

Tesis doctoral

---

# **Influencia de la insulina sobre el enzima convertidor de angiotensina 2 (ECA2) en la nefropatia diabética experimental**

---

Eva Marquez Mosquera

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **A. NEFROPATÍA DIABÉTICA**

La nefropatía diabética (ND) es una complicación microvascular de la diabetes mellitus (DM), tipo 1 y tipo 2. Clásicamente se define como un incremento de la excreción proteica en orina. La ND es la principal causa de Enfermedad Renal Crónica (ERC) Terminal en España, el 25 % de la ERC Terminal incidente es secundaria a ND (1), con todas las implicaciones socio-económicas y personales que ello conlleva.

#### **A.1. Expresión Clínica**

En los estadios más precoces hay un aumento en la excreción urinaria de albúmina (microalbuminuria), definida como albumina/creatinina en orina entre 30 y 299 mg/gr. Cuando la patología está más avanzada se detecta macroalbuminuria o proteinuria definida como albúmina/creatinina  $\geq$  300mg/gr, lo que se considera ND establecida. En muchos casos se observa un descenso del filtrado glomerular (FG) en paralelo a la aparición de proteinuria, aunque existe un porcentaje de pacientes con ND secundaria a DM tipos 1 y 2 que presentan disminución del FG sin albuminuria o proteinuria (2). Independientemente del papel pronóstico de la proteinuria, la presencia de microalbuminuria es un factor de riesgo de patología y mortalidad cardiovascular, ya que refleja un estado global de disfunción endotelial.

En varios estudios se ha demostrado que puede existir una regresión en la microalbuminuria de hasta un 50-60% de los pacientes. Esta regresión está relacionada con un correcto control de la presión arterial (PA), de la glucemia y el grado de albuminuria basal (3, 4). En la misma línea, las alteraciones morfológicas típicas de la ND (engrosamiento de la membrana basal glomerular [MBG], expansión mesangial) se ha observado que disminuyen en pacientes con DM tipo 1 que recibieron un trasplante pancreático después de 10 años (5).

Todos estos datos subrayan la importancia de controlar desde el inicio los niveles de microalbuminuria. Un abordaje terapéutico agresivo y un correcto y mantenido control metabólico pueden hacer regresar las lesiones secundarias a la DM.

## **A.2. Fisiopatología**

La ND ocurre como resultado de la interacción de un componente genético modulado por cambios hemodinámicos y alteraciones metabólicas relacionadas con la hiperglucemia, similares entre los pacientes con DM tipo 1 y tipo 2 (6). *Figura 1.*

### **- Factores Genéticos**

Sólo un 40-50% de los pacientes con DM tipo 1 y 2 desarrollan ND incluso con el mismo grado de control glucémico, con lo que parece claro que los factores genéticos deben tener una influencia directa sobre el desarrollo de la ND (7). La agrupación familiar también orienta hacia la existencia de este componente genético (8-10). Actualmente se llevan a cabo estudios de susceptibilidad genética al desarrollo de ND, que resultan complicados ante la evidencia de que no se observa una herencia mendeliana en esta patología sino la implicación de múltiples genes y sus polimorfismos (6).

### **- Factores Metabólicos: Efecto de la hiperglucemia**

- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA): Las alteraciones hemodinámicas y metabólicas presentes en la ND conducen a una elevación de su principal efecto, la Angiotensina (Ang)-II. La Ang-II incrementa los niveles de TGF- $\beta$ , estimula el estrés oxidativo y su consecuente lesión endotelial, aumenta la PA y favorece la proliferación e hipertrofia celular a nivel renal (8, 11). Además su presencia aumenta la reabsorción tubular de proteínas, favoreciendo la inflamación y en consecuencia la fibrosis intersticial (8).

- Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ): Elemento central en la fisiopatología de la ND, su síntesis y liberación a la circulación se ve incrementada en pacientes diabéticos (12) tanto por factores metabólicos como hemodinámicos. Su aumento produce expansión de la matriz extracelular aumentando la síntesis de proteínas como fibronectina, Colágeno (Col) I, III y IV e inhibiendo las metaloproteinasas que la degradan (2, 8, 13).

- Productos de Glicosilación Avanzada (AGEs) y sus Receptores (RAGEs): Está demostrado que los RAGEs están sobre-expresados en situación de diabetes y que la unión de los AGEs favorece la síntesis de citoquinas proinflamatorias y actúan como factores de adhesión endotelial favoreciendo el reclutamiento de leucocitos (8). Favorecen la alteración de las proteínas de la matriz extracelular (14) y de la MBG (2).

- Estrés Oxidativo: En un estado diabético existe un incremento de la glucosa intracelular que favorece el estrés oxidativo por superproducción de anión superóxido en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Causan la activación anormal de la protein kinasa C (PKC) favoreciendo la expansión de la matriz extracelular por la síntesis de fibronectina y Col IV y facilitando la lesión de la MBG por los productos de glicosilación avanzada (2, 8, 13).

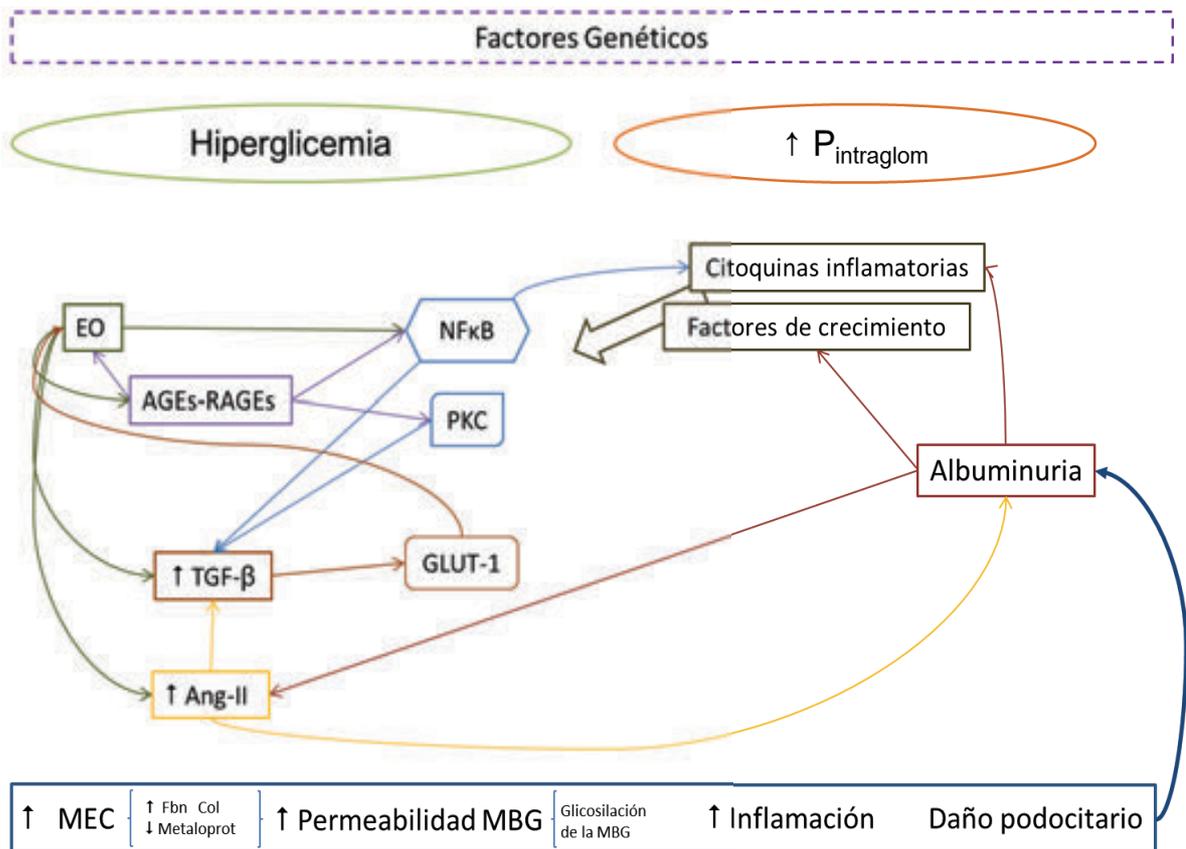


Figura 1: Esquema de los elementos implicados en la fisiopatología de la ND y sus interacciones. Abreviaturas: EO, Estrés Oxidativo; MEC, Matriz Extracelular; Fbn: Fibronectina.

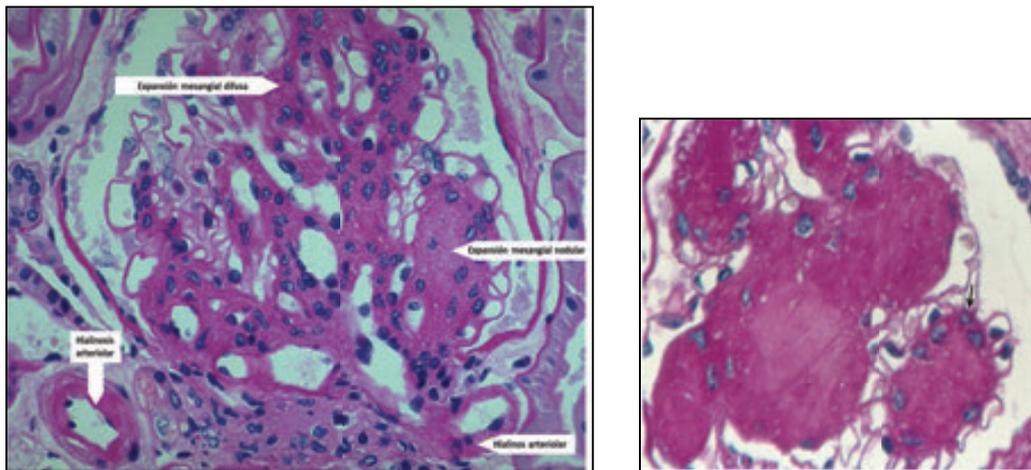
## - Factores Hemodinámicos:

En la ND existe un defecto en la auto-regulación del flujo glomerular que conlleva un aumento de la presión capilar glomerular y en consecuencia de la presión transcápsular. Estos cambios se traducen en la aparición de hiperfiltración glomerular que conlleva pérdida de albúmina con activación local de citoquinas y factores de crecimiento. Se observa incremento de la matriz mesangial, aumento del grosor de la MBG, daño podocitario y progresiva glomeruloesclerosis (2, 8).

### A.3. Hallazgos histopatológicos más característicos

#### - Glomérulo

A los 1,5-2,5 años el debut de la DM se puede detectar ya un engrosamiento de la MBG. La expansión mesangial a expensas de la matriz se detecta a partir de los 5-7 años del diagnóstico, observándose también hipertrofia de las células mesangiales (13, 15). Tras 10-15 años, la expansión mesangial se convierte en difusa, asociándose a zonas nodulares rodeadas de núcleos celulares que acaban produciendo compresión de los capilares glomerulares, son los denominados nódulos de Kimmelstiel-Wilson (15, 16). *Figura 2.*



*Figura 2: Izquierda: Lesiones características de la ND. Derecha: Nódulos de Kimmelstiel-Wilson con la típica disposición periférica de núcleos celulares. Adaptado de Fioretto P. Semin Nephrol. 2007 March; 27(2): 195-207.*

## **- Compartimento tubular y vascular**

Se detecta un engrosamiento de su membrana basal a los 1,5-2,5 años del debut de la DM. Posteriormente atrofia tubular y separación del túbulo del glomérulo en las zonas de contacto de ambos (15). Pocos años tras el diagnóstico se comienza a detectar hialinosis arteriolar consistente en el reemplazamiento de la capa muscular lisa por una amalgama de proteínas, fundamentalmente inmunoglobulinas, complemento, fibrinógeno y albúmina (15). *Figura 2.*

## **B. PODOCITOPATÍA EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA**

### **B.1. Introducción**

Las células epiteliales viscerales del glomérulo, también denominadas podocitos, son células altamente especializadas, que pierden su capacidad de división tras la etapa embrionaria (17). Están implicadas en el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular junto con las células endoteliales fenestradas, contactando con la lámina rara externa de la MBG y con su superficie libre en el espacio de Bowman. Sus principales funciones consisten en ofrecer estabilidad al glomérulo, contrarrestando las distensiones de la MBG y oponiéndose a la alta presión hidrostática necesaria para la filtración, y ofrecer una amplia superficie de filtración. Además participan en la síntesis y mantenimiento de la MBG. Por lo tanto, los podocitos tienen un papel fundamental en el desarrollo de proteinuria.

