF1 a la noxa. Esta información preliminar sugiere que la activación de NFAT5 y HIF-1 α mediante hipoxia podría ser inducida mediante diferentes vías. Actualmente estamos estudiando esta hipótesis.

Nuestros resultados en riñones post-isquémicos demostraron que tanto ATM como PI3K (p110 α) fueron inducidos en riñones I/R (Figura 8). También encontramos que la activación de ATM y PI3-K en las células HEK293 expuso a hipoxia (2.5% oxígeno) (Figura 3). La activación de ATM también se ha descrito previamente durante la exposición a hipoxia (Hammond, EM, 2003; Bindra RS, 2007; Hammond EM, 2004). Recientes estudios en células cancerígenas demuestran mecanismos alternos para activar ATM bajo condiciones hipóxicas, incluyendo el aumento de especies de oxígeno radical, estrés oxidativo y fragmentaciones del ADN (Bhoumik A, 2007). En las células cancerígenas expuestas a hipoxia, ATM permanece difuso en todo el núcleo, como ATM fosforilado de conejas (Bencokova Z, 2009). Este patrón de localización es alusivo a lo que se observa en respuesta al alto nivel de sal (Bencokova Z, 2009), indicando que hipoxia y el estrés osmótico pueden compartir un mecanismo similar de activación ATM. De este modo, nuestros resultados y otros resultados demuestran la activación de ATM y PI3-K mediante hipoxia, sugiriendo su participación en la activación de NFAT5 mediante este estímulo.

NFAT5 pertenece al factor nuclear de células T activadas (NFAT). Las proteínas NFAT se definieron originalmente como reguladores dependientes de calcio/calcineurina de la transcripción de genes de citoquinas en linfocitos T. NFAT5 se puede inducir tanto en linfocitos T primarios inactivos y poblaciones de células Th1 y Th2 diferenciadas luego de la activación dependiente del receptor de mitógeno o antígeno (Trama J, 2002). Sin embargo, la inducción de

NFAT5 mediante un estímulo hiperosmótico en células cultivadas epiteliales no está bloqueada por la inhibición de calcineurina (Trama J, 2002). Se requieren de otros estudios para esclarecer si hipoxia activa los mecanismos dependientes de calcineurina para la inducción/activación de NFAT5 en células de riñón.

Estos resultados demuestran por primera vez que NFAT5 es inducido por hipoxia y tiene un potencial rol protector contra el daño isquémico.

Ejemplo 2: NFAT5 es inducido en el corazón, cerebro, piel, e hipoxia de linfocitos.

Animales.

Ratas macho adulto Sprague-Dawley (250 g, n=5 para cada uno) se encierran en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados ad libitum (a voluntad) y recibieron agua de manera controlada y se quedaron en el departamento de cuidados animales de la universidad. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con los estándares institucionales e internacionales para el cuidado de humanos y uso de animales de laboratorio (Animal Welfare Assurance Publication A5427-01, Office for Protection from Research Risks, Division of Animal Welfare, The National Institutes of Health).

Infarto de Miocardio.

Se indujo infarto de miocardio (grupo MI), como se describe previamente (Bhindi R, 2006). Las ratas se anestesiaron con inyección por vía intraperitoneal de cetamina y xilazina (50 y 10 mg/kg, respectivamente) y se ventilaron con aire ambiente usando un pequeño ventilador mecánico para animales (Columbus Instruments Model 121). Se realizó toracotomía izquierda en el cuarto espacio intercostal, se abrió el pericardio y se ligó la arteria coronaria descendente anterior izquierda con sutura de seda de 6.0 (Hospital & Diagnostics Supplies Ltd). Después de la oclusión coronaria, el tórax se saturó por planos y después de que despertaron y de la extubación, los animales recibieron tramadol (5 mg/kg peso) por vía oral como analgésico. Las ratas tratadas con placebo (Sh) operadas se sometieron al mismo procedimiento, pero se produjo sin ligadura de las arterias.

Eutanasia de animales y recolección de muestras

Para la eutanasia, los animales fueron anestesiados con cetamina y xilazina (50 mg/kg y 10 mg/kg) por vía intraperitoneal. Los corazones se detuvieron con una inyección intraventricular de solución de cloruro de potasio (10%), de acuerdo con los Lineamientos sobre Eutanasia de la Asociación de Medicina Veterinaria de los Estados Unidos (AVMA). Los corazones con infarto transmural del ventrículo izquierdo (VI) fueron incluidos en el estudio para evaluar sólo los

infartos (Schoemaker RG, 1990). El VI luego se diseccionó y se usó para la extracción el ARN. Se usó una región análoga de las muestras del grupo tratado con placebo.

PCR en Tiempo Real Cuantitativo (qRT-PCR)

ARN total se aisló usando TRIzol (GIBCO, Life Sciences) conforme con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó ADNe del ARN total (0.5 µg) usando un sistema de transcripción inversa (hexámeros aleatorios, Improm II Reverse Transcriptase System; Promega). Se realizó PCR en muestras de ADNe de 8 ng y 80 ng por 20:1 reacción en triplicado para cada experimento (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega). Se detectaron amplicones para la Detección de Fluorescencia en Tiempo Real (Rotor-Gene Q, Qiagen). Se usaron cebadores para qPCR que fueron:

para NFAT5:

NO. ID. SEC.: 3: 5'-TTCATCTCATTGCTCAGCG-3' y

NO. ID. SEC.: 4: 5'-GGGAGAAGATCATAGACAGATTC-3' y

para 18S (trabajos domésticos):

NO. ID. SEC.: 7: 5'-TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGA-3' y

NO. ID. SEC.: 8: 5'-TCTTGGCAAATGCTTTCGCTCTGG-3'.

El sistema de detección registra el número de ciclos de PCR (Ct) requeridos para producir una cantidad de producto igual a un valor de umbral, que es una constante. De los valores Ct, hemos calculado la abundancia de ARNm relativo en cada condición experimental, y los valores se normalizaron respecto a la abundancia relativa de cada transcripción en el tejido de animales tratados con placebo emparejados, como se describe (Irrarrazabal C, 2010).

Cultivos neuronales

Los cultivos primarios de neuronas corticales se obtuvieron de embriones de 18 días de ratas Sprague-Dawley como se describe (Banker y Goslin 1988).

Cultivos de linfocitos

Las células linfoides de sangre periférica se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque como lo describe el fabricante (Amersham, Biosciences). Los linfocitos purificados se cultivaron en alfa-MEM en 10% SFB por 24 horas. Después de este periodo de tiempo los linfocitos cultivados se expusieron a condiciones de hipoxia.

Fibroblasto humano primario de piel.

Los fibroblastos se obtuvieron de piel de donantes saludables. Los cultivos celulares se realizaron en DMEM-rojo fenol suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina-estreptomicina 0.1 mg/ml, fungizona 0.25 μ l/ml y glutamaz 2 mM. Los cultivos celulares se expusieron a una condición de hipoxia.

Hipoxia en cultivos celulares

Las células cultivadas se incubaron en condiciones isotónicas (300 mOsM) y normóxicas (21% O₂). Después de 24 horas de cultivo en un medio isotónico, las células se incubaron en condiciones hipóxicas (1% O₂) por 8 horas a 37°C. Las condiciones hipóxicas se obtuvieron reemplazando oxígeno con N₂, usando una incubadora Heracell 150i de CO₂ (Thermo Scientific).

Análisis Western Blot

La proteína total se midió usando el Kit de Prueba de Proteína BCA, (Pierce, Rockford, IL). El cultivo celular se homogenizó con un homogenizador Ultra-Turrax en una solución amortiguadora de lisis que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, inhibidor de proteasa (Complete Mini, Roche Applied Science, Indianapolis, IN), y cócteles inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktails 1 & 2, Sigma, St. Louis, MO). La célula se homogeniza, luego se centrifuga (15,000 X g, 10 min) y el sobrenadante se almacena (-70°C) para el análisis de SDS_PAGE y Western blot. Las proteínas se separaron en geles de Tris-Glicina de 7.5 ó 10% y se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA). El análisis de Western blot se realizó de acuerdo con las condiciones estándares (Irrarrazabal C, 2010). En resumen, después de bloquear el enlace no específico, las membranas se incubaron con anti-NFAT5 de conejo (NFAT5) (Affinity BioReagents, Golden, CO) o anti-tubulina de conejo (Cell Signalling), durante toda la noche a 4°C. Después de lavar con 0.1% de Tween-20 en PBS, las manchas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano apropiada (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron usando una técnica de quimioluminiscencia mejorada (PerkinElmer, Life Sciences, Boston, MA). Las manchas se exploraron y se realizó un análisis densitométrico usando el programa de dominio público NIH Image v1.61 (US National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

Análisis Estadístico

Los datos se expresan $\pm$ SEM. Los valores de diferentes grupos se evaluaron con la prueba t del Estudiante cuando se comparan dos grupos y Anova para múltiples comparaciones con una prueba post-hoc Fisher cuando se compara más de dos grupos. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

Efecto de hipoxia sobre NFAT5.

La expresión de NFAT5 se induce en el infarto de miocardio (MI).

Hemos medido la expresión de ARNm de NFAT5 en las muestras de tejido del ventrículo izquierdo de ratas tratadas con placebo y ratas infartadas después de una semana de MI mediante qRT-PCR. La Figura 9 mostró que MI aumentó significativamente los niveles de ARNm de NFAT5 en MI en comparación con el tejido tratado con placebo (10.96 ± 1.6 vs 0.9 ± 0.33 , $p < 0.05$), sugiriendo que el tejido infartado indujo la expresión genética de NFAT5.

La expresión de NFAT5 se induce por hipoxia en cultivos primarios de neuronas corticales.

Hemos analizado el efecto de hipoxia (1% of O_2) en la abundancia de la proteína NFAT5 en cultivos primarios de neuronas corticales del cerebro de rata mediante Western blot. Las neuronas corticales se cultivaron en condiciones normóxicas (21% de O_2) o hipóxicas (1% de O_2) por 8 horas. La condición de hipoxia indujo la abundancia de la proteína NFAT5 (Figura 10).

La expresión de NFAT5 se induce por hipoxia en linfocitos humanos

Hemos analizado el efecto de hipoxia (1% of O_2) en la abundancia de la proteína NFAT5 en cultivos primarios de linfocitos humanos mediante Western blot. Los linfocitos humanos se cultivaron en condiciones normóxicas (21% de O_2) o hipóxicas (1% de O_2) por 8 horas. La condición de hipoxia indujo la abundancia de la proteína NFAT5 (Figura 11).

La expresión de NFAT5 se induce por hipoxia en cultivos primarios de fibroblastos de piel humana.

Hemos estudiado el efecto de hipoxia (1% de O_2) en la abundancia de la proteína NFAT5 en cultivos primarios de fibroblastos de piel humana mediante Western blot. Los fibroblastos humanos se cultivaron en condiciones normóxicas (21% de O_2) o hipóxicas (1% de O_2) por 8 horas. La condición de hipoxia indujo la abundancia de la proteína NFAT5 (Figura 12).

Discusión.

La presente información muestra que NFAT5 se indujo en el ventrículo izquierdo expuesto a infarto de miocardio en rata sugiriendo que NFAT5 está implicado en la respuesta aguda a condición isquémica en el corazón y podría usarse como un biomarcador de esta severa condición cardíaca. Adicionalmente, NFAT5 también se indujo en un cultivo primario de neuronas corticales de cerebro de rata sugiriendo que este tipo de respuesta neuronal al daño de hipoxia induce la expresión de este factor y podría usarse como un biomarcador de la condición de hipoxia del cerebro. Finalmente, hemos probado el efecto de hipoxia en otras dos células humanas (linfocitos y fibroblastos) y hemos demostrado que hipoxia puede inducir la expresión de este factor sugiriendo que muchos tipos de células inducen la expresión del gen NFAT5 a una condición de tensión de bajo oxígeno. Estos resultados nos permiten proponer a NFAT5 como biomarcador de hipoxia en muchos tejidos.

REFERENCIAS

- Araujo M and Welch Wj. Oxidative stresses and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:72-77, 2006.
- Banker G. and Goslin K. Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336, 185–186. CrossRef, PubMed, CAS, Web of Science® Times Cited: 67, ADS, 1988.
- Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, Lecane PS, Giaccia AJ, Hammond EM. ATM activation and signalling under hypoxic conditions. *Mol Cell Biol.* 29: 526-37, 2009.
- Bhindi R, Witting PK, McMahon AC, Khachigian LM, Lowe HC. Rat models of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 96: 602-610, 2006.
- Bhoumik A, Lopez-Bergami P, Ronai Z. ATF2 on the double-activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res.* 20: 498-506, 2007.
- Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 26:249-60, 2007.
- Brezis M, Epstein FH. Cellular mechanisms of acute ischaemic injury in the kidney. *Annu Rev Med*; 44: 27–37, 1993.
- Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla-its implications for disease. *N Engl J Med.* 332: 647-55, 1995.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev.* 87: 1441-74, 2007.
- Cai Q, Ferraris JD, Burg MB. High NaCl increases NFAT5 mRNA and protein by stabilizing its mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Oct;289(4):F803-7, 2005.
- Cha JH, Woo SK, Han KH, Kim YH, Handler JS, Kim J, Kwon HM. Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding protein in rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 12: 2221-30, 2001.
- Chen Y, Schnetz MP, Irrarrazabal CE, Shen RF, Williams CK, Burg MB, Ferraris JD. Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor NFAT5: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292: F98192, 2007.
- Colla E, Lee SD, Sheen MR, Woo SK, Kwon HM. NFAT5 is inhibited by RNA helicase A via interaction involving the E'F loop. *Biochem J.* 393: 411-9, 2006.

- Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor NFAT5. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C248-53, 2001.
- Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB, García-Pérez A. Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:10742-6, 1994.
- Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB, García-Pérez A. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem.* 271:18318-21, 1996.
- Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, García-Pérez A. Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol.* 276:C667-73, 1999.
- Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y, Burg MB. Activity of the NFAT5 transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 739-44, 2002a.
- Ferraris JD, Persaud P, Williams CK, Chen Y, Burg MB. cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/osmotic response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:16800-5, 2002b.
- Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Li C, Ring T, Frokiaer J, Nielsen S. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQP and sodium transporters in rat kidney. *Kidney Int.* 66:683-95, 2004.
- Hammond EM, Dorie MJ, & Giaccia AJ. ATR/ ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry.* 278: 12207–12213, 2003.
- Hammond EM and Giaccia AJ. The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. *DNA Repair (Amst).* 3: 1117-22, 2004.
- Irrazabal CE, Liu JC, Burg MB, Ferraris JD. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor NFAT5/OREBP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 8809-14, 2004.
- Irrazabal CE, Burg MB, Ward SG, Ferraris JD. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates activation of ATM by high NaCl and by ionizing radiation: Role in osmoprotective transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 8882-7, 2006.

- Irarrazabal CE, Williams CK, Ely MA, Birrer MJ, Garcia-Perez A, Burg MB, Ferraris JD. Activator protein-1 contributes to high NaCl-induced increase in tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein transactivating activity. *J Biol Chem*. 283: 2554-63, 2008.
- Irarrazabal CE, Gallazzini M, Schnetz MP, Kunin M, Simons BL, Williams CK, Burg MB, Ferraris JD. Phospholipase C-gamma1 is involved in signaling the activation by high NaCl of the osmoprotective transcription factor NFAT5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:906-11, 2010.
- Ko BC, Turck CW, Lee KW, Yang Y, Chung SS. Purification, identification, and characterization of an osmotic response element binding protein. *BiochemBiophys Res Commun*. 270:52-61, 2000.
- Ko BC, Lam AK, Kapus A, Fan L, Chung SK, Chung SS. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/NFAT5). *J Biol Chem*. 277: 46085-92, 2002.
- Kwon TH, Frokiaer J, Fernández-Llama P, Knepper MA, Nielsen S. Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. *Am J Physiol*. 277: F413-27, 1999.
- Lam AK, Ko BC, Tam S, Morris R, Yang JY, Chung SK, Chung SS. Osmotic response element-binding protein (OREBP) is an essential regulator of the urine concentrating mechanism. *J Biol Chem*. 279: 48048-54, 2004.
- Lopez-Rodriguez C, Antos CL, Shelton JM, Richardson JA, Lin F, Novobrantseva TI, Bronson RT, Igarashi P, Rao A, Olson EN. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 2392-7, 2004.
- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 2538-42, 1999.
- Pettigrew LC, Kindy MS, Scheff S, Springer JE, Kryscio RJ, et al. Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. *J Neuroinflammation* 5:47, 2008.

- Priyadarshi A, Periyasamy S, Burke TJ, Britton SL, Malhotra D, Shapiro JJ. Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat. *Kidney Int.* 61:542-6, 2002.
- Rosas-Rodríguez JA, Valenzuela-Soto EM. Enzymes involved in osmolyte synthesis: how does oxidative stress affect osmoregulation in renal cells? *Life Sci.* 87: 515-20, 2010.
- Sadowski J. Estimation of changes in renal tissue electrolytes from measurements of electrical admittance: application in the rat. *Acta Physiol Pol.* 36: 339-44, 1985.
- Schoemaker RG, Urquhart J, Debets JJM, Struyker Boudier HAJ, Smits JFM. Acute hemodynamic effects of coronary artery ligation in conscious rats. *Basic Res Cardiol* 85: 9-20, 1990.
- Sykes E, Cosgrove JF. Acute renal failure and the critically ill surgical patient. *Ann R CollSurgEngl*; 89: 22-29, 2007.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redifinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 28: 2525-2538, 2007.
- Tian D-S, Dong Q, Pan D-J, He Y, Yu Z-Y, et al. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res.* 1154:206–214, 2007.
- Trama J, Go WY, Ho SN. The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J Immunol.* 169:5477-88, 2002.
- Villanueva S, Céspedes C, Vio CP. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290:R861-70, 2006.
- Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity.1: *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F1006-12, 2000a.
- Woo SK, Nahm O, Kwon HM. How salt regulates genes: function of a Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Biophys Res Commun.* 278: 269-71, 2000b.

- Yang Y, Jalal FY, Thompson JF, Walker EJ, Candelario-Jalil E, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mediates the death of immature oligodendrocytes via TNF- α /TACE in focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation*. 8:108, 2011.
- Zhang Z, Ferraris JD, Irarrazabal CE, Dmitrieva NI, Park JH, Burg MB. Ataxia telangiectasia-mutated, a DNA damage-inducible kinase, contributes to high NaCl-induced nuclear localization of transcription factor NFAT5/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289: F506-11, 2005.
- 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 NFAT5/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289: F377-85, 2005.
- Zhou X, Ferraris JD, Burg MB. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor NFAT5. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: F1169-76, 2006.
- Zhou B, Ann DK, Li X, Kim KJ, Lin H, Minoo P, Crandall ED, Borok Z. Hypertonic induction of aquaporin-5: novel role of hypoxia-inducible factor-1 α . 1: *Am J Physiol Cell Physiol*. 292: C1280-90, 2007.

RESUMEN

Método para el monitoreo, diagnóstico y pronóstico de trastornos relacionados a la hipoxia en un paciente usando NFAT5, en donde el método comprende a) proporcionar una muestra del cuerpo; b) concentrar los factores de transcripción presentes en la muestra; y c) detectar y/o cuantificar NFAT5 en la muestra tratada.