En 1966 se publicó el primer estudio funcional sobre la barrera de filtración glomerular, realizado con trazadores de proteínas (18), y en la primera mitad de la década de los 70 se realizaron los primeros estudios morfológicos sobre la misma (18, 19). Pero no fue hasta finales de los años 90, cuando Mundel y cols. desarrollaron la primera línea celular inmortalizada de podocitos (20), con la que comenzó a estudiarse y conocerse con mayor profundidad el papel del podocito en el desarrollo de la proteinuria. De este modo desaparece lo que algunos autores denominan *visión mesangiocéntrica* de la patogenia de la proteinuria (21).

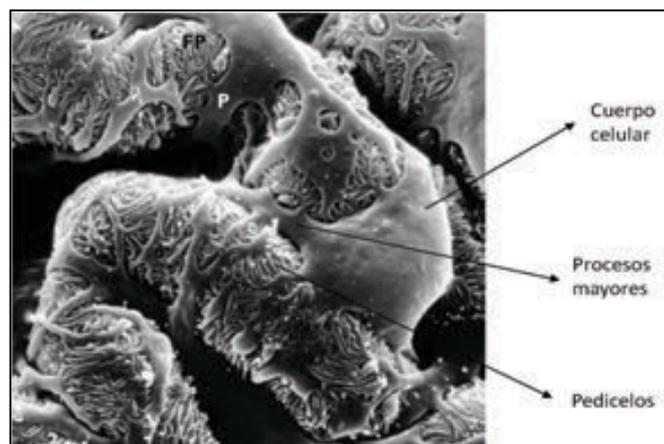
## B.2. Estructura del Podocito

La estructura celular del podocito diferenciado consta de tres partes (*Figura 3*):

- **Cuerpo celular:** Núcleo prominente positivo para tumor de wilms-1 (WT-1). Citoesqueleto formado esencialmente por microtúbulos y filamentos de vimentina, desmina y actina (17).

- **Procesos mayores:** Prolongaciones iniciales del cuerpo celular. Citoesqueleto muy desarrollado formado mayoritariamente por tubulina (paralela al eje longitudinal de la prolongación) conectada por la proteína tau ( $\tau$ ) a los filamentos de actina que están distribuidos perpendicularmente al eje principal y que se continúan en los pedicelos (17). *Figura 4*.

- **Pedicelos:** Prolongaciones finales de los procesos mayores. Estructura basada en microfilamentos contráctiles de actina asociados con miosina-II y  $\alpha$ -actinina, anclados a la MBG. Los pedicelos se interdigitan con los pedicelos de podocitos vecinos formando entre ellos la hendidura de filtración. Estos se mantienen unidos a los pedicelos contiguos mediante una estructura proteica denominada diafragma de filtración (DF) (17).



*Figura 3: Estructura celular del podocito (riñón de rata, microscopía electrónica de barrido, 6000x). Adaptado de Pavenstädt H et al. Physiol Rev. 2003 Jan;83(1):253-307.*

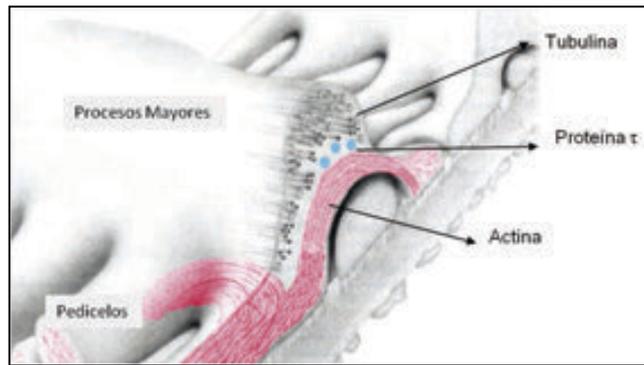


Figura 4: Detalle del citoesqueleto del podocito. Adaptado de Faul *TRENDS in Cell Biology* Vol.17 No.9, 2007.

### B.3. Hendidura de Filtración y Diafragma de Filtración

La hendidura de filtración se divide en 3 dominios funcionales (Figura 5):

- **Dominio Apical:** Zona luminal de la célula suspendida en el espacio urinario. Caracterizada por su superficie cargada negativamente por la presencia de proteínas aniónicas (podocalixina, podoplanina, podoendina). Esta carga negativa tiene como funciones básicas: repeler el paso de proteínas, mantener los pedicelos adyacentes separados y evitar la adherencia con las células parietales (17).

- **Dominio Basal:** Zona de anclaje del podocito a la MBG a través de complejos proteicos que la conectan al citoesqueleto:  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas y  $\alpha/\beta$ -destroglicanos (17).

- **Diafragma de Filtración (DF):** Complejo proteico localizado entre los pedicelos de los podocitos vecinos que forma un puente entre los mismos. Algunas de estas proteínas tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y función del DF (17, 22), entre ellas destacan:

- Zónula Occludens-1 (ZO-1): Primera proteína del DF descrita (23). Actúa como conexión entre proteínas del DF y el citoesqueleto, por lo que se encuentra concentrada en los puntos de inserción del DF (23, 24).

- Nefrina: Proteína estructural y funcional con un papel en el desarrollo de proteinuria, el caso más representativo es que la mutación de este gen produce el síndrome nefrótico congénito finlandés (25). A *nivel estructural* mantiene el diámetro de la hendidura de filtración y participa en el mantenimiento del citoesqueleto celular (26-28). A *nivel funcional* tiene un papel en vías de señalización celular (21, 29) y participa en el proceso de internalización de la glucosa permitiendo que los receptores de glucosa (GLUT-1 y 4) se fusionen con la membrana celular (30).

Estudios en pacientes con ND, secundaria a DM tipo 1 y tipo 2, permitieron observar una disminución en la expresión de nefrina y una distribución granular en pacientes con microalbuminuria y síndrome nefrótico, mientras que los sujetos sanos presentaban mayores niveles y una distribución lineal (31).

Es interesante remarcar el potencial de la nefrina como *marcador precoz* de la evolución de la ND. Un estudio que compara personas sanas con pacientes con DM tipo 1 y diferentes grados de afectación renal se observó *nefrinuria* únicamente en los pacientes diabéticos, independientemente de su grado de afectación renal (32).

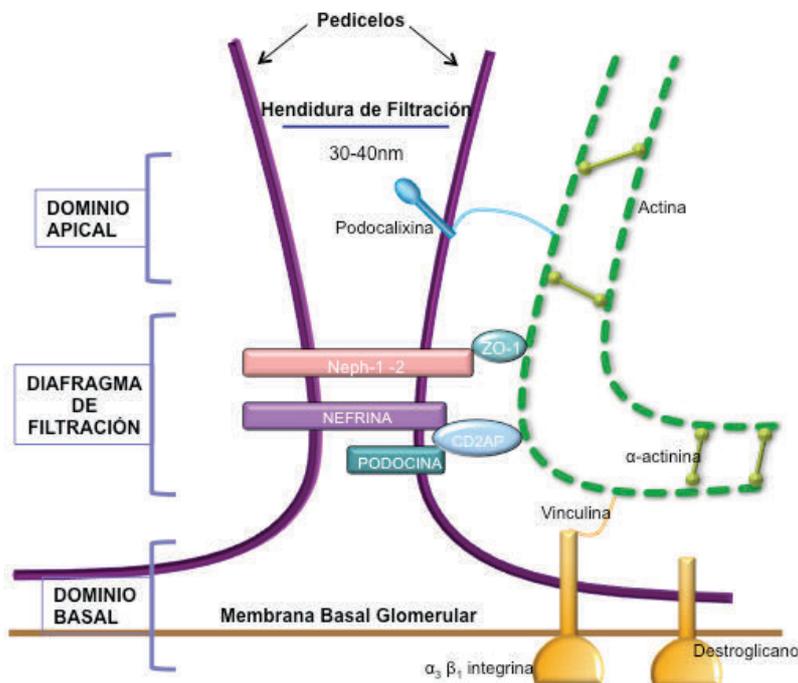
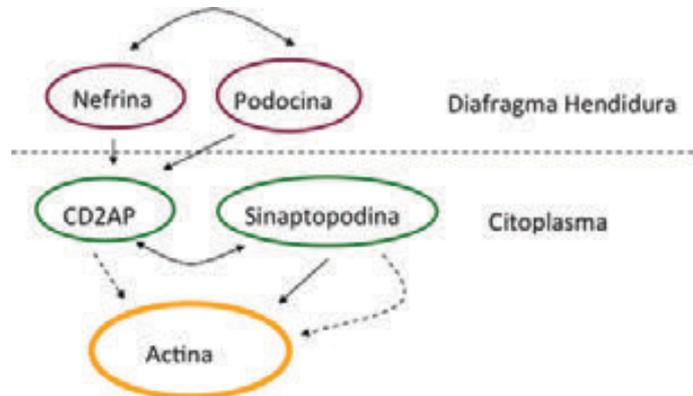


Figura 5: Estructura de la Hendidura y Diafragma de Filtración.

- Complejo Nefrina – Podocina – CD2AP (*Figura 6*): Papel en el mantenimiento de la estructura celular y del DF (17).



*Figura 6: Visión simplificada el complejo Nefrina-Podocina-CD2AP*

#### **B.4. Fisiopatología de la Podocitopatía Diabética**

##### **- Alteraciones a nivel molecular:**

Los elementos ya descritos que participan en los procesos fisiopatológicos de la ND tienen efectos específicos sobre los podocitos.

- Ang-II: Los podocitos presentan un SRA propio que ha sido descrito tanto en líneas celulares de podocitos humanos (33) como de ratón (34) [*Ver siguiente apartado*].

- TGF- $\beta$ : Su síntesis se incrementa en presencia de hiperglucemia, proteinuria y estrés mecánico (35). Altos niveles de esta citoquina provocan alteración estructural del DF y pérdida de marcadores de diferenciación epitelial conduciendo a una transición epitelio-mesenquimal (TEM) (36). Estimula la síntesis de MEC de un modo autocrino por parte de los podocitos o induciendo la síntesis por parte de las células mesangiales (35). Asimismo, induce apoptosis celular (35, 37, 38). A nivel funcional causa un incremento en la permeabilidad a la albúmina en una monocapa de podocitos (36).

- Estrés Oxidativo: A nivel podocitario produce alteraciones en los 3 dominios del podocito favoreciendo el desprendimiento celular (39) y la formación de

adherencias (21). Además causa alteraciones en el citoesqueleto (40), favorece la TEM (36) y tiene efectos pro-apoptóticos a través del TGF- $\beta$  (38).

- AGEs-RAGEs: Se forman tanto a nivel extracelular como intracelular; los extracelulares actúan uniéndose a su receptor específico en la superficie celular de los podocitos (40, 41). Disminuyen la expresión de nefrina (40), inducen la apoptosis celular (38, 40, 41) y aumentan los niveles de citoquinas proinflamatorias y de estrés oxidativo (40).

### **- Alteraciones podocitarias en la ND**

- Disminución del número de podocitos: Elemento cardinal en la evolución de la ND, todas las alteraciones posteriormente descritas acaban derivando en esta pérdida podocitaria.

Durante el desarrollo de ND existe una disminución del número de podocitos por glomérulo (42, 43). Diferentes estudios en modelos experimentales de ND demostraron una pérdida podocitaria con el desarrollo de ésta (43-45). Interesantes estudios en humanos muestran los mismos resultados (42, 46), pero además en diferentes trabajos se destaca la pérdida podocitaria como marcador predictivo de la evolución de la ND y como marcador urinario de la severidad o progresión de esta patología (46-52).

Este desprendimiento podocitario puede ser secundario a diferentes procesos como alteraciones en las moléculas adhesión o a la pérdida de nefrina con la consiguiente desestructuración celular, borramiento de los pedicelos y posterior desprendimiento (40, 53-55). También puede ser debido a apoptosis celular o a TEM ya que las células ven alterada su compleja estructura celular y pierden su especialización (36).

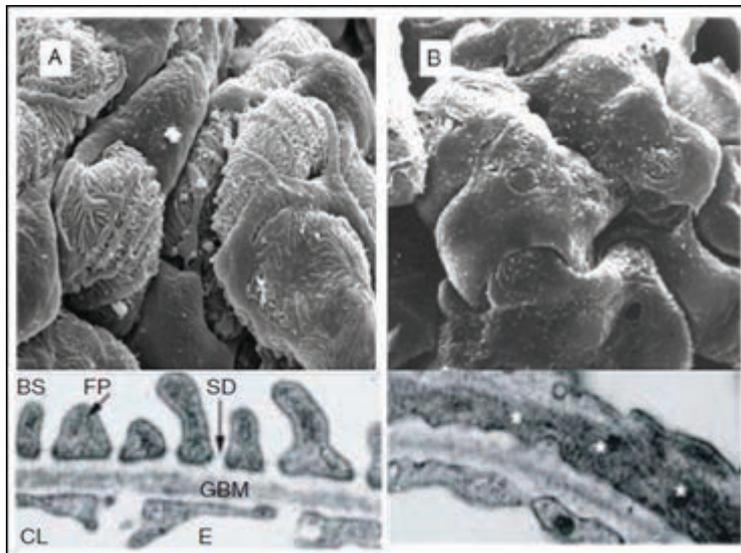
La pérdida celular deja áreas desnudas de la MBG lo cual favorece la aparición de sinequias y áreas de proliferación extracapilar, lo que se refleja clínicamente como aparición de proteinuria.

- Borramiento de pedicelos: Por alteraciones en las moléculas que forman el DF, lo cual lleva a una alteración en la estructura de filtración y también en la

citoestructura. Esto condiciona un borramiento de los pedicelos por lo que se pierde la superficie de filtración que conforman favoreciendo por tanto la proteinuria. *Figura 7.*

- Pérdida de la carga negativa de la superficie celular: Por despolarización de la superficie celular por disminución de podocalixina (56) causando pérdida de la selectividad de la barrera de filtración glomerular y aumento de la permeabilidad. También favorece la aparición de adherencias y sinequias y la pérdida de la estructura del DF entre pedicelos. Por otro lado, la podocalixina presenta conexiones con el citoesqueleto de actina por lo que su pérdida favorece una alteración en la estructura celular (29).

- Transición Epitelio-Mesenquimal: La TEM puede ser un mecanismo de pérdida de adhesión podocitaria a la MBG y por tanto disminución de su número. Los podocitos pueden presentar la transformación fenotípica característica de la TEM con aparición de marcadores mesenquimales como la desmina y pérdida de marcadores específicos de esta célula como nefrina, ZO-1 o P-cadherina (36, 57).



*Figura 7. Borramiento pedicelar. Izq: Estructura normal. Dcha: Borramiento pedicelar. Imágenes superiores de microscopía electrónica de barrido, imágenes inferiores de microscopía electrónica de transmisión. Adaptado de Mundel P et al. Kidney International (2010) 77, 571–580.*

## **C. MODELOS EXPERIMENTALES EN NEFROPATÍA DIABÉTICA**

### **C.1. Introducción**

En la investigación biomédica el uso de modelos experimentales animales murinos presenta muchas ventajas frente al uso de otras especies: el pequeño tamaño, el gran número de crías que tienen y su corta esperanza de vida son algunas de ellas. A nivel genético, los individuos son idénticos para un fenotipo concreto y existe un conocimiento detallado de todo su genoma (58). La capacidad para manipular este genoma obteniendo ratones transgénicos o *knock-out* (KO) aporta innumerables ventajas a estos modelos para el estudio de la fisiopatología de múltiples entidades (59, 60).

Un número considerable de estudios se han centrado en desarrollar modelos animales que permitan estudiar la ND en sus diferentes momentos de evolución con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y preventivas. En la actualidad son pocos los modelos murinos desarrollados que imiten con exactitud todas las características distintivas de la ND humana, debido a la resistencia de estos modelos a desarrollar ND (61). En los modelos murinos existentes se consiguen describir las consecuencias a corto plazo de la ND: hiperfiltración glomerular, albuminuria y algunos cambios histopatológicos, pero en la mayoría de los modelos no se consiguen observar lesiones renales establecidas.

### **C.2. Criterios de validación de modelos murinos de Nefropatía Diabética**

Hace una década el *National Institute of Health* en Estados Unidos creó el *Diabetic Complications Consortium* (<http://www.diacomp.org/>) con el objetivo de generar modelos murinos óptimos para el estudio de la DM y sus complicaciones micro y macrovasculares. Según este consorcio los criterios necesarios para que un modelo resulte de utilidad para el estudio de la ND son los presentados en la *Tabla 1*.

Función Renal	
Filtrado Glomerular	> 50% de disminución a lo largo de la vida del animal
Albuminuria	10 veces los valores de controles (por edad y sexo) de la misma cepa
Anatomía Patológica	
Compartimento Glomerular	Expansión de la matriz mesangial moderada-grave ± esclerosis nodular y mesangiolisis Engrosamiento de la MBG >50% del basal
Compartimento Vascular	Hialinosis arteriolar
Compartimento Túbulo-Intersticial	Fibrosis túbulo-intersticial

Tabla 1: Características funcionales e histopatológicas necesarias en los modelos murinos de ND.

En el momento actual no existe ningún modelo que cumpla todos estos requerimientos, lo que ha convertido los criterios de validación en objetivos a tener en cuenta y alcanzar, más que en criterios requeridos para la validación.

### C.3. El fondo genético como modificador de la Nefropatía Diabética en el ratón

En ratones, al igual que en humanos, existe una diferente susceptibilidad genética al desarrollo de la ND. En este sentido, algunos grupos han centrado su trabajo en caracterizar la susceptibilidad de diferentes cepas murinas a presentar ND enfatizando la importancia del fondo genético en el desarrollo de esta enfermedad (61-63). Por ejemplo es interesante destacar la relativa resistencia a desarrollar ND de la cepa más comúnmente utilizada, el ratón C57Bl/6 (63).

Gurley *et al.* estudiaron la susceptibilidad al desarrollo de ND en cinco cepas diferentes a las que se indujo DM mediante la inyección de estreptozotocina (STZ). En este estudio se describe una diferente respuesta de los niveles sanguíneos de glucosa entre las distintas cepas, pero en todas ellas los machos demostraron mayor hiperglucemia que las hembras (62).

#### **C.4. Modelos de Nefropatía Diabética tipo 1 (Tabla 2)**

##### **- Inducción con estreptozotocina**

Clásicamente el modelo más utilizado para el estudio de la DM-1. La STZ es un alquilante del ADN que produce toxicidad en las células  $\beta$  del páncreas por su entrada en ellas utilizando el receptor de glucosa GLUT-2. En consecuencia, el animal desarrolla una DM similar a la tipo 1 humana. Uno de los principales inconvenientes de este modelo es la toxicidad colateral en otros tejidos: induce daño en el ADN celular (con diferente intensidad según los tejidos) y un incremento del estrés oxidativo, entre otros (64-67). A nivel clínico se detecta la presencia de albuminuria. A nivel de histología renal se observa glomeruloesclerosis y engrosamiento de la MBG; sólo en 2 cepas especialmente sensibles se detectan lesiones renales avanzadas de glomeruloesclerosis nodular e hialinosis arteriolar, las cepas KK/H1J y DBA/2J (61).

##### **- Insulin-2 Akita**

Este modelo se describió originalmente como alternativa a la toxicidad por STZ. Se genera por la mutación del gen *Ins2* lo que produce una mal plegamiento de la proteína insulina 2 que se convierte en tóxica para las células  $\beta$  pancreáticas. Esta mutación se transmite de forma autosómica dominante siendo viables los animales heterocigotos (68, 69). Inicialmente se desarrolló sobre un fondo genético C57BL/6 (68), pero se puede desarrollar sobre diversos fondos, de nuevo, con diferentes susceptibilidades a producir clínica y lesiones histológicas (70). A las 3-4 semanas de vida los ratones presentan hipoglucemia, hipoinsulinemia y clínicamente polidipsia, poliuria y albuminuria. A nivel histológico sólo algunas cepas presentan aumento de la matriz mesangial e hipertrofia glomerular.

##### **- Non-Obese Diabetic**

Los ratones Non-Obese Diabetic (NOD) presentan una DM tipo 1 caracterizada por la presencia de insulinitis e infiltración leucocitaria en los islotes pancreáticos. El modelo fue desarrollado en 1980 y utilizado durante muchos años para el estudio de la inmunología de la DM tipo 1 y del trasplante de islotes pancreáticos (71). La principal

ventaja es la similitud de la fisiopatología de la DM y de las alteraciones inmunitarias con los humanos (72). Aunque no ha sido profundamente estudiado a nivel renal, sí está descrito el desarrollo de albuminuria, proliferación mesangial y esclerosis glomerular (73, 74).

Este ha sido el ratón utilizado en los estudios realizados en modelo animal de esta tesis, por lo que se describe con más detalle en la sección de **Métodos**.

#### **- eNOSKO**

Es un modelo de descripción y utilización más reciente. Se induce una mutación en el gen *Nos3*, que codifica la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) y consigue así un ratón incapaz de producir óxido nítrico endotelial. Estos ratones son más susceptibles a desarrollar ND (75-77). Se ha utilizado para estudiar la ND inducida por STZ. En estos ratones se observó un desarrollo de la ND mucho más acentuado en comparación con los controles STZ sin la mutación (76, 77).

#### **- OVE26**

Es un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa calmodulina en la células  $\beta$  pancreáticas bajo control del promotor de la insulina generando hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (78, 79). A nivel renal desarrolla características clínicas e histológicas de ND: poliuria y albuminuria desde los 2 meses de edad que va aumentando progresivamente hasta los 9 meses junto con un progresivo aumento de la presión arterial (PA). Se detecta un incremento del FG medido por aclaramiento de inulina durante los 2-3 meses de edad y posterior descenso entre los 5 y 9 meses. A nivel histológico se observa una expansión difusa y nodular del mesangio, así como engrosamiento de la MBG y fibrosis túbulo-intersticial (79). Estas características lo hacen muy atractivo para estudiar la ND establecida, pero pocos grupos lo utilizan dadas las dificultades para mantener estas colonias de animales por su elevada mortalidad.

Modelos experimentales ND tipo 1			
	Mecanismo desarrollo DM	Clínica	Lesiones histológicas
<i>STZ</i>	Inyección STZ → Toxicidad cel β pancreáticas	Albuminuria	Glomeruloesclerosis Engrosamiento MBG Hialinosis arteriolar Pérdida Podocitaria
<i>Insulin-2 Akita</i>	Mutación gen Ins2 → mal plegamiento proteína insulina 2 → toxicidad células β páncreas	Polidipsia Poliuria	Aumento matriz mesangial Hipertrofia glomerular (algunas cepas)
<i>NOD</i>	Autoinmunidad		Proliferación mesangial Esclerosis glomerular
<i>eNOSKO</i>	Mutación gen NOS3 → No producción óxido nítrico endotelial Inducción DM por stz	Albuminuria Poliuria Polidipsia	Mesangiólisis Microaneurismas Expansión matriz mesangial Glomeruloesclerosis nodular y difusa
<i>OVE26</i>	Sobre-expresión calmodulina en cel β páncreas	Albuminuria Poliuria Polidipsia Disminución FG HTA	Expansión difusa y nodular mesangial Engrosamiento MBG Fibrosis túbulo-intersticial

Tabla 2: Resumen de los modelos murinos para el estudio de la ND en DM tipo 1.

### C.5 Modelos de Nefropatía Diabética tipo 2 (Tabla 3)

#### - LepR<sup>db</sup>/LepR<sup>db</sup> (db/db)

La mutación db/db en la cepa C57BLKS fue la primera descrita que provocaba un fenotipo parecido a la DM asociada a obesidad en humanos (80). La mutación en el gen db, con una herencia autosómica recesiva, provoca cambios en el receptor de la

leptina. Estos cambios alteran las vías de señalización de ésta consiguiendo la anulación de la sensación de saciedad en estos animales (81, 82). La ND en el ratón db/db (cepa C57BLKS/J) se manifiesta a las 8 semanas de vida con un incremento en la albuminuria sin aparición lesiones histológicas. Progresivamente se desarrolla hipertrofia glomerular, que es muy evidente a las 16 semanas de vida, momento en el que también se observa una significativa expansión de la matriz mesangial. A los 18-20 meses de edad estas lesiones son muy evidentes y se acompañan de engrosamiento de la MBG (83, 84). Sin embargo, el desarrollo de albuminuria no se detecta en todos los trabajos publicados que utilizan este modelo.

#### **- DM inducida por dieta rica en grasas**

Este modelo de DM secundaria a una dieta rica en grasas ha sido utilizada con frecuencia para inducir obesidad y resistencia a la insulina en la cepa de ratones C57BL/6 (85) y también como modelo para el estudio de aterosclerosis acelerada asociada a la diabetes (86). Se detectan importantes alteraciones sistémicas compatibles con el síndrome metabólico en humanos, incluyendo obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial (87). A nivel renal desarrollan albuminuria y expansión de la matriz extracelular. Otras lesiones descritas con acumulación lipídica, infiltración por macrófagos, aumento de los niveles de estrés oxidativo y alteraciones en la homeostasis del sodio (75).

#### **- eNOSKO**

Para el estudio de esta mutación en la eNOS en un modelo de DM tipo 2 se creó un ratón doble KO: mutación espontánea del receptor de la leptina (ratón db/db) y la mutación dirigida del gen Nos3. A nivel clínico se detectó disminución del FG medido por aclaramiento de inulina y albuminuria importante. De las alteraciones histológicas características de la ND se observó la aparición de mesangiolisis, microaneurismas, expansión de la matriz mesangial y glomeruloesclerosis nodular y difusa (75, 88).

Modelos Experimentales de ND tipo 2			
	Mecanismo	Clínica	Lesiones histológicas
<i>db/db</i>	Mutación gen db → cambios en el receptor de la leptina → no sensación de saciedad → obesidad	Albuminuria Poliuria Polidipsia Polifagia Obesidad	Hipertrofia glomerular Expansión matriz mesangial Engrosamiento MBG
<i>Dieta rica en grasas</i>	Dieta rica en grasas → obesidad y resistencia a insulina	Albuminuria Síndrome Metabólico	Expansión mesangial
<i>eNOSKO</i>	Mutación gen NOS3 → No producción óxido nítrico endotelial Animal db/db	Albuminuria Poliuria Polidipsia Polifagia Disminución FG	Mesangiolisis Microaneurismas Expansión matriz mesangial Glomeruloesclerosis nodular y difusa
<i>BTBR<sup>ob/ob</sup></i>	Mutación gen leptina	Albuminuria Poliuria Polidipsia Polifagia	Hipertrofia glomerular Expansión mesangial y Mesangiolisis Engrosamiento MBG Pérdida podocitaria

Tabla 3: Resumen de los modelos más utilizados para el estudio de la ND en DM tipo 2.

#### - **BTBR<sup>ob/ob</sup>**

Dentro de los modelos murinos de más reciente descripción se encuentra éste que desarrolla DM tipo 2 de modo más precoz que muchas otras cepas (89), además de ciertas alteraciones neurológicas (90). Cuando sobre un fondo genético BTBR se presenta una mutación en el gen de la leptina (ob/ob) estos animales presentan resistencia a la insulina con hiperinsulinemia e hiperglucemia a las 6 semanas de vida (91). Este ratón, como modelo de ND, parece reunir la mayoría de los criterios propuestos por el *Diabetic Complications Consortium*, reproduciendo las características

esenciales del daño glomerular en la ND humana. Se identifican claramente hipertrofia glomerular, marcada expansión mesangial, mesangiólisis y engrosamiento de la MBG, así como pérdida podocitaria a partir de las 8 semanas de vida. Clínicamente se acompaña de proteinuria 10 veces superior a sus controles (91). La aparición rápida de la ND y su similitud con la humana permite utilizar este modelo para el estudio de estrategias terapéuticas dirigidas a detener o enlentecer la ND.

### **C.6. Ejemplos de modelos utilizados para el estudio de la Nefropatía Diabética que no desarrollan DM**

La implicación de múltiples vías fisiopatológicas en la evolución de la ND ha llevado a muchos grupos de investigación a estudiar el papel de éstas sin necesidad de inducir DM. Los siguientes son dos ejemplos que retratan las posibilidades que ofrecen este tipo de modelos.

#### **- Sobre-expresión GLUT-1**

Está demostrado que las células mesangiales en la ND sobre-expresan GLUT-1 (92). Wang *et al.* desarrollaron un ratón que sobre-expresa GLUT-1 en las células mesangiales, pero sin inducir desarrollo de DM (93). Este animal presenta expansión mesangial difusa, ocasionalmente con características nodulares, aunque son nódulos más celulares que no replican claramente los típicos de Kimmelstiel-Wilson. A las 26 semanas de edad presentan glomeruloesclerosis moderada-grave con aumento del colágeno IV y la fibronectina (93). Estos hallazgos sugieren un papel del GLUT-1 en el desarrollo de la ND y remarcan el interés de este tipo de modelos para el estudio en profundidad de la ND.

#### **- PodIRKO**

Para determinar la posible trascendencia de la señal de insulina en el podocito se desarrollaron 2 modelos de ratón KO para el receptor de la insulina únicamente en los podocitos, uno bajo el control del promotor de la nefrina y otro de la podocina (94). A las 5 semanas de vida en ambos modelos apareció albuminuria por pérdida de interdigitaciones podocitarias y a las 8 semanas los niveles de albuminuria eran

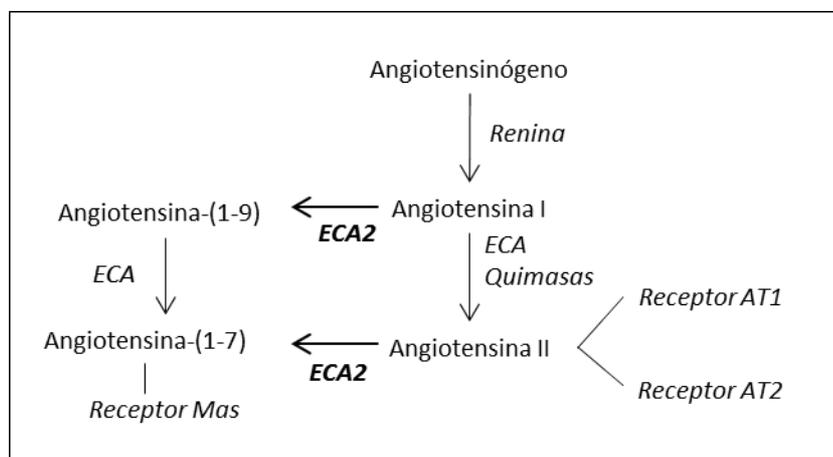
significativamente más elevados con agravamiento en las lesiones histológicas: pérdida extensa de las interdigitaciones y además aparición de apoptosis podocitaria. A las 13 semanas de vida se observó expansión de la matriz mesangial, engrosamiento de la MBG y glomeruloesclerosis (94). Estos hallazgos indican la importancia para la función renal de la sensibilidad del podocito a la insulina.

## D. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA. ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA 2

### D.1. Introducción

El SRAA actúa como regulador de la función cardiovascular, y sus alteraciones tienen un papel fundamental en la fisiopatología de diferentes enfermedades cardiovasculares, entre ellas la ERC. Es una de las principales dianas terapéuticas para retrasar la progresión de la ERC de diferentes etiologías, incluyendo la ND.

El SRAA es una cascada hormonal que se inicia con la síntesis de un enzima, la renina, básicamente en el aparato yuxttaglomerular. Este enzima convierte el angiotensinógeno a un péptido inactivo, la Ang-I. Esta, por la acción del enzima convertidor de angiotensina (ECA) se transforma en Ang-II, un péptido biológicamente activo, cuyas funciones en la ND se detallan en otros puntos de la introducción. La Ang-II ejerce sus funciones a través de dos receptores: el receptor de la Ang-II tipo 1 (AT1-R) y el tipo 2 (AT2-R). *Figura 8.*



*Figura 8. Esquema con los principales elementos del SRA.*

## **D.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y su modulación farmacológica en la Nefropatía Diabética**

Desde los años 80 estudios clínicos han demostrado la efectividad del bloqueo del SRA en frenar la evolución de ERC en la ND (95, 96). Durante los años 90 diversos ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo demostraron que el uso de IECAs retrasa la progresión de la ERC en pacientes con ND, independientemente del control de presión arterial, con seguimientos que oscilaban entre los 2 y los 5 años. También se detectaron efectos beneficiosos sobre la proteinuria: reducción precoz y menor probabilidad de progresión de la microalbuminuria a macroalbuminuria en los pacientes en tratamiento con IECAs (97-99). Estos resultados se observaron tanto en pacientes con ND secundaria a DM tipo 1 como tipo 2 (100, 101). La utilización de doble bloqueo del SRAA con un IECA y un ARA-2 produce una mayor disminución de la proteinuria que la utilización aislada de un IECA (102).

A pesar de estos datos es necesario destacar que esta estrategia terapéutica no parece influir en otra de las implicaciones clínicas de la DM, el aumento de riesgo cardiovascular. Un estudio multicéntrico con un seguimiento a casi 5 años (ONTARGET) demostró que la combinación de IECAs y ARA-2 no disminuye la incidencia de eventos cardiovasculares o renales en los pacientes con ND y sí aumenta los efectos adversos (103).

La utilización de inhibidores directos de la renina como aliskiren en pacientes diabéticos es controvertida. La detección de un incremento en la incidencia de accidentes cerebro-vasculares y complicaciones renales durante el desarrollo de un ensayo clínico (ALTITUDE) que evaluaba si añadir aliskiren al tratamiento habitual con IECAs o ARA-2 disminuía la morbimortalidad cardiovascular y renal (104), llevó a la *Agencia Europea del Medicamento* a desaconsejarlo en este tipo de pacientes.

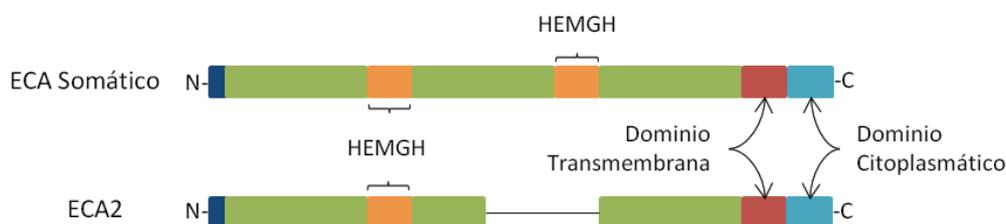
Por tanto, la inhibición del SRAA con un fármaco o con varios en combinación, no produce el nivel de protección cardiovascular deseada en estos pacientes y tampoco frena por completo la evolución hacia la ERC terminal. Es posible que esto sea consecuencia de que, inhibiendo la formación o actuación de la Ang-II, se produzca algún efecto compensatorio en otros niveles del sistema. Por eso, teniendo en cuenta su papel central en la fisiopatología de la ND, es necesario conocer en profundidad todos los elementos del SRAA y valorarlos como posibles futuras dianas terapéuticas.

### D.3. Enzima Convertidor de Angiotensina 2

El descubrimiento en el año 2000 de un mecanismo de degradación de la Ang-II a través de un enzima homólogo del ECA, el enzima convertidor de la angiotensina 2 (ECA2), ofreció la oportunidad de iniciar interesantes estudios sobre la regulación del SRA a través de este enzima (105, 106). El ECA2 es una proteína transmembrana con función de metaloproteasa dependiente de zinc y es el único enzima homólogo activo del ECA que se conoce en la actualidad (105-107). El gen del ECA2 se encuentra localizado en el cromosoma X (Xp22) y codifica por 805 aminoácidos. El enzima presenta un dominio catalítico amino terminal (con un 42% de homología con el dominio catalítico amino-terminal del ECA) y un dominio carboxi-terminal. La zona de proteína de unión del zinc (HEMGH) se repite 2 veces en la ECA y una vez en la ECA2, y se localiza en la región homóloga. *Figura 9.*

Mientras que el ECA cataliza la conversión de Ang-I a Ang-II, el ECA2 degrada la Ang-II a Ang-(1-7) y la Ang-I a Ang-(1-9) (105, 106). *Figura 8.*

Inicialmente se describió la presencia de la ECA2 en el riñón, el corazón y los testículos (106, 107), aunque también está presente en otras localizaciones como el hígado (108) o el sistema nervioso central (109).



*Figura 9. Estructura de ECA somática y ECA2. La zona de unión al Zinc (HEMGH) se encuentra en la zona homóloga.*

### D.4. Localización y función del ECA2 a nivel renal

Varios estudios se han centrado en la localización del ECA2 a nivel renal. En ratones se ha detectado mediante estudios de colocalización con inmunofluorescencia (IF) y marcaje con partículas de oro en el compartimento glomerular, principalmente en las células mesangiales y en los podocitos (sobre todo en los pedicelos y en los puntos

de anclaje del DF). A nivel túbulo-intersticial se detectó principalmente en el borde en cepillo del túbulo proximal, así como en su citoplasma (110). Otro estudio mediante microdissección de nefronas de rata mostró la presencia de expresión proteica y génica de ECA2 en todos los segmentos tubulares excepto en el asa ascendente gruesa (111).

En cuanto a la función del ECA2 a nivel renal, este último trabajo valoró la función del enzima a nivel tubular mediante la incubación de microdissecciones tubulares con diferentes sustratos. Se observó que en las células tubulares proximales el ECA2 participa en la formación de Ang-(1-7) fundamentalmente por la conversión de Ang-I en Ang-(1-9) y ésta por el ECA en Ang-(1-7) (111). Otro trabajo focalizado en el ensayo de la actividad enzimática del ECA2 utilizando diferentes sustratos observa que el ECA2 sólo hidroliza Ang-II y la hidrólisis del resto de péptidos es nula o mínima (112). Aunque ambos estudios muestran resultados contrarios no son excluyentes, ya que son metodológicamente diferentes y es conocido que el SRAA local de distintas células u órganos no son iguales.

En 2010 se publicó un trabajo con un modelo de ratón no diabético KO para ECA2 y estudiando sus consecuencias a nivel renal (113). En ratones KO de 3 meses de edad no se encontraron alteraciones a nivel macroscópico o de microscopía óptica comparado con los controles, pero al analizar el tejido renal con microscopía electrónica sí se detectaron pequeños depósitos mesangiales de fibras de colágeno. Tras un año de seguimiento se detectó en microscopía óptica glomeruloesclerosis difusa, hialinosis capilar y expansión mesangial. En estudios de inmunohistoquímica se observó un aumento en la tinción de Col I y Col II, fibronectina y  $\alpha$ -SMA (marcador de músculo liso). Con microscopio electrónico se confirmó engrosamiento de la MBG. Clínicamente se detectó albuminuria sin elevación de creatinina o urea en sangre. Estos cambios no se asociaron a la aparición de hipertensión arterial y/o diabetes (114). Todos estos hallazgos se revirtieron con el tratamiento con un ARA-2, lo cual sugiere que los daños observados eran mediados, al menos en gran parte, por la Ang-II (114).

#### **D.5. ECA2 y Nefropatía Diabética en modelos animales**

Desde su descubrimiento, el papel del ECA2 y su principal producto, la Ang-(1-7), en la ND ha sido un elemento de constante estudio y controversia. Uno de los primeros trabajos en este campo utilizó el modelo de inyección de STZ con un periodo de seguimiento de 24 semanas tras la inducción de la DM, con la finalidad de valorar

los efectos más tardíos de la DM sobre el ECA2 (115). Se detectó una disminución de la expresión génica y proteica de ECA2 a nivel tubular y un aumento de expresión génica en el glomérulo en las ratas diabéticas comparado con los controles. Un subgrupo de las ratas diabéticas fue tratado con IECAs observándose una normalización de los niveles de expresión proteica renal de ECA2 (115).

En dos estudios con el modelo de ratón db/db se encontraron diferentes resultados (110, 116). Se observó mediante inmunohistoquímica una disminución de la expresión proteica a nivel glomerular de ECA2 junto con un incremento de su expresión en túbulos. Se detectó un aumento en la expresión de ECA a nivel glomerular y disminución de la expresión tubular. Añadiendo un inhibidor específico de ECA2 en los ratones diabéticos se detectó un incremento en la albuminuria respecto al diabético con vehículo junto con un mayor depósito de fibronectina. Este efecto parece secundario a un acúmulo de Ang-II, ya que la utilización de un ARA-2 evitó el aumento de fibronectina (110). Estos resultados llevan a los autores a plantear la hipótesis de que un aumento en los niveles de ECA con una disminución del ECA2 a nivel intraglomerular conduce a un aumento de la Ang-II a este nivel con su consiguiente efecto deletéreo.

El mismo grupo publicó un trabajo con el mismo modelo animal y un modelo de diabetes por STZ, pero estudiando la actividad enzimática del ECA2. La actividad enzimática estaba aumentada en el córtex renal al igual que la expresión proteica y ambas correlacionaban. La expresión génica estaba disminuida sugiriendo una regulación post-transcripcional del enzima (117).

Posteriormente diferentes trabajos abordaron el papel del ECA2 en la ND utilizando modelos experimentales KO para el ECA2 en ratones diabéticos tipo 1 (118-120). Los animales KO presentaban un menor peso corporal que los controles *wild-type* (118, 120). Se observó un deterioro más precoz y marcado de la función renal en los animales KO comparado con los diabéticos *wild-type*, con mayor albuminuria y mayores niveles de creatinina y productos nitrogenados en sangre. A nivel histológico también se detectaron lesiones más marcadas en los animales KO para ECA2 (118): un volumen glomerular mayor, junto con un incremento en la matriz mesangial y en el grosor de la MBG, y aumento en marcadores histológicos de fibrosis como fibronectina,  $\alpha$ -SMA, Col IV (118, 120) y marcadores de inflamación como aumento de VEGF y de tinciones específicas para macrófagos (120).

En cuanto a otros elementos del SRAA el estudio de Wong *et al.* observó un menor nivel de Ang-I y Ang-II a nivel renal en los KO (122). Contrariamente, en el

trabajo de Shiota *et al.* la Ang-II en los ratones KO estaba incrementada a nivel renal, aunque no a nivel plasmático (120). En la literatura se dan posibles explicaciones a estos resultados: puede que esté influido por el tipo de análisis realizado, ya que el córtex renal global no es significativo de lo que ocurre a nivel glomerular en el ratón. También es posible que sea cepa-dependiente (118, 121) o debido al modelo de diabetes o al tiempo de evolución de la misma. En cuanto a la Ang-(1-7) se detectó una disminución en sus niveles corticales (119).

El tratamiento con ARA-2 disminuyó los niveles de albuminuria en los KO a los niveles de los únicamente diabéticos, remarcando que el daño presente es dependiente de Ang-II al menos en parte (118, 120). En cambio la utilización de IECAs no revirtió la albuminuria en los animales KO indicando que es posible que el efecto de los IECAs esté relacionado con el ECA2 (119).

Otros modelos de diabetes en los que se bloqueó farmacológicamente el ECA2 mostraron hallazgos similares, con incremento de la albuminuria e histológicamente aumento de la matriz mesangial (122). En el trabajo de Tikellis *et al.* la administración de un inhibidor de ECA2 a ratones diabéticos produjo los mismos efectos: aumento de la albuminuria, disminución en la expresión de marcadores de fibrosis y disminución de los niveles de Ang-(1-7). En este caso la respuesta al tratamiento con un IECAs también fue nula (119).

Por tanto de estos trabajos se concluye que la delección génica o la anulación farmacológica del ECA2 producen un empeoramiento de las lesiones renales y sus consecuencias clínicas en animales diabéticos.

Estos trabajos permiten suponer que estos efectos son secundarios al incremento de Ang-II. La Ang-(1-7) y su receptor están disminuidos en los riñones de diferentes modelos de animales diabéticos (123, 124). Es conocido que la Ang-(1-7) tiene un papel renoprotector en la ND, modulando la inflamación, el estrés oxidativo (125-127) y parte del proceso de fibrosis renal (128). Sin embargo este efecto beneficioso es controvertido. En un estudio en animales diabéticos por STZ a los que se infundía Ang-(1-7) durante 6 semanas (129), se observó peor evolución que en los diabéticos sin infusión: menor peso corporal y mayor peso renal, mayor proteinuria y elevación más marcada de marcadores de fibrosis como el TGF- $\beta$ . En cuanto a los diferentes elementos del SRAA detectaron una disminución de los niveles de expresión génica de ECA2 con normalización de los niveles de ECA a cifras comparables con los controles no diabéticos. Además de un aumento en el AT1-R, en sentido contrario a los diabéticos

sin infusión, y disminución AT2-R y del receptor específico de Ang-(1-7), el Receptor Mas, más marcada que en los diabéticos. En cuanto a la Ang-II sus niveles estaban elevados en plasma y riñón en el grupo de diabéticos y también en los que recibían la infusión de Ang-(1-7), pero en menor medida (129). Los autores concluyen con la hipótesis de que los niveles elevados de Ang-(1-7) pueden inhibir la acción del ECA2 y acelerar el efecto deletéreo del ECA-Ang-II junto con sus receptores. Otra de las posibles explicaciones de este efecto es que, a altas concentraciones, la Ang-(1-7) se une al AT1-R, por lo que es posible que estos efectos perjudiciales sean por la señal dependiente de este receptor (129).

#### **D.6. ECA2 y Nefropatía diabética en humanos**

En 2004 se publicó el primer trabajo que estudiaba la distribución del ECA2 en biopsias humanas, comparando sujetos sanos con pacientes con nefropatías de diferentes orígenes, entre ellos ND, mediante inmunohistoquímica y medición semicuantitativa (130). Los sujetos con patología renal mostraban mayor expresión global de ECA2, más concretamente: tinción más potente en podocitos, aparición de una sutil tinción en mesangio y aparición de ECA2 a nivel de endotelio glomerular y de capilares peritubulares. A nivel tubular no había diferencias respecto a los sanos: tinción más marcada en borde en cepillo de túbulo proximal y más débil en túbulo distal colector. Tampoco existían diferencias en vasos de mayor calibre: tinción potente en endotelio y músculo liso de arterias interlobares y en venas. No se observaron diferencias entre los pacientes con o sin bloqueo del SRAA (130). Estos hallazgos, principalmente a nivel endotelial, podrían estar relacionados con el incremento en la expresión de ECA en esas mismas zonas, sugiriendo que el aumento de ECA2 es un mecanismo compensatorio frente al posible aumento de la Ang-II (130, 131).

Posteriormente se publicó un estudio de la expresión génica de los diferentes elementos del SRA en córtex renal de pacientes diabéticos comparado con pacientes con otras nefropatías. Únicamente encontraron un aumento significativo en la expresión génica de ECA y AT1-R, pero no variaciones en el ECA2, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral de pacientes diabéticos (n=8) (132).

El único trabajo centrado únicamente en el estudio de la expresión de ECA y ECA2 en biopsias renales de pacientes con ND comparado con controles sanos se publicó en 2008 e incluyó solo 20 pacientes (133). Detectaron en los diabéticos un

incremento en la expresión proteica de ECA, con una expresión génica igual a los controles, a nivel glomerular. Esto podría indicar una regulación post-transcripcional del enzima. No detectaron variaciones en el ECA a nivel tubular. En cuanto al ECA2 existe una menor expresión génica y proteica del enzima tanto a nivel glomerular como tubular. Con estas variaciones el índice ECA/ECA2 a nivel glomerular y tubular está aumentado en los diabéticos, indicando una situación favorable a la síntesis de Ang-II en estos pacientes. En los pacientes con peor función renal los niveles de ambos enzimas son significativamente más bajos que en los que presentan una función renal conservada (133), lo que indica que a lo largo de la evolución de la ND los diferentes elementos del SRAA también evolucionan y cambian.

## **E. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA EN EL PODOCITO DIABÉTICO**

El podocito posee un SRA funcional propio que presenta variaciones en diferentes situaciones patológicas. Está demostrado que la presencia de niveles elevados de glucosa o el estrés mecánico incrementan los niveles de Ang-II. Estos cambios inducen daño celular que lleva al desarrollo de proteinuria y glomeruloesclerosis con progresiva pérdida de la función renal.

Esta parte de la introducción está centrada en las evidencias existentes en la literatura acerca de los podocitos en cultivo, la ND y el SRAA; ya que en esta tesis se ha utilizado una línea celular inmortalizada para los estudios del SRAA en podocitos.

### **E.1. Los podocitos como diana terapéutica**

Es sabido que el bloqueo del SRA disminuye la proteinuria y retrasa la progresión de la ERC bloqueando la Ang-II (97, 99, 134). El número de podocitos por glomérulo predice la progresión de la ND sugiriendo que la prevención de esta pérdida, por ejemplo previniendo las alteraciones de la nefrina-citoesqueleto, es terapéuticamente relevante. La actividad del SRA en el podocito y sus alteraciones en la ND, convierten esta célula en una importante diana farmacológica.

Diversos estudios analizan al efecto de IECAs y ARA-2 en los podocitos utilizando diferentes modelos animales. Los IECAs y ARA-2 han demostrado reducir

la proteinuria y atenuar la reducción de nefrina asociada a la ND en ratas diabéticas por inyección de STZ (135, 136). En modelos de DM tipo 1 y 2 y en cultivos celulares con alta glucosa en el medio se observó que la administración de IECAs o ARA-2 previno la menor expresión y redistribución de la ZO-1 detectada en ausencia de fármacos (137, 138).

Analizando la MBG con microscopía electrónica en ratas diabéticas por STZ Mifsud *et al.* encontraron una disminución en los poros de la MBG, indicativo de ensachamiento de los pedicelos. Estos hallazgos se atenuaron tras la administración de IECAs o ARA-2 (139). En otro estudio se demostró la reducción en el número de podocitos, irregularidades en las interdigitaciones de los pedicelos y borramiento pedicelar en ratas espontáneamente hipertensas con diabetes por STZ. Estas alteraciones disminuyeron tras la administración de una ARA-2. Un hallazgo adicional fue el incremento en la tinción para desmina (marcador de TEM), que disminuyó tras la administración de un ARA-2 (140).

Langhman *et al.* desarrollaron un interesante estudio en pacientes con DM tipo 2 con proteinuria que fueron aleatorizados a recibir IECAs o placebo durante 2 años. En las biopsias renales de estos pacientes se observó una disminución del 62% en la tinción para nefrina en el grupo diabético comparado con el no diabético y una correlación inversa entre la expresión de nefrina y el grado de proteinuria. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los diabéticos tratados y no tratados (141).

## **E.2. Sistema Renina-Angiotensina propio de los podocitos: Enzimas, Péptidos y Receptores.**

Diferentes estudios se han centrado en describir el SRA en podocitos tanto humanos como de ratón. Estos estudios encontraron que el podocito posee todos los elementos de SRA necesarios para generar Ang-II y Ang-(1-7), los elementos biológicamente más activos de este sistema (33, 34). *Figura 10.*

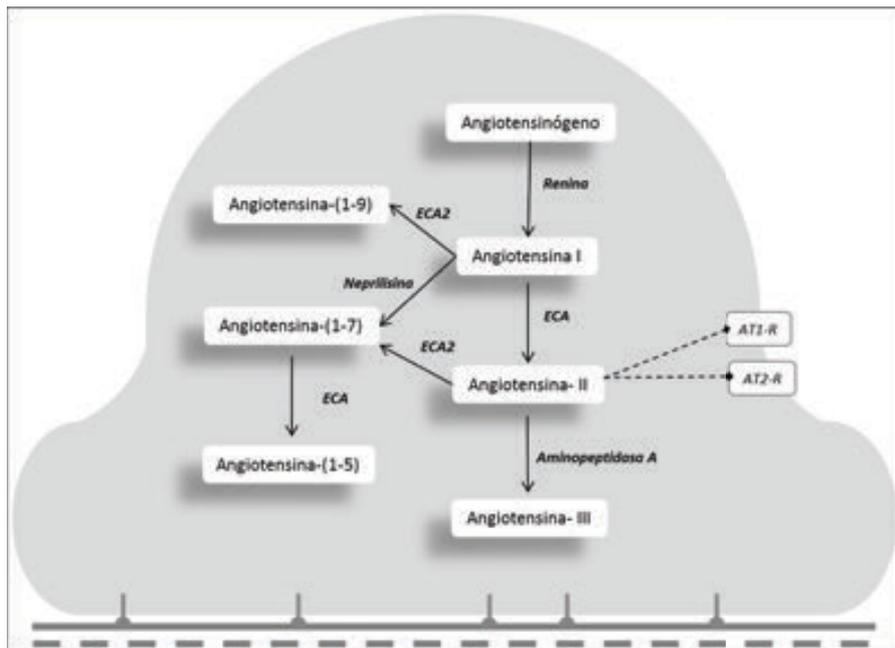


Figura 10. SRA de un podocito. Enzimas, Péptidos y Receptores.

## - Enzimas

Diversos estudios han demostrado la expresión génica y proteica de renina en cultivos celulares (33, 34, 142). Además se detectó actividad de renina mediante métodos indirectos, la generación de todos los péptidos del SRAA tras la incubación con el sustrato de la renina, e inhibiendo esta reacción en presencia de un bloqueante específico de la renina (34). Hasta la publicación de estos trabajos no había evidencia en la literatura que demostrase la presencia de renina en los podocitos. Sequeira López *et al.* plantearon la hipótesis de que la habilidad de las células adultas para sintetizar renina depende de su estirpe celular. Durante el periodo embrionario y fetal las células que expresan renina están ampliamente distribuidas a lo largo del árbol arterial renal, el mesangio, el intersticio renal y en un grupo celular en los túbulos renales en desarrollo. Según va produciéndose la maduración el número de células que expresan renina se va restringiendo al aparato yuxtaglomerular, pero una alteración en la homeostasis resulta en un incremento en este tipo de células a nivel glomerular. Utilizando un modelo de ratón transgénico con un gen reportero, localizaron las células que presentaban expresión génica de renina. El músculo liso, las células epiteliales parietales y las células mesangiales podían diferenciarse a células con renina en caso de que fuesen necesarios mayores niveles de hormona, en este trabajo este estímulo era la presencia de una dieta

baja en sodio (143). Basándose en estos experimentos Velez *et al.* plantearon la hipótesis de que los podocitos en cultivo pueden transformarse en células que expresan renina debido a su inmortalización y también que enfermedades que llevan a lesiones podocitarias, como la ND, pueden resultar en este mismo cambio fenotípico (34).

La presencia o ausencia de ECA en los podocitos es también un tema controvertido. Diferentes estudios han demostrado la presencia de esta enzima con métodos directos (33, 34, 144) e indirectos (34). Contrariamente otros trabajos no detectaron expresión ni funcionalidad del ECA (33, 110).

La expresión de ECA2 varía ampliamente entre diferentes tejidos y especies (145, 146), en riñones de ratón se ha detectado alta expresión del enzima principalmente en podocitos y células mesangiales (110). En 2007 se demostró la presencia de ECA2 en cultivo de podocitos murinos demostrando la degradación de Ang-II en Ang-(1-7) y, más significativamente, el acúmulo de Ang-II en presencia de un inhibidor específico de ECA2 (34).

El papel de la neprilisina en los podocitos es ser la principal vía de formación de Ang-(1-7), como se demuestra en diferentes trabajos en cultivos celulares de podocitos humanos y murinos (34, 147).

La función principal de la aminopeptidasa A en podocitos en cultivo conocida es degradar Ang-II en Ang-III (34), destacando una rápida degradación de la Ang-II por esta enzima (147).

## **- Péptidos**

El Agt es el primer péptido en la cascada del SRA y el único sustrato conocido de la renina. Su presencia en podocitos se demostró detectando ARNm en una línea celular de podocitos de ratón (33).

En cuanto a los péptidos de la angiotensina, los productos más activos del SRA son la Ang-(1-7) y Ang-II. La Ang-(1-7) es el producto del SRA más abundante en el podocito (34) y como ya se ha comentado, la neprilisina tiene el papel principal en su generación (34). Los podocitos humanos diferenciados secretan Ang-II. Se ha demostrado una modesta formación de Ang-II sensible a captopril en podocitos de ratón (34), aunque en podocitos humanos la formación no se altera significativamente en presencia de inhibidores de la renina o del ECA, lo que sugiere la implicación de vías independientes del ECA en su síntesis (33).

## **- Receptores**

Mediante estudios de expresión proteica, génica e IF, se detectaron tanto el AT1-R como el AT2-R en la membrana de podocitos siendo más intensa la expresión de AT1-R (33, 148, 149). Dada la presencia de ambos receptores en la superficie de los podocitos, diferentes autores plantean la hipótesis de que la Ang-II sintetizada por el podocito pueda tener una función autocrina en la célula por endocitosis mediada por estos receptores (33). Algunas de sus acciones podrían consistir en su interacción con receptores nucleares específicos que regulen la transcripción génica, por ejemplo de renina y Agt, también la interacción con receptores intracelulares que conlleven al generación de segundos mensajeros y efectos sobre los flujos iónicos de calcio (150). Esta aproximación subraya la importancia del SRAA podocitario en la evolución de la ND y abre nuevas perspectivas en la investigación.

Hasta el momento no hay evidencia en la literatura de la presencia del receptor de Ang-(1-7), Mas-receptor, en los podocitos.

### **E.3. Alteraciones del Sistema Renina-Angiotensina en la Podocitopatía Diabética**

#### **- Angiotensinógeno y su enzima la renina**

Los podocitos incubados con alta concentración de glucosa muestran un incremento en la expresión génica de renina, en la proporción relativa de células positivas en la tinción específica de renina (142) y en la actividad del enzima (142, 144). La preincubación con un inhibidor directo de la renina bloqueó la producción de Ang-II remarcando la importancia del enzima y su inhibición en la ND (142). La renina se une con la misma afinidad a sus receptores propios como a los de la pro-renina (precursor de la renina). Duvarsula *et al.* demostraron la presencia de pro-renina (mediante IF y estudios de expresión génica) en cultivo de podocitos de ratón, del mismo modo que en una línea primaria de podocitos de rata y en el riñón de ratas con DM inducida por STZ. Mediante inmunohistoquímica detectaron un aumento en la intensidad de la tinción para pro-renina dentro del glomérulo en ratas con hiperglucemia incluso previamente al desarrollo de nefropatía (142).

### **- Ang-(1-7) y sus enzimas: Neprilisina y ECA2**

A pesar de que la neprilisina parece ser la principal fuente de Ang-(1-7) en el podocito (34) no hay estudios focalizados en los cambios de este enzima en cultivos de podocitos en condiciones “diabéticas”. Un estudio en un modelo animal de ratas con ND por STZ mostró una disminución de los niveles del enzima en córtex renal comparado con el grupo control (151). De modo opuesto en otro trabajo posterior se observó una atenuación de los niveles de albuminuria en ratas diabéticas cuando recibían un inhibidor de la neprilisina y detectaron una disminución de la expresión glomerular de desmina como marcador de daño podocitario (152). Estos hallazgos contradicen la lógica del SRAA ya que la inhibición de la neprilisina debería disminuir la Ang-(1-7) alterando el balance Ang-II/Ang-(1-7) hacia un estado pro-Ang-II. Es interesante remarcar la presencia de ECA2 en este sistema; es posible que este enzima incremente su acción en caso de existir un incremento en los niveles de Ang-II, como consecuencia se incrementarían los niveles de Ang-(1-7) y su papel renoprotector.

La tinción glomerular de ECA2 está disminuida en los ratones obesos diabéticos db/db comparado con sus controles (110). Por otro lado, la disminución del ECA2, tanto farmacológica como genética, empeora la albuminuria y las lesiones glomerulares en modelos experimentales de ND. El análisis de los riñones de estos animales no mostraron diferencias en el número o características de los podocitos entre los grupos de estudio (122). Utilizando un modelo de ratón diabético por STZ y transgénico que sobre-expresaba el ECA2 únicamente en los podocitos se observó que en los estadios iniciales de diabetes el ratón transgénico mostraba menores niveles de albuminuria y menores alteraciones histológicas que el diabético no transgénico (153). Estas evidencias confirman la potencial relevancia del ECA2 en la fisiopatología de la podocitopatía diabética, y posiblemente no sólo por su función degradando la Ang-II.

### **- Las dianas principales en la progresión de la ND: ECA y Ang-II**

La presencia de alta glucosa en el medio de cultivo incrementa los niveles de Ang-II de modo significativo y dosis-dependiente tanto en los lisados celulares como en el propio medio (142, 154).

Diversos estudios sugieren el papel de vías no dependientes de ECA en la formación de Ang-II, ya que no se detectó elevación de esta enzima (144) o porque la preincubación con IECAs fue incapaz de antagonizar la generación de Ang-II (142).

En conjunto, estos estudios indican que los altos niveles de glucosa llevan a una activación del SRAA propio de los podocitos con un aumento de la generación de Ang-II y AT1-R.

La presencia de estrés mecánico conlleva un aumento en los niveles de Ang-II que no es bloqueado por la preincubación con un IECAs, lo que de nuevo sugiere que vías no dependientes de ECA participan en su formación (37). En este mismo estudio se detectó un incremento de AT1-R tanto en los podocitos en cultivo como en modelo *in vivo*. Otro hallazgo de gran interés fue el incremento en la apoptosis celular en presencia de estrés mecánico. La pre-incubación de las células con bloqueantes selectivos y no selectivos de Ang-II disminuyó la apoptosis (37).

En estos estudios se da diferente valor al papel del ECA en la generación de Ang-II, pero lo que sí parece claro es que las quimasas parecen ser primordiales en su formación. Además del bloqueo tradicional del SRA, utilizar como dianas terapéuticas otros elementos del SRA pueden ser estrategias altamente efectivas en la ND.

#### **- Aminopeptidasa A: La degradación de Ang-II**

Varios artículos han estudiado el efecto del bloqueo de la aminopeptidasa A en diferentes células renales en condiciones no diabéticas, incluidos los podocitos (155-157), pero no en el contexto de la ND.

#### **E.4. Efectos de la Angiotensina II sobre los podocitos en la Nefropatía Diabética**

Los altos niveles de Ang-II en el riñón adulto se han asociado con efectos deletéreos sobre la estructura podocitaria: alteraciones en el citoesqueleto y en moléculas del DF, alteraciones en su carga negativa superficial, apoptosis y posible TEM se encuentran entre las más importantes (21, 40, 158). *Figura 11.*

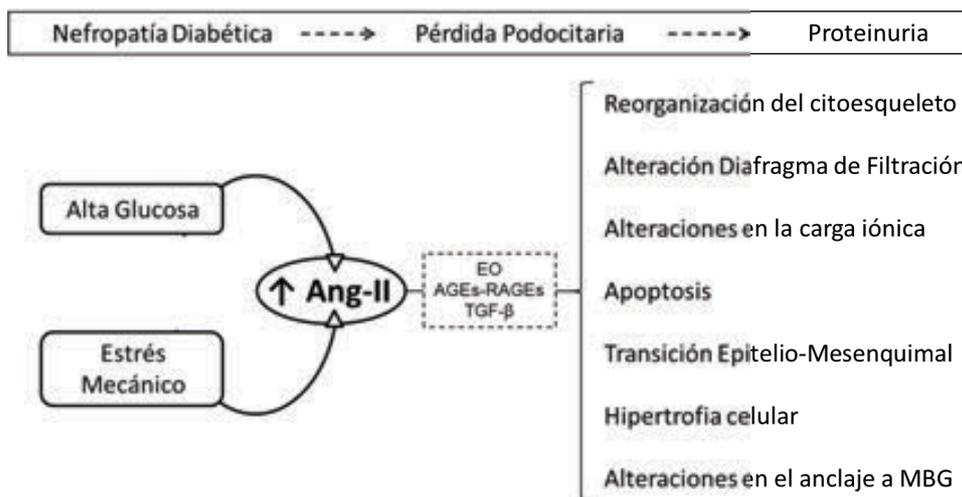


Figura 11. Diagrama del papel del SRA podocitario en la ND.

### - Alteraciones en el citoesqueleto

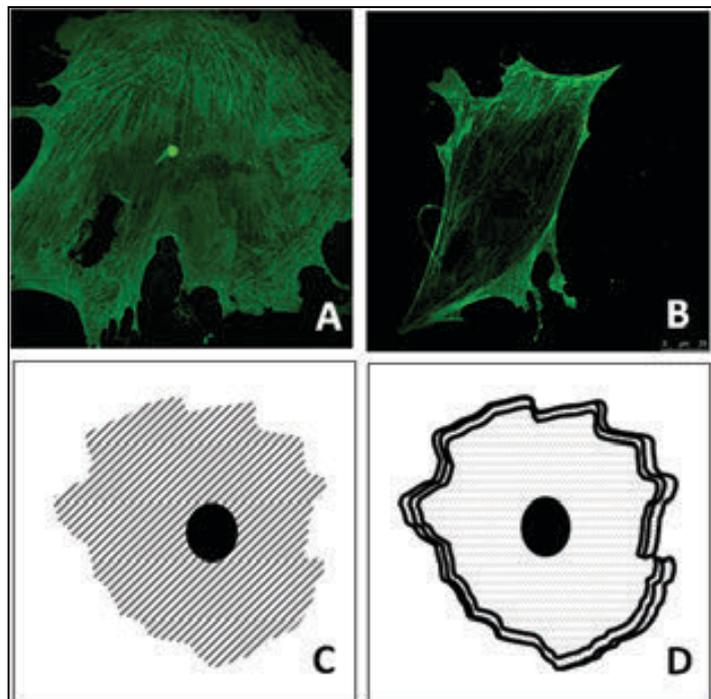
El citoesqueleto podocitario es una estructura dinámica necesaria para el mantenimiento de la estabilidad de la barrera de filtración glomerular oponiéndose a la elevada presión hidrostática requerida para la filtración glomerular fisiológica y en presencia de un estrés mecánico patológico (17). Alteraciones en esta estructura pueden llevar al desarrollo de proteinuria (159, 160).

La presencia de Ang-II en el medio de cultivo en una línea inmortalizada de podocitos de ratón provocó cambios en la disposición disposición cortical de las fibras de actina, con formación de estructuras anulares y atenuación de las fibras convencionales (161). Además se observó un aumento de la migración celular mediante un ensayo “wound-healing” (creación de una discontinuidad en la monocapa celular). Los autores hipotetizaron que variaciones en el citoesqueleto podrían ser un mecanismo adaptativo a la variaciones de las presiones de filtración secundarias, por ejemplo, a los cambios en la presión arterial. Un cambio más significativo en el citoesqueleto puede causar una disminución de la estabilidad podocitaria (161). *Figura 11.*

Otra evidencia del efecto de la Ang-II sobre la organización del citoesqueleto es la redistribución de la ZO-1 que se detecta claramente fragmentada y con menor intensidad que en los controles sin Ang-II (137). Estos cambios causan un incremento en la permeabilidad de la monocapa de podocitos, la preservación de la ZO-1 en su

ubicación adecuada fue paralela a una reducción significativa de la pérdida de albúmina a través de la monocapa (162).

Desde una perspectiva funcional varios estudios demuestran que los podocitos humanos no son capaces de modificar su forma en presencia de estrés mecánico cuando son incubados con Ang-II (163) o que tiene una mayor rigidez cuando son incubados con Ang-II (164). Estos cambios son un elemento muy interesante de estudio y profundizar ellos puede llevar a la detección de nuevas dianas terapéuticas o a la utilización de fármacos que estabilicen el citoesqueleto.



*Figura 11. Alteraciones en disposición del citoesqueleto de actina (imágenes superiores: IF; imágenes inferiores: representación esquemática). A y C: Situación normal. B y D: Alteración del citoesqueleto con formación del anillo periférico.*

### **- Alteraciones en el Diafragma de Filtración**

Un estudio de biopsias renales de pacientes con DM tipo 1 o 2 y que presentaban microalbuminuria o síndrome nefrótico, mostró una distribución granular con menor intensidad en la tinción comparado con un patrón lineal y punteado a lo largo de los capilares en los controles (31). Los autores concluyeron que las alteraciones en la

nefrina, que se observan ya en estados de microalbuminuria, parecen preceder a las lesiones glomerulares (31).

Un estudio focalizado en las alteraciones del citoesqueleto detectó que la nefrina disminuía en presencia de Ang-II y que niveles mayores de Ang-II llevaban a la práctica desaparición de la nefrina en los puntos de contacto entre pedicelos de podocitos vecinos. Estos cambios se acompañaban de un incremento en la permeabilidad a la albúmina de la monocapa de podocitos (162). Las alteraciones en la expresión de nefrina parecen prevenirse la incubación con un antagonista del AT1-R (165).

Las alteraciones a nivel de expresión génica y proteica de la nefrina se acompañan de una fusión segmentaria de los pedicelos. Además se detecta una correlación negativa entre la expresión de nefrina y la proteinuria, así como un incremento en los podocitos apoptóticos por glomérulo (41).

#### - Apoptosis (Figura 13)

En podocitos de rata la incubación con Ang-II produce apoptosis de modo tiempo y dosis dependiente; con las mayores concentraciones además induce necrosis. Este efecto está asociado con la activación de los receptores AT1-R y AT2-R (únicamente la inhibición de ambos previene la apoptosis) y con la expresión de TGF- $\beta$  (166). La Ang-II incrementa la expresión de Fas/FasL e induce la acumulación de Bax, ambos elementos pro-apoptóticos, probablemente a través de vías dependientes de AT1-R y AT2-R. Además se observa una disminución de Bcl-2, factor anti-apoptótico, dependiente de AT1-R (166).

Otra vía de inducción de la apoptosis por Ang-II es la activación de vías dependientes de ERK (extracellular signal-regulated kinase) que causan una translocación del factor de transcripción NF $\kappa$ B que facilita la sobre-regulación de TRCP6, aumentando la concentración intracelular de calcio (167).

Recientemente Sanchez-Niño *et al.* estudiaron la apoptosis podocitaria por Ang-II y su relación con la HSPB1 (*heat shock protein B1*, proteína con efecto protector que es rápidamente sintetizada en respuesta a estrés ambiental). Detectaron un aumento de la HSPB1 en respuesta a la Ang-II. La inhibición de la HSPB1 promovía la apoptosis inducida por Ang-II vía activación de caspasa-3/9. En base a estos resultados, planteaban la hipótesis de que la sobre-expresión de HSPB1 en presencia de Ang-II es una respuesta adaptativa para prevenir la apoptosis inducida por Ang-II (168).

### - Transición epitelio-mesenquimal

Los trabajos presentados en anteriores puntos de la introducción sugieren que se podría considerar la TEM como una causa del despegamiento de los podocitos. Desde el momento en que Ang-II en la ND eleva los niveles de TGF- $\beta$ 1, principalmente con un incremento de estrés oxidativo (37, 40, 158, 169), la TEM puede ser considerada un posible mecanismo de lesión podocitaria por la Ang-II y por tanto susceptible de modulación farmacológica.

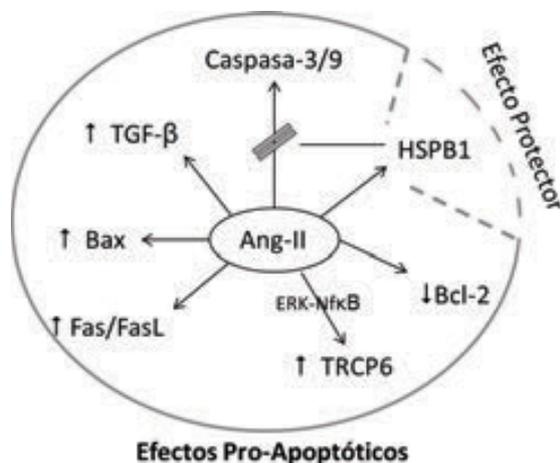


Figura 13. Esquemización de los efectos de la Ang-II sobre las vías de apoptosis.

### - Cambios en la carga aniónica superficial

Un estudio desarrollado en podocitos humanos mostró que el estímulo con Ang-II provoca una relativa disminución de los proteoglicanos en el medio extracelular y un incremento de los mismos en el sobrenadante del cultivo celular. Este trabajo se centra en el estudio de un proteoglicano en concreto, la agrina, detectando una reducción de su expresión proteica en los extractos celulares (170).

### **- Otros cambios podocitarios relacionados con la Ang-II en la ND**

Alteraciones en este dominio basal de la célula secundarias a la Ang-II conducen al despegamiento podocitario (53, 54). Utilizando ratones transgénicos con una delección selectiva en el podocitos de la  $\beta 1$  integrina, se observó que la pérdida de esta proteína en el podocito deriva en borramiento pedicelar y pérdida podocitaria sin cambios en la nefrina, podocina o CD2AP. Estos ratones desarrollaron proteinuria masiva y fallo renal terminal (55).

## II. HIPÓTESIS

En la nefropatía diabética existe una activación de la expresión del SRAA sistémico e intrarrenal. El ambiente hiperglucémico propio de esta patología favorece un desequilibrio en este sistema que conlleva un acúmulo de Ang-II con efectos deletéreos. Dado que una de las principales funciones del ECA2 es degradar la Ang-II a Ang-(1-7), con efectos opuestos a la Ang-II, se plantea la hipótesis de que deben existir variaciones en su presencia y función en una situación de DM no controlada.

A pesar de constituir un modelo de gran interés al reproducir una DM tipo 1 muy similar a la humana, los **ratones NOD** no han sido estudiados profundamente en lo relativo al desarrollo de la ND y su evolución con el tratamiento con insulina. Aunque se han publicado numerosos trabajos sobre el ECA2 en la ND, su presencia en este modelo de DM tipo 1 no ha sido estudiada en profundidad. Se plantea la hipótesis de que en los ratones NOD diabéticos existen alteraciones renales que se modifican con un correcto control glucémico con insulina. Además se hipotetiza que la expresión y actividad de ECA2 sistémico y renal en el animal DM no controlado se modula al tratarlo con insulina.

Los **podocitos** son células clave en el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular y su pérdida es fundamental en la evolución de la ND. Un correcto control de la glucemia, por ejemplo a través del tratamiento con insulina, previene la evolución de esta patología. Al igual que en los modelos animales, existe una hiperactivación del SRAA en estas células en situación de DM. Por tanto se plantea que la insulina ejerce un papel directo sobre la modulación del SRAA del podocito. Finalmente, y dado el papel patogénico de la albuminuria *per se* en el desarrollo de la ND, hipotetizamos que la interacción de la misma con la acción de la insulina puede modificar el comportamiento podocitario.

### **III. OBJETIVOS**

#### **A. OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS *in vivo***

- Estudiar la función y morfología renales en el ratón diabético NOD inicialmente no tratado y después de la normalización de la glucemia mediante la administración de insulina.

- Estudiar la ECA2 intrarrenal, circulante y urinaria en el ratón diabético NOD y su caracterización tras la normalización de la glucemia mediante la administración de insulina.

#### **B. OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS *in vitro***

- Estudiar la ECA2 intrapodocitaria en una línea inmortalizada de estas células procedentes de ratón y la influencia directa de la insulina, en presencia o no de albúmina.

- Estudiar la influencia directa de la insulina, en presencia o no de albúmina, sobre la expresión génica de otros elementos del SRAA podocitario.

- Estudiar la influencia directa de la insulina, en presencia o no de albúmina, sobre la apoptosis celular podocitaria.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. ESTUDIOS EN MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES

#### A.1. Modelo Experimental Animal y Grupos experimentales

Se han utilizado ratones hembra NOD/ShiLt para las intervenciones y ratones hembra NOR/LtJ como controles (Jackson Laboratory, Bar Harbor ME, USA) que se han criado en el estabulario del nuestro centro (PRBB) en zona libre de patógenos. *Figura 14.*



*Figura 14: Izquierda: Ratón NOD. Derecha: Ratón NOR. Fuente: The Jackson Laboratory Database.*

Los ratones NOD desarrollan de modo espontáneo una DM autoinmune por mediación de células T bajo un complejo control poligénico presentando, por ejemplo, alteraciones a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad iguales a las encontradas en humanos (171, 172). La penetrancia de los diferentes genes que participan en la diabetogénesis está muy influida por factores del entorno, característicamente la estimulación del sistema inmune del ratón por patógenos ambientales conlleva el desarrollo de un sistema inmune normal. Por ello los ratones deben ser criados en un ambiente libre de patógenos muy estricto (173). Otra peculiaridad de esta cepa consiste en que las hembras desarrollan una insulinitis más invasiva y destructiva que los machos, por lo que existe una mayor incidencia de DM en hembras que en machos (80-90% vs 10-40% a las 30 semanas de vida) y por este motivo los experimentos se llevan a cabo en hembras (171).

Los ratones se ubicaron en cajas ventiladas individualmente con libre acceso a comida y agua. El *Comité Institucional de Cuidado Animal* aprobó los procedimientos según las Guías Españolas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Se obtuvieron muestras para glucemia capilar se obtuvieron de la vena safena mediante el Accu-Check Compact Plus (Roche) y se realizaron determinaciones cada 2 semanas a partir de la semana 10 de vida. La aparición de diabetes se definió como nivel sanguíneo de glucosa mayor de 250 mg/dl en dos determinaciones consecutivas con un intervalo mínimo de 48 horas. Los ratones diabéticos se asignaron aleatoriamente a dos grupos: grupo de tratamiento o grupo de no intervención. El seguimiento se realizó durante 21 días o 40 días tras el diagnóstico de diabetes, siendo los primeros los denominados estadio precoz y los segundos estadio tardío. Por tanto, en cada uno de los tiempos los estudios se desarrollaron en 3 grupos experimentales (*Figura 15*):

- Grupo 1 (NOR, n=8): Ratones de la cepa NOR como controles no diabéticos.
- Grupo 2 (NOD, n=8): Ratones de la cepa NOD diabéticos sin control glucémico.
- Grupo 3 (NOD+Insulina, n=6): Ratones de la cepa NOD en los cuales se ajustan las glucemias sanguíneas por debajo de 250 mg/dl mediante el uso de uno o dos implantes subcutáneos de insulina, Linbit® (LinShin Canada Inc). La liberación progresiva es de 0,1 U Insulina/24 h/implante.



*Figura 15: Grupos experimentales animales del estudio.*

A los 21 o 40 días del inicio de la diabetes y de la intervención terapéutica se procede al sacrificio, previa sedación del animal con pentobarbital intraperitoneal, y a la extracción de las muestras para estudio. Los procedimientos realizados en este punto fueron:

- Peso corporal total y peso de los riñones extraídos.
- Sangre: Análisis de la glucemia capilar de la vena safena (valores expresados en mg/dl) y para obtención de suero y plasma.
- Orina: Obtenida a partir de un masaje abdominal.
- Riñón: Se obtuvieron después de una perfusión total del animal con PBS. La mitad de uno de los riñones se fija en una solución de formalin (formaldehído 4%) tamponada al 10% con pH neutro y se procesa para inclusión en parafina. Una pequeña porción de riñón es fijado en glutaraldehído para análisis mediante microscopía electrónica. El resto del tejido renal se congela en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C para realizar extractos proteicos.

## **A.2. Medida de la excreción urinaria de albúmina**

La excreción urinaria de albúmina (EUA) se midió en muestras puntuales de orina obtenidas mediante masaje abdominal. Los niveles de albúmina se determinaron mediante un kit comercial de ELISA (Albuwell M, Exocell) y los niveles de creatinina mediante método colorimétrico utilizando un kit comercial (Creatinine Companion, Exocell). Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de albúmina / mg creatinina.

## **A.3. Medición de la Presión Arterial**

Para la medida de la PA se utilizó el método del manguito en la cola del ratón (*tail-cuff*, CODA, Kent Scientific Corporation). Se realizaron las mediciones en ratones conscientes y entrenados durante 5 sesiones consecutivas, siempre por la mañana durante la semana previa al sacrificio. Los resultados se expresan en mmHg. *Figura 16.*



*Figura 16: Izquierda: Visión general del sistema CODA para medición de la PA con la plataforma que mantiene una temperatura constante de 32°C y 2 inmovilizadores donde se habitúan los animales para las mediciones. Derecha: Imagen de un sistema de medición con un ratón en su interior y en detalle los manguitos que se colocan en la cola del animal.*

#### **A.4. Medida del Filtrado Glomerular mediante Aclaramiento de Inulina**

El Filtrado Glomerular se midió mediante el aclaramiento de inulina marcada con FITC que es fluorescente (FITC-inulina) tras un bolus único (174). En el animal anestesiado se inyectaron 3,74  $\mu\text{l/gr}$  de peso de una solución dializada de FITC-inulina al 5% en suero fisiológico. La inyección fue en la vena caudal del ratón y posteriormente se realizaron extracciones de 30  $\mu\text{l}$  de sangre de la vena safena en los minutos 3, 7, 10, 15, 35, 55 y 75 tras la inyección.

La fluorescencia plasmática se determinó usando un fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments). Los valores de la fluorescencia se ajustaron a una curva de descenso exponencial en 2 fases usando una regresión no lineal mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). El FG se calculó como ya se ha descrito en la literatura (175) y los resultados se expresan en  $\mu\text{l}$  de FITC-inulina/minuto.

#### **A.5. Morfología Renal. Estudios de tamaño glomerular y conteo de podocitos.**

Los riñones incluidos en parafina se cortaron con micrótopo con un grosor de 4  $\mu\text{m}$ , desparafinados en xilol y rehidratados tras inmersión en etanol en gradación creciente. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E) y ácido periódico de Schiff (PAS) con el objetivo de analizar la presencia de lesiones relacionadas con la diabetes.

Por otro lado se valoró la hipertrofia glomerular en los cortes teñidos con PAS mediante la medida del área de aquellos glomérulos en que se observaba el polo vascular, para evitar cortes tangenciales. Las fotografías se realizaron utilizando un microscopio Olympus BX61 y las mediciones mediante el software Image J.

Se realizó también una tinción para WT-1 (Anticuerpo policlonal de conejo, dilución 1:250, Tebu-Bio) para el marcaje de los núcleos podocitarios con el objetivo de contabilizar el número de podocitos por glomérulo. Se realizó una contratinción con Hematoxilina para contar el resto de células en cada glomérulo. El conteo fue ciego y lo realizaron 3 observadores diferentes. Los resultados se expresan en % de podocitos en cada glomérulo.

## **B. ESTUDIOS EN CÉLULAS EPITELIALES GLOMERULARES (PODOCITOS)**

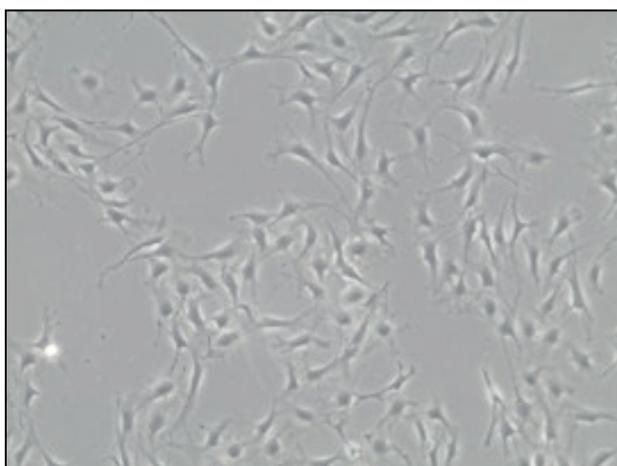
### **B.1. Cultivo Celular**

Los estudios celulares se realizaron utilizando una línea celular inmortalizada de podocitos de ratón. La generación de esta línea celular se realizó a partir de los glomérulos aislados del Inmortomouse<sup>®</sup>. Este ratón se caracteriza por poseer un oncogen (SV40 TAg: simian virus 40 large tumor antigen) que permite que todas las células de su organismo sean inmortales. Este oncogén está regulado de dos modos: es termo-sensible y está bajo control de un promotor inducible de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (20, 176). Esta línea celular se caracteriza por presentar dos fases claramente diferenciadas durante su cultivo: una inicial de proliferación que se produce en condiciones permisivas, en presencia de IFN- $\gamma$  a 32°C, y posteriormente una fase de diferenciación en condiciones no permisivas, sin IFN- $\gamma$  y a 37°C en la que van adquiriendo el fenotipo característico comparable al que presentan *in vivo*. Además, dada su “inmortalidad” estas células mantienen sus características diferenciales durante un número elevado de pases, siendo ésta otra de sus principales ventajas respecto a otras líneas celulares (20, 177).

Las células se encontraban congeladas en crioviales de 1 ml en tanques criogénicos a -150°C. Se descongelaban resuspendiendo el volumen total del vial en 9ml de medio de RPMI a 37°C con 10% de suero fetal bovino (FBS Gold inactivado durante 30 minutos a 56°C, PAA Laboratories GmbH) a 37°C. Posteriormente se realizó

una centrifugación a 380G durante 5 minutos y el pellet resultante se resuspendió en 10ml de medio de cultivo, con las condiciones que se indican a continuación, y se sembraron en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>.

Los primeros 3-5 días tras la descongelación las células proliferaron en una incubadora (95% aire/5% CO<sub>2</sub>) bajo condiciones permisivas: a 32°C en presencia de IFN- $\gamma$  de origen murino (50UI/ml los 2 primeros pases y 25UI/ml los subsiguientes, Life Technologies Corporation). Durante este periodo el medio de cultivo utilizado fue RPMI conteniendo un 10% de FBS; 100UI/ml de penicilina con 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina y 2mM de glutamina (todos de PAA Laboratories GmbH). *Figura 17.*



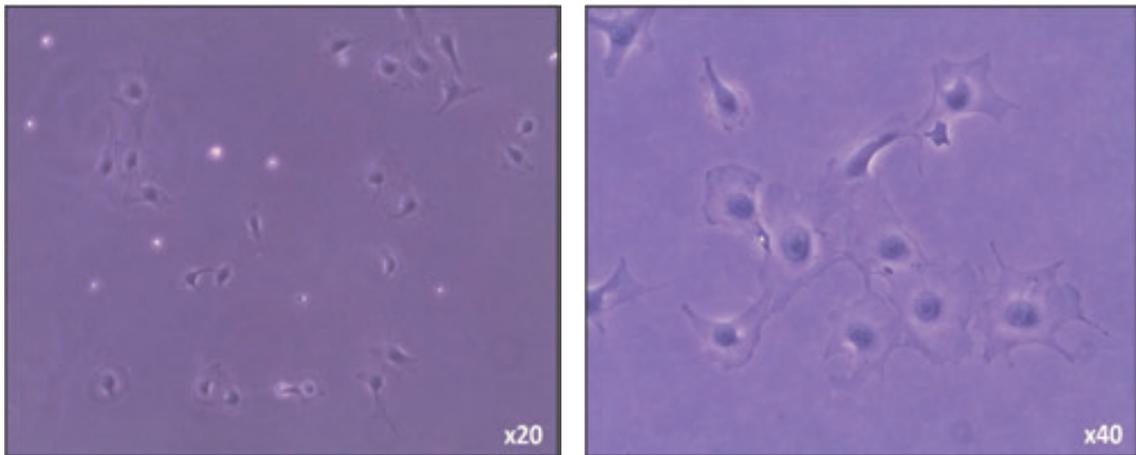
*Figura 17: Cultivo de podocitos en condiciones permisivas (32°C, en presencia de IFN- $\gamma