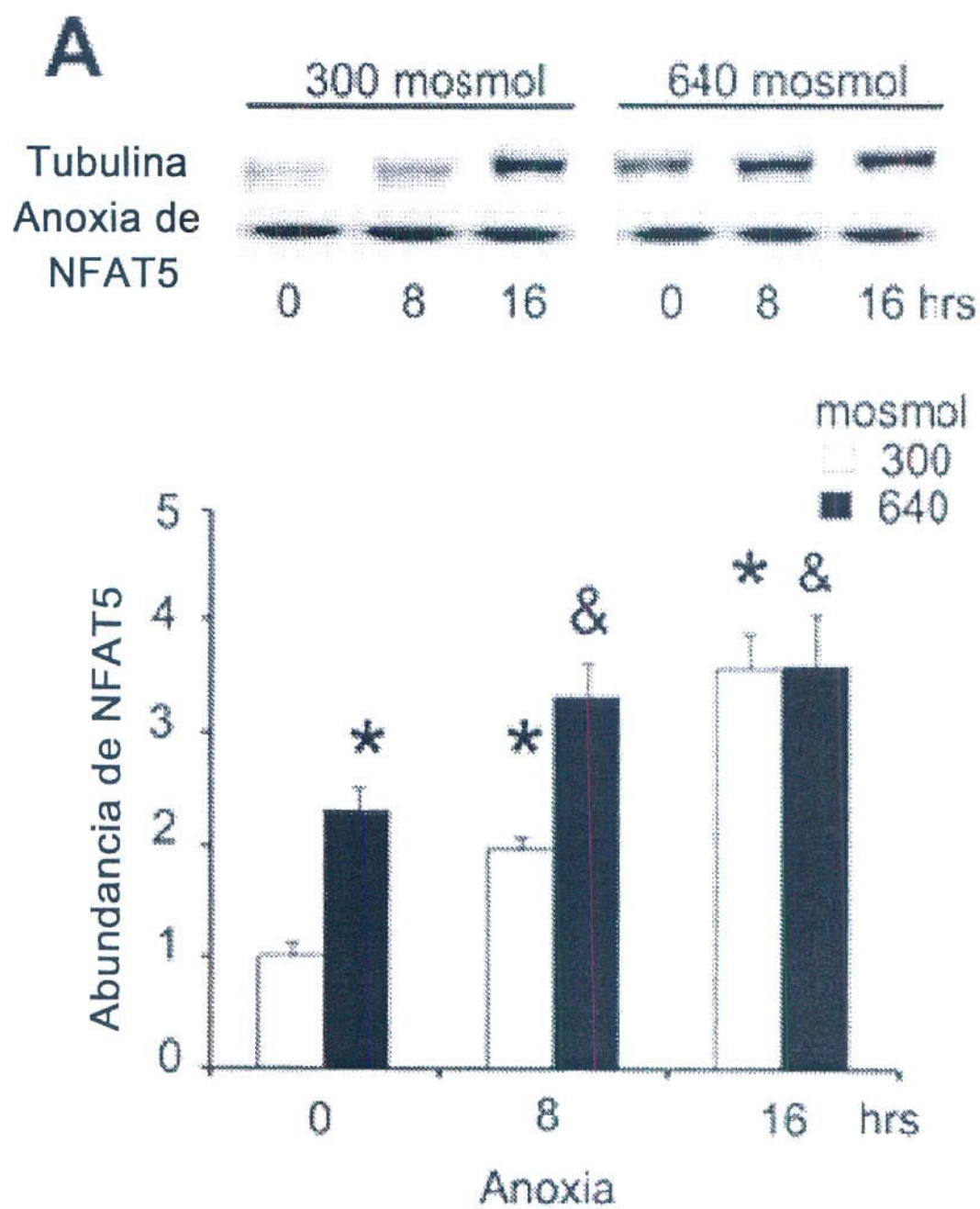


Figura 1A

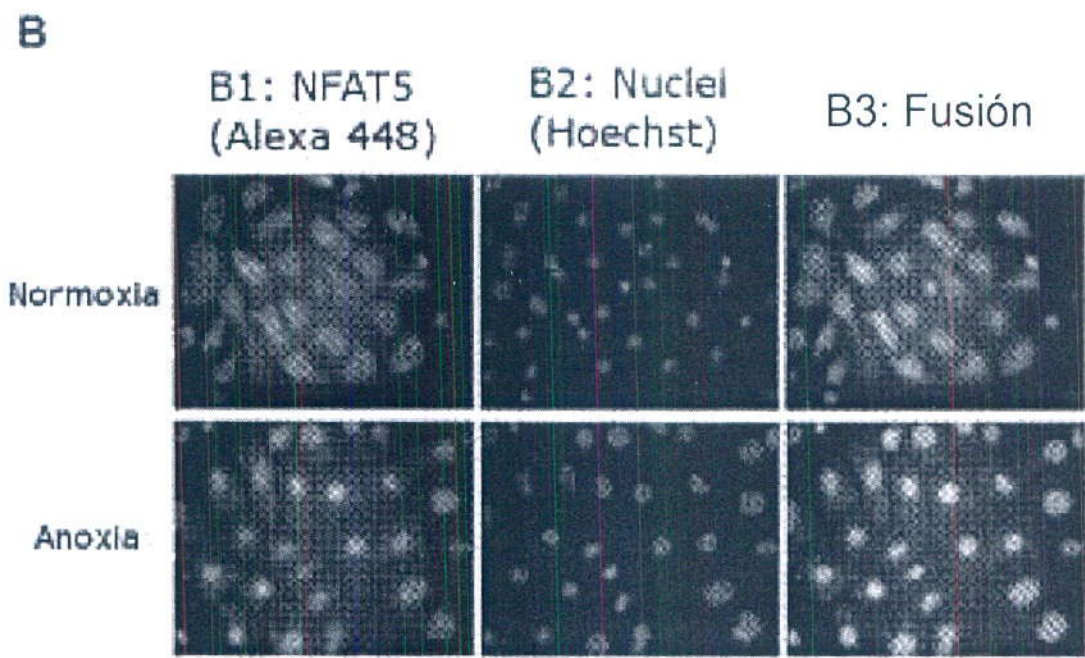


Figura 1B

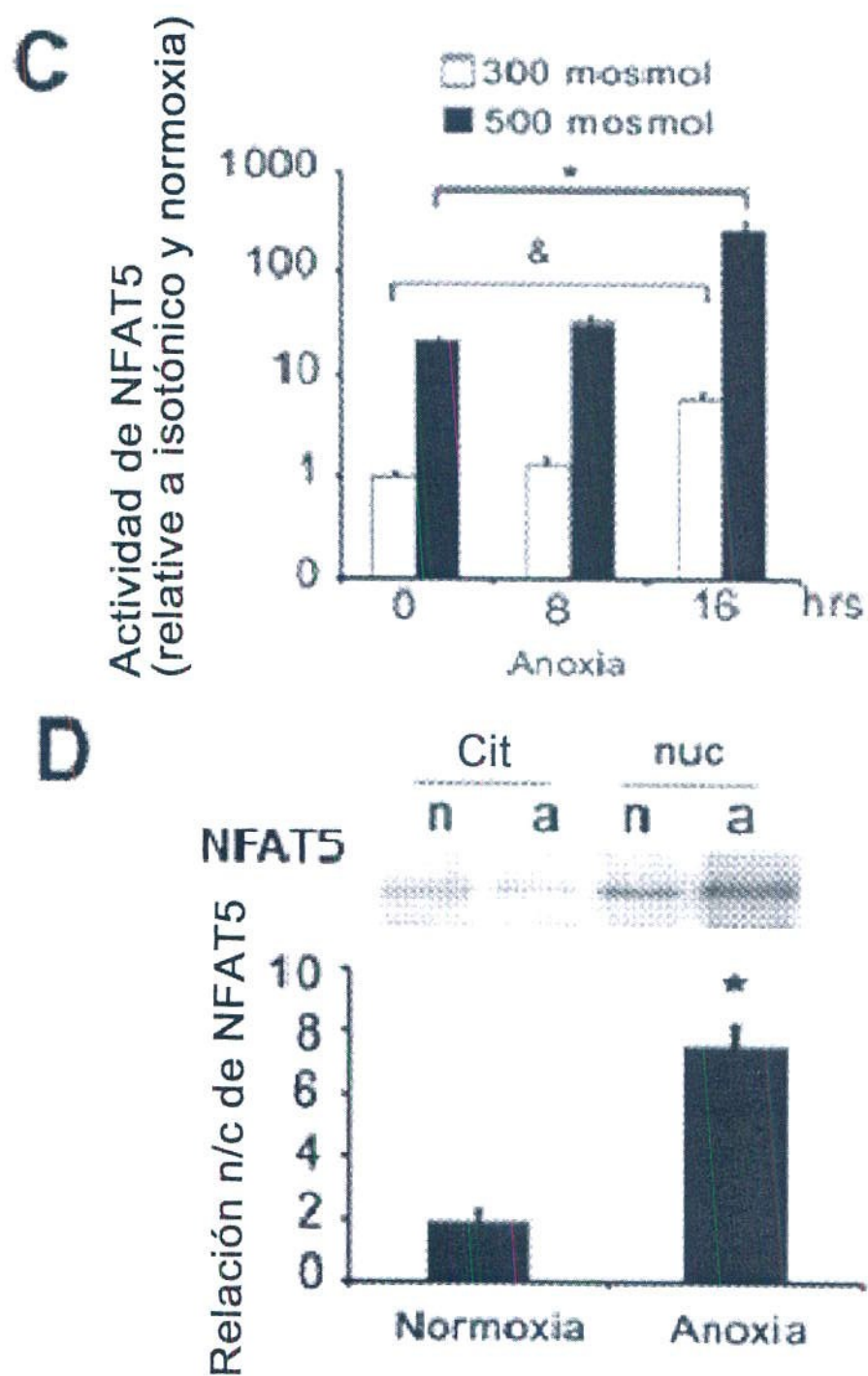


Figura 1C-D

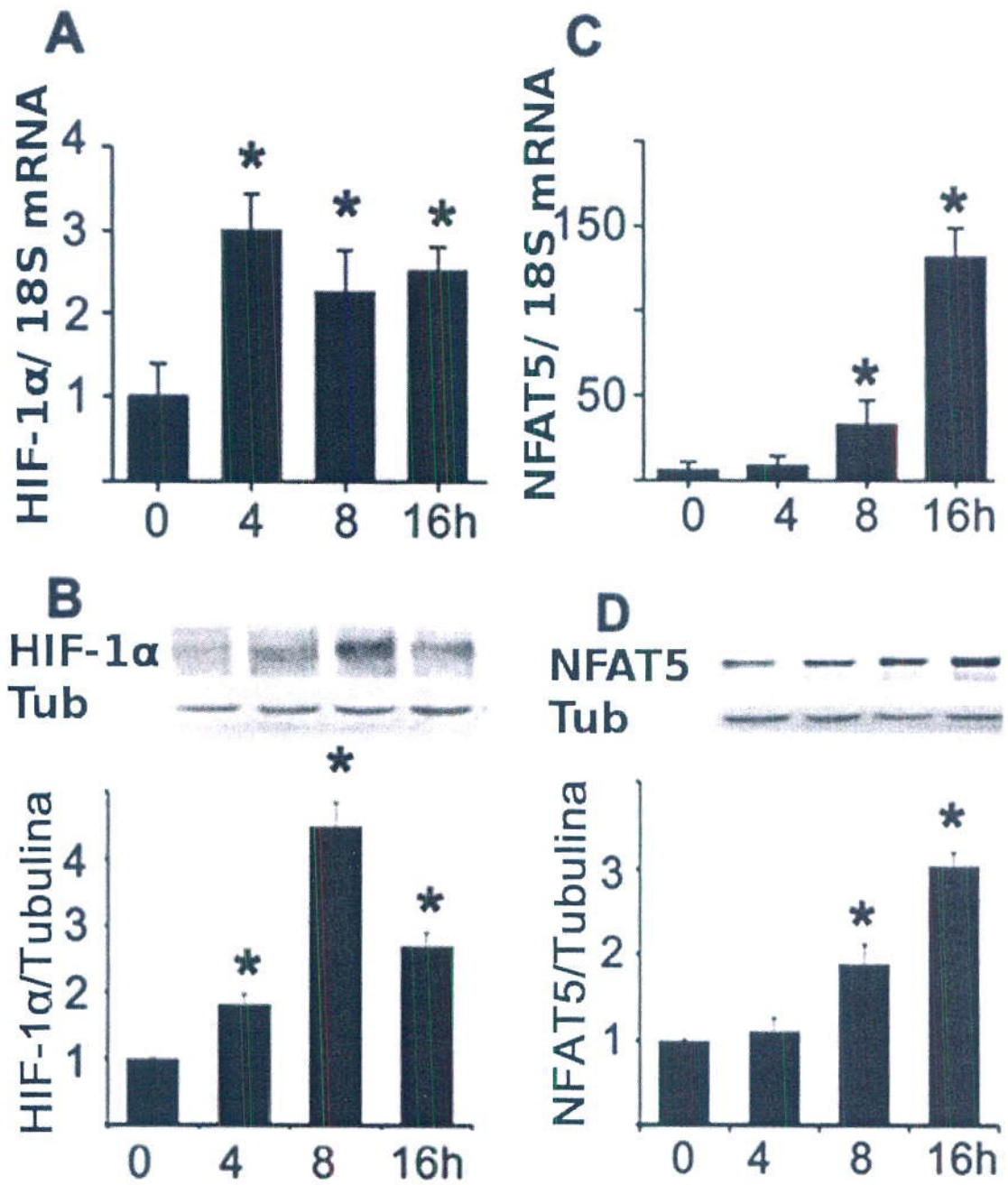


Figura 2

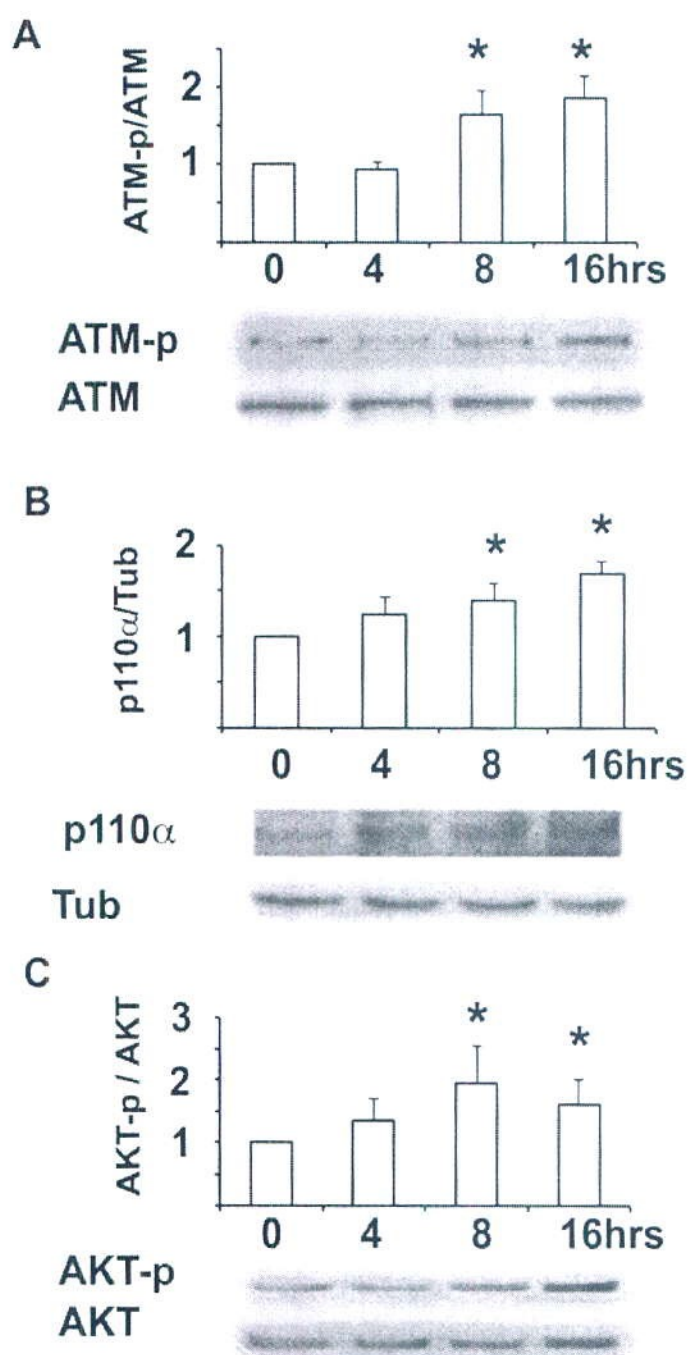


Figura 3

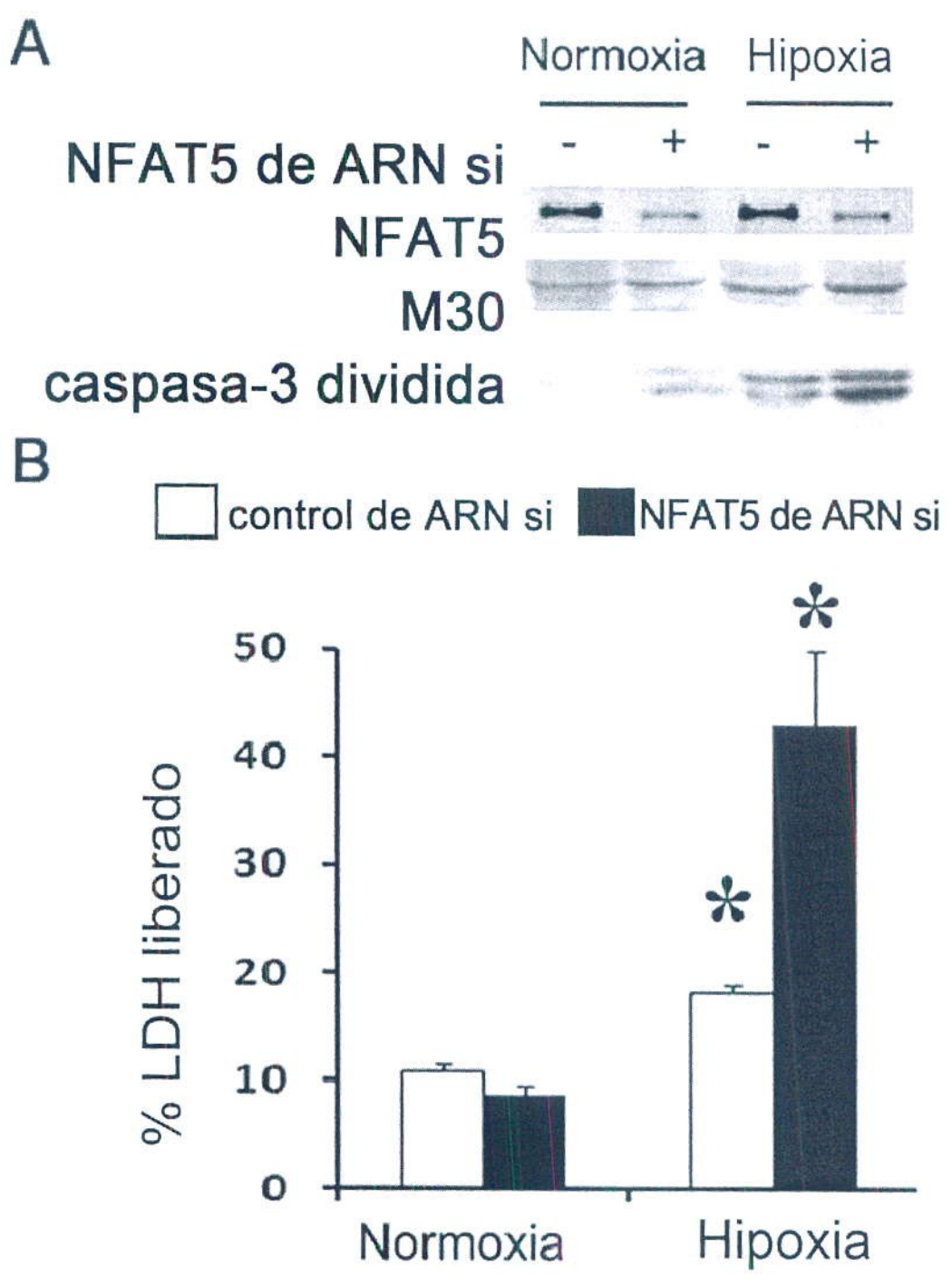


Figura 4

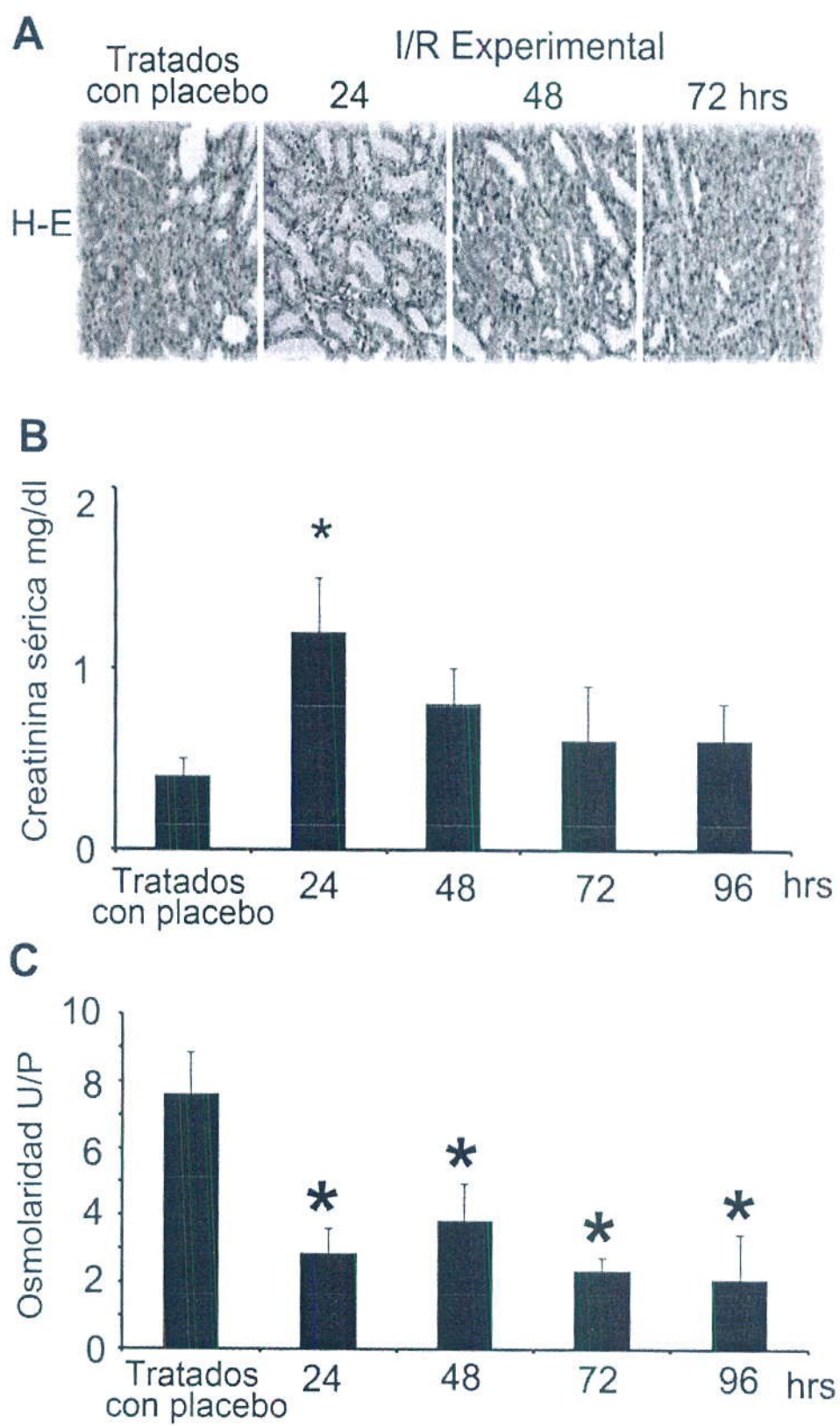


Figura 5

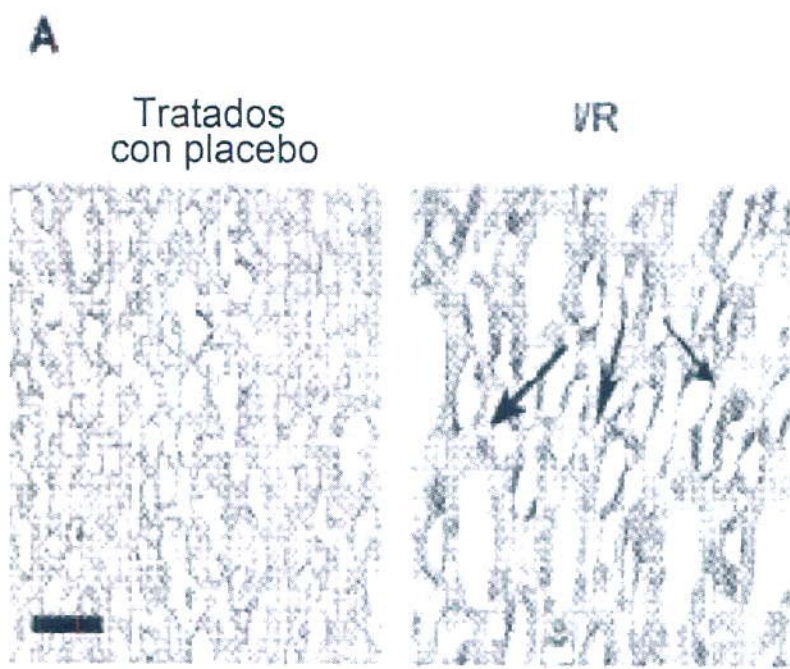


Figura 6 A

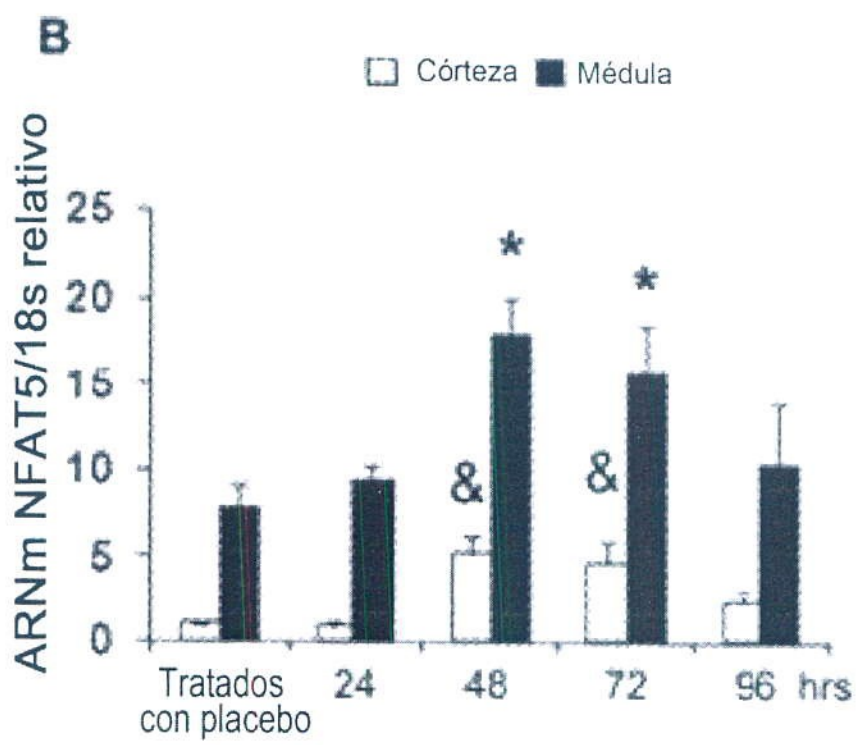


Figura 6 A-B

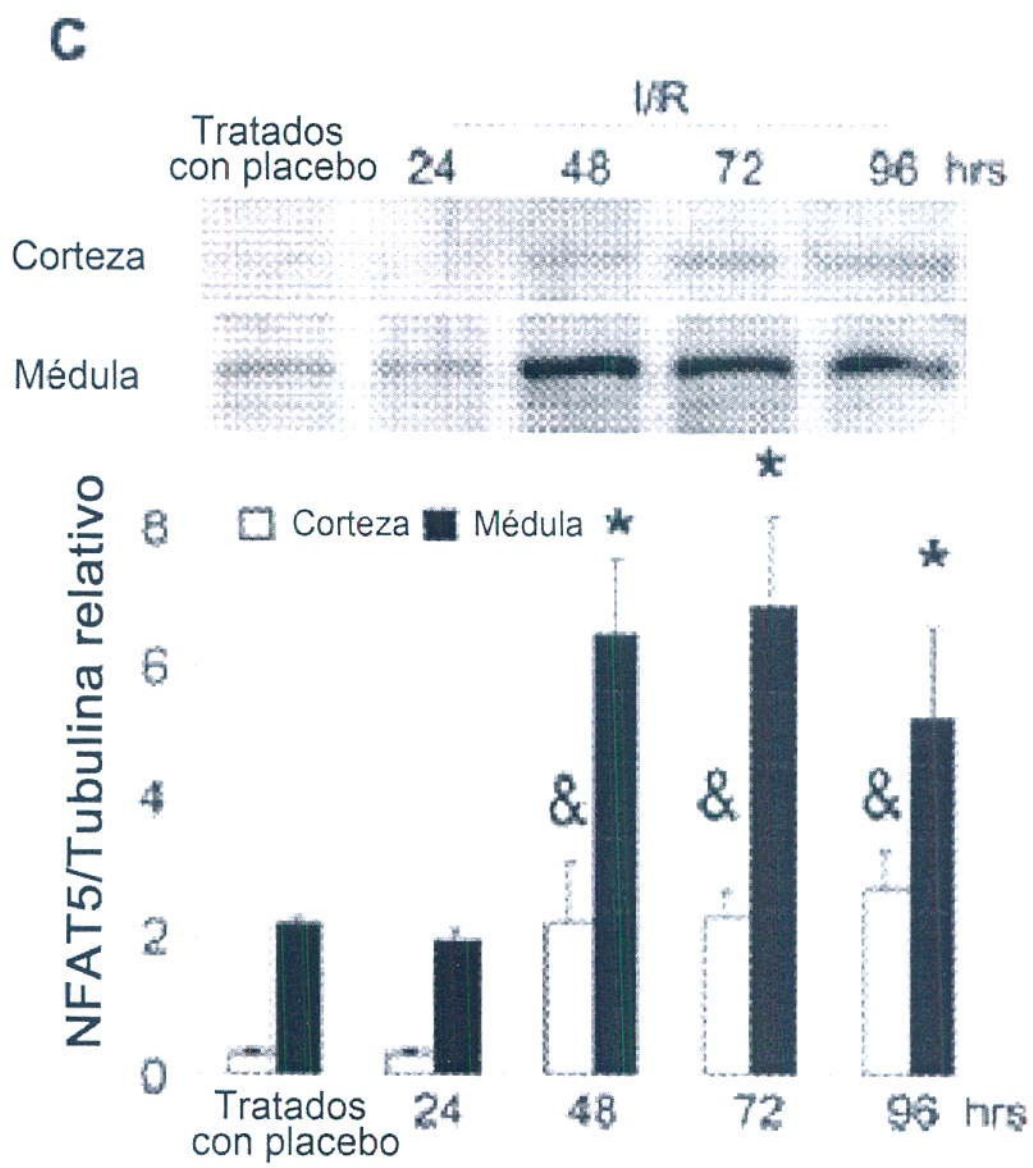


Figura 6 C

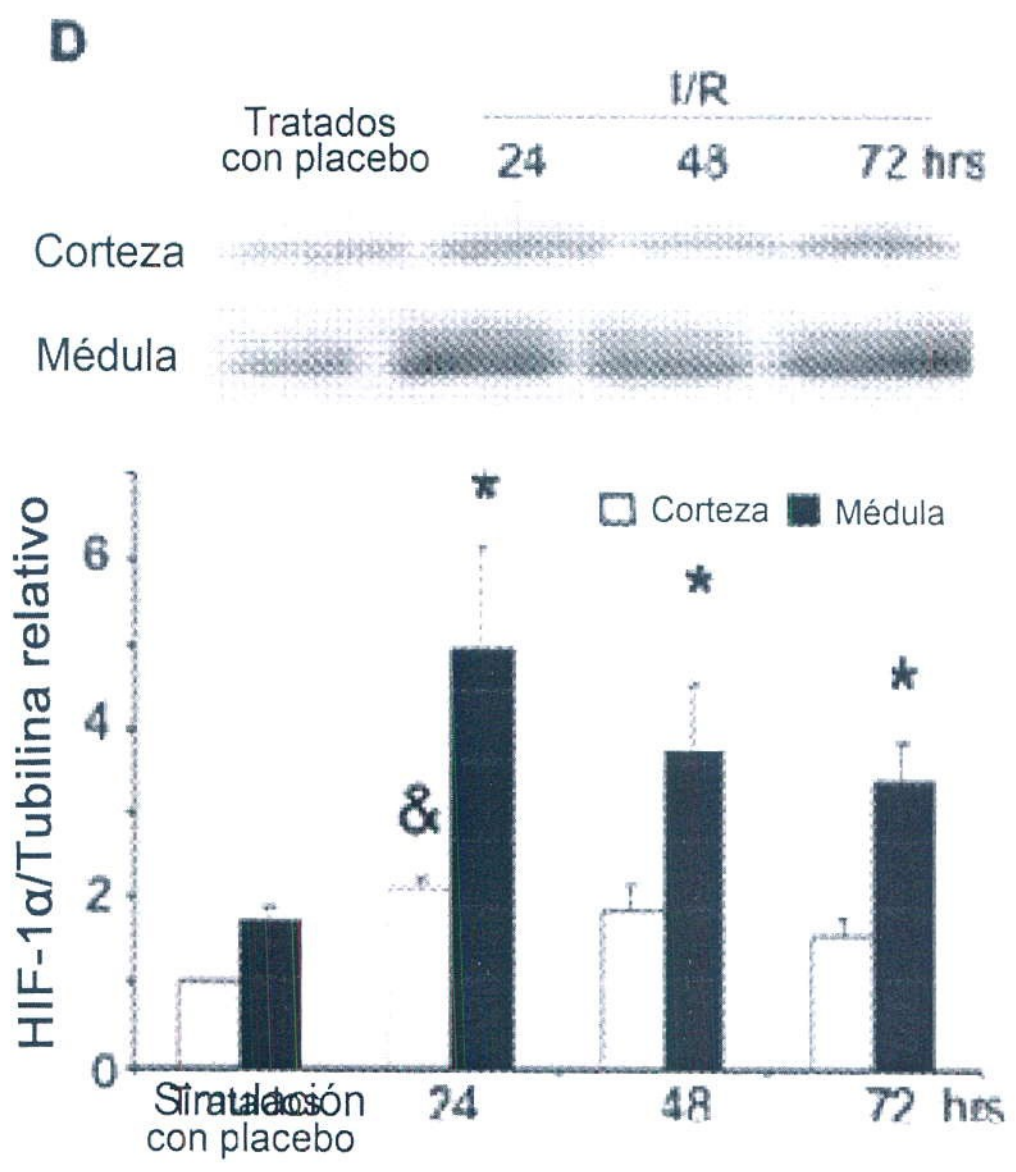


Figura 6 D

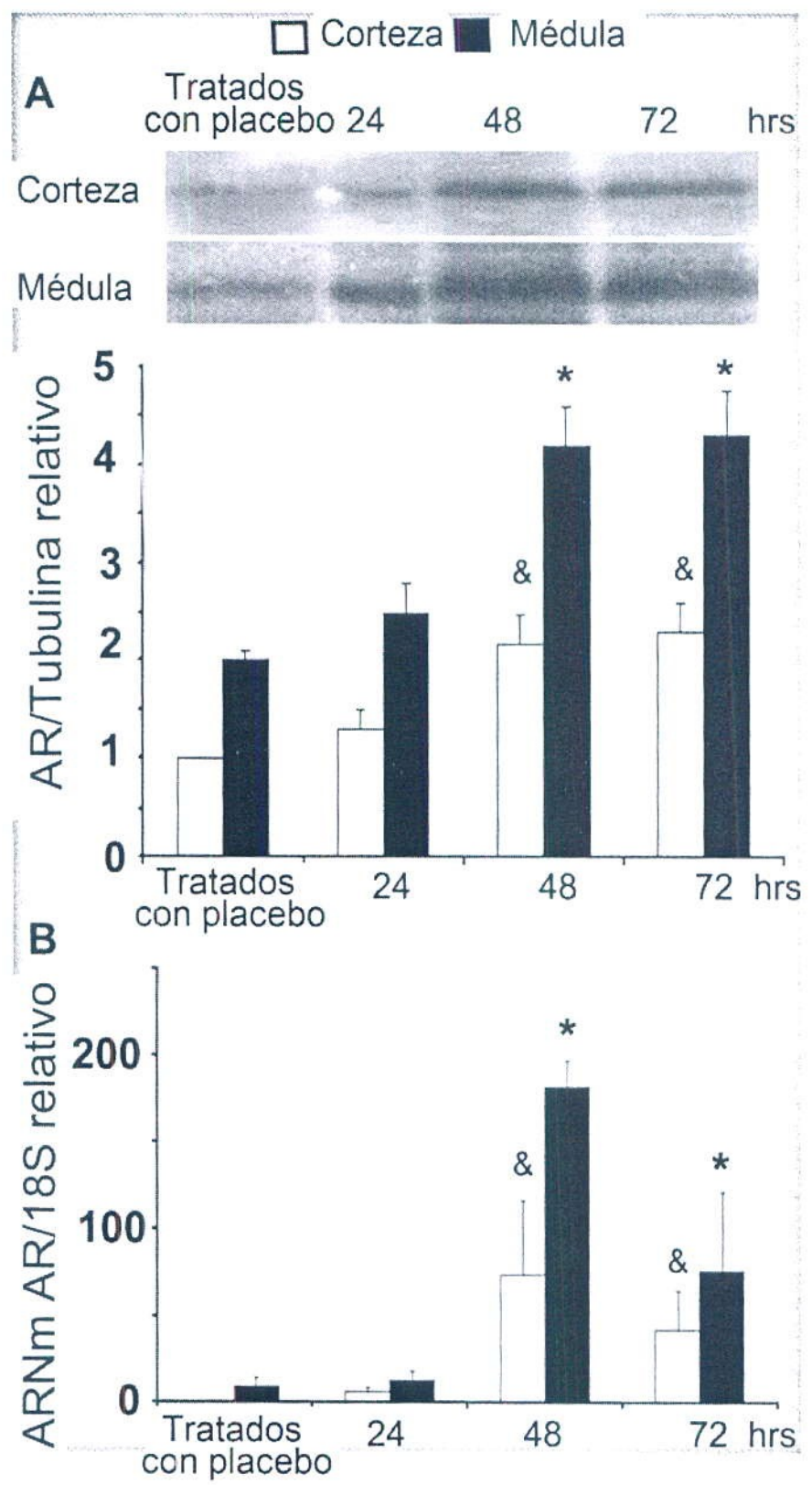


Figura 7

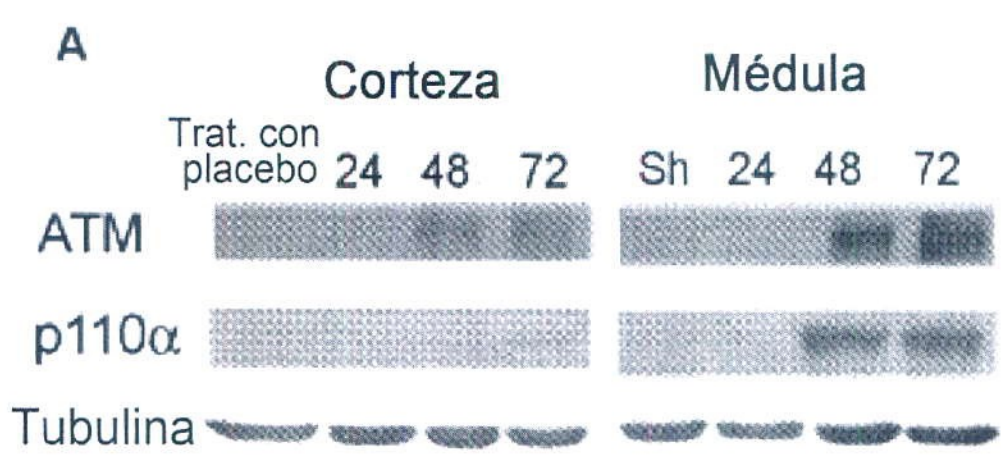


Figura 8 A

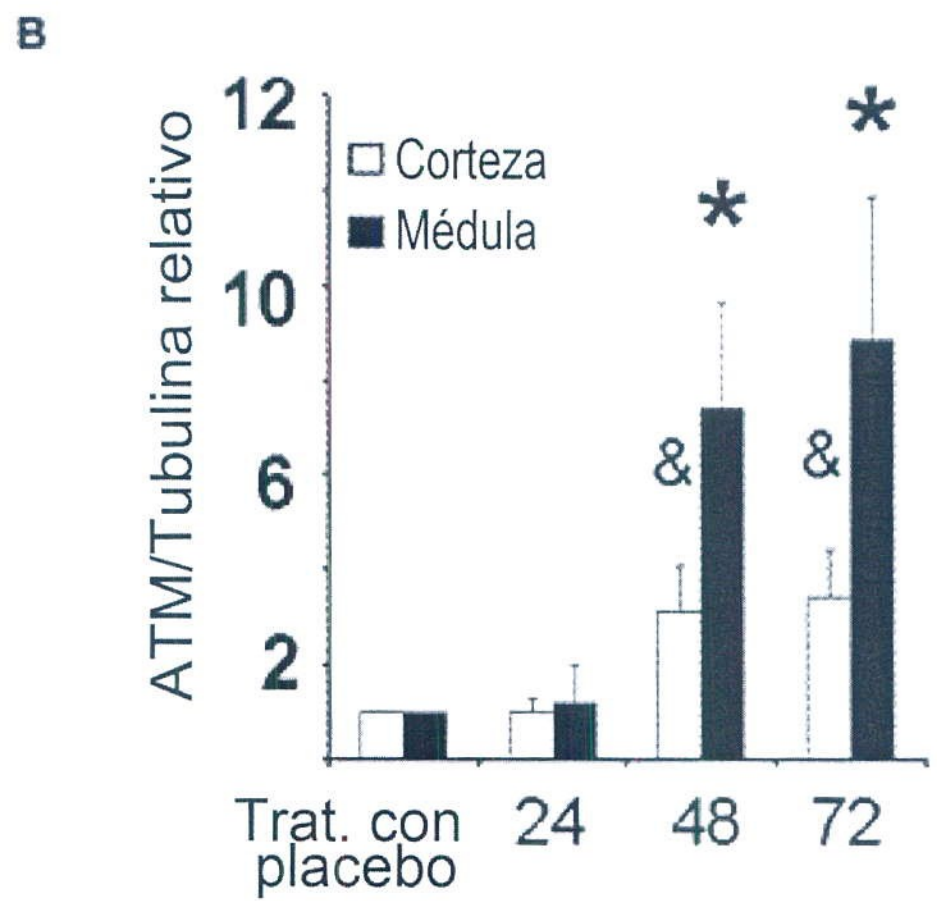


Figura 8 A-B

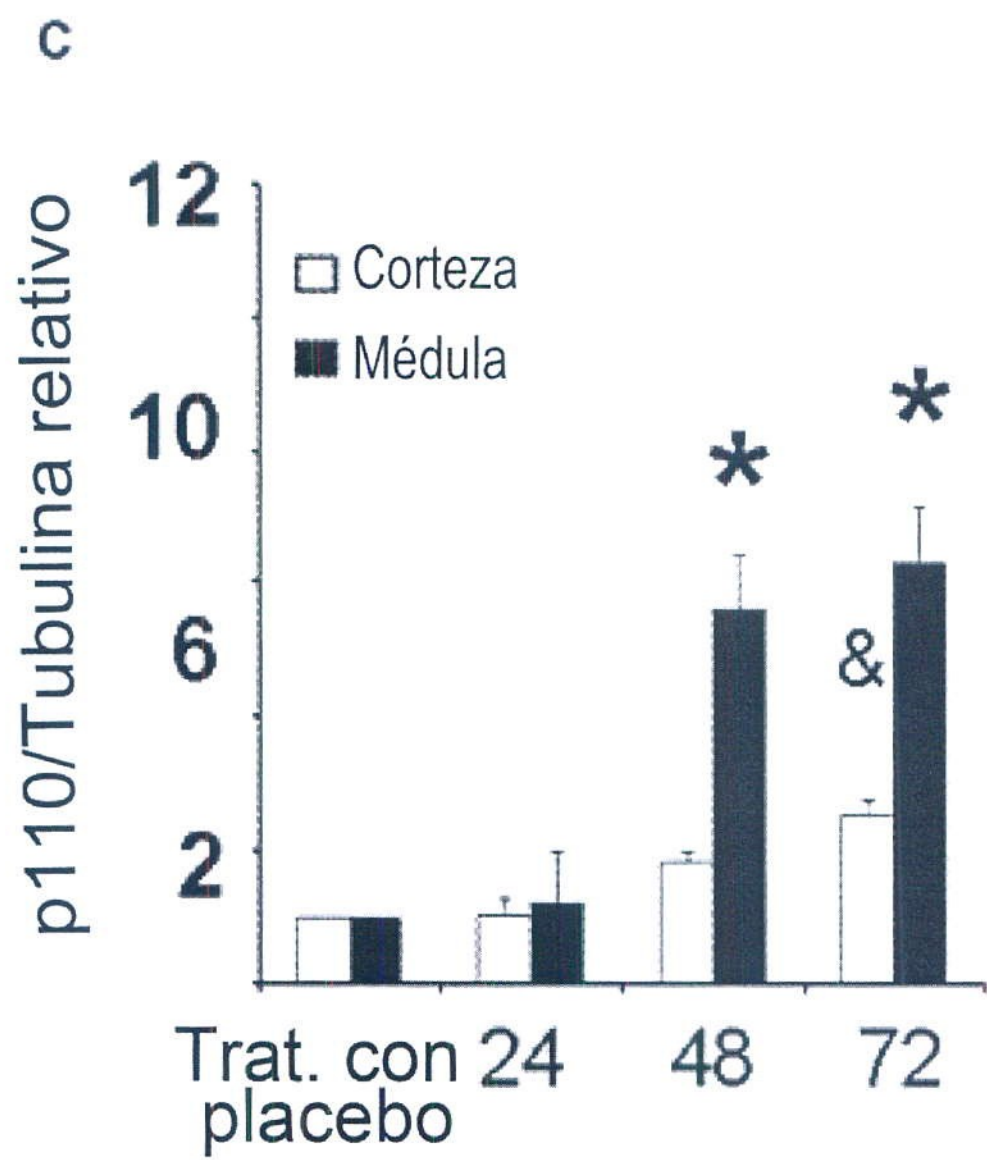


Figura 8

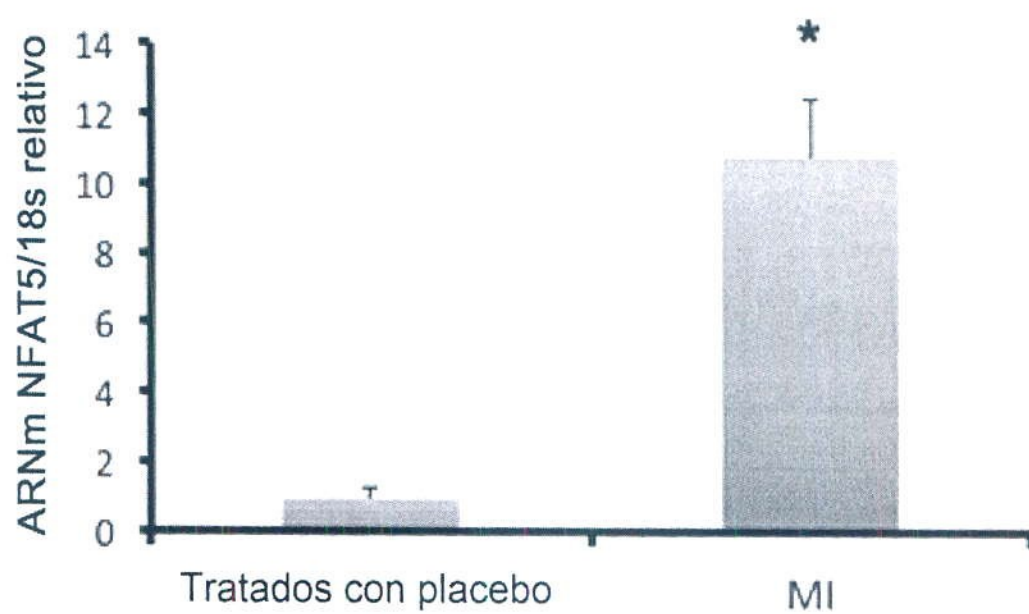


Figura 9

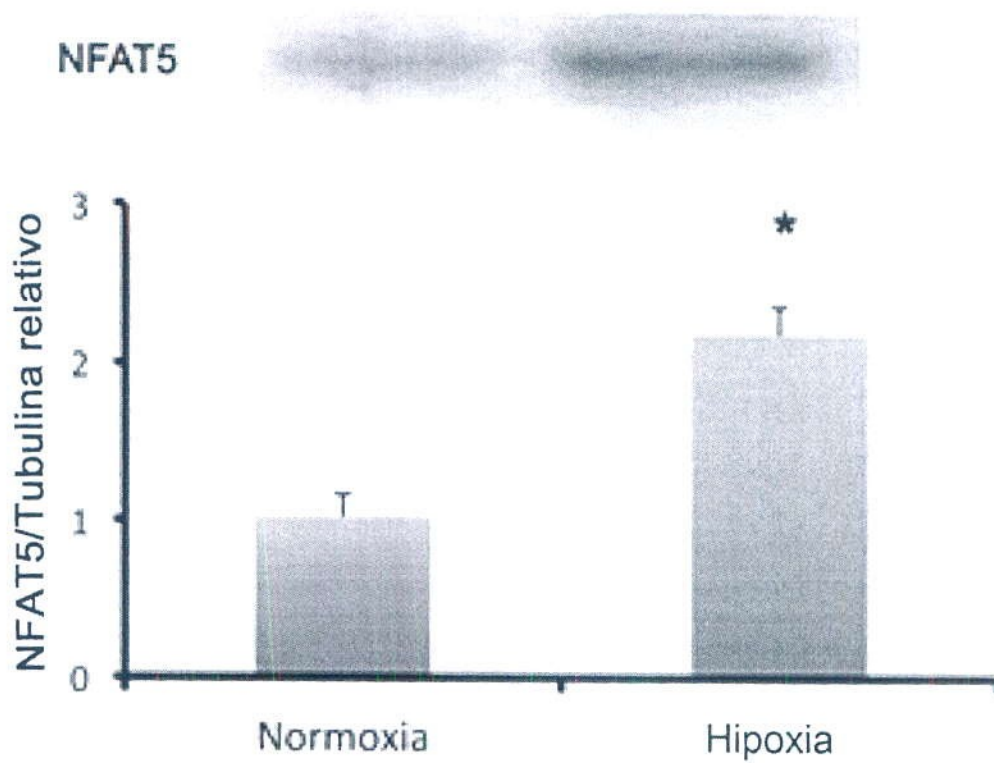


Figura 10

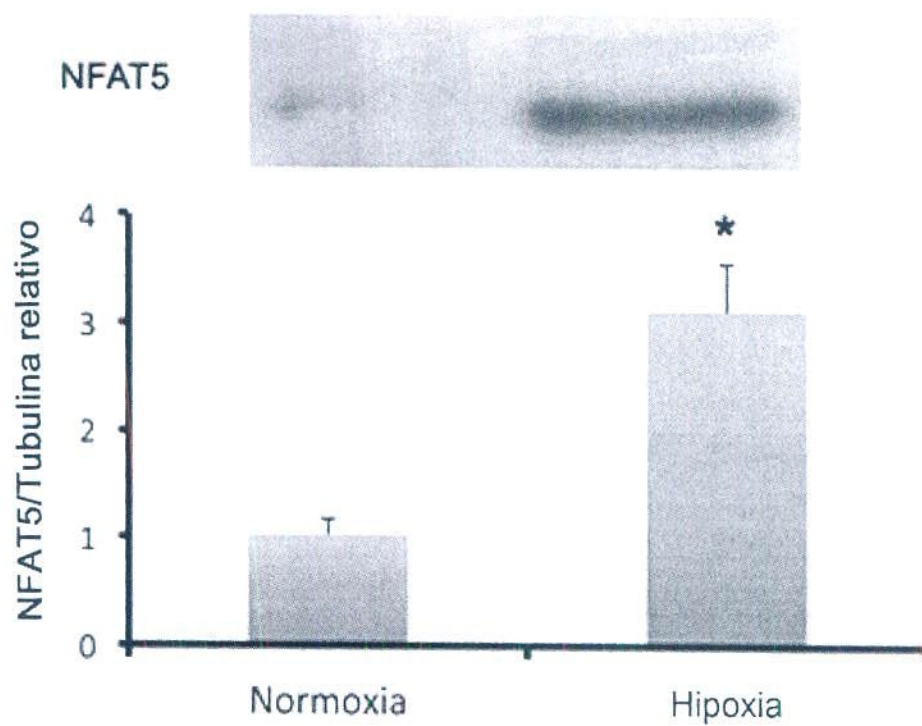


Figura 11

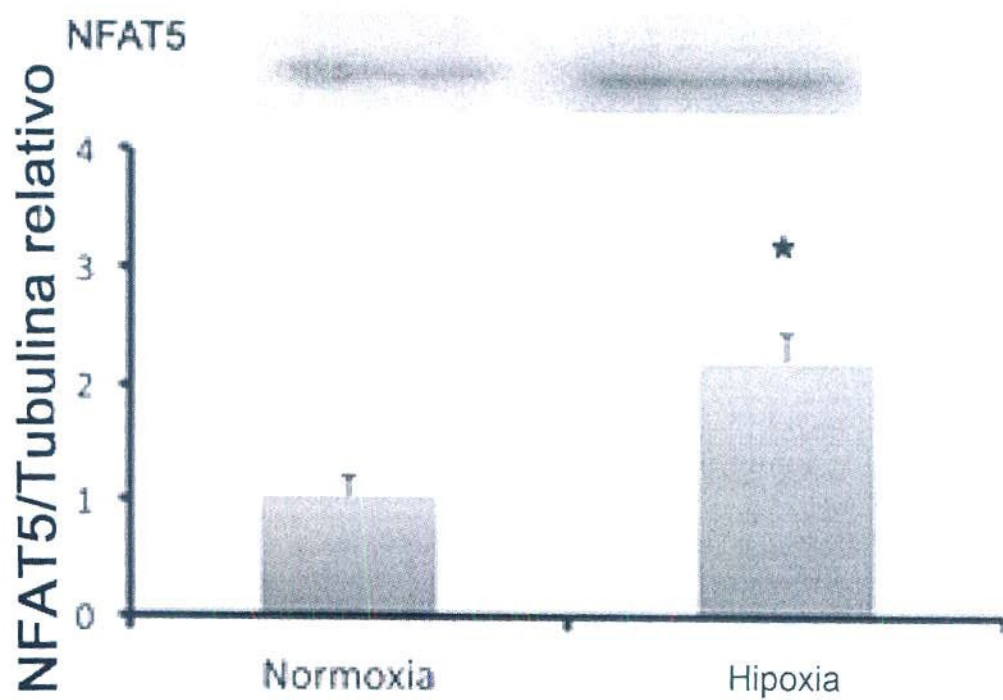


Figura 12

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de los Andes
Irrázabal Munoz, Carlos Ernesto

<120> MÉTODO PARA EL MONITOREO, DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE HIPOXIA

<130> PCT Hipoxia

<150> US61542446

<151> 2011-10-03

<160> 8

<170> Versión de la Patente 3.5

<210> NO. ID. SEC.: 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 1

attcgctccac cacagcttca gact

24

<210> NO. ID. SEC.: 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 2

agcaatgagg acatggccac tcta 24

<210> NO. ID. SEC.: 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 3

ttcatctcat tgetcageg 19

<210> NO. ID. SEC.: 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 4

gggagaagat catagacaga ttc 23

<210> NO. ID. SEC.: 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 5
acctctggac ttgccttc 19

<210> NO. ID. SEC.: 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 6
ttttcttgt cgttcgcgc 19

<210> NO. ID. SEC.: 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 7
ttagagtgtt caaagcaggc ccga 24

<210> NO. ID. SEC.: 8

<211> 24

<212> ADN

<213> Humano

<400> NO. ID. SEC.: 8

tcttggcaaa tgettgcgt ctgg 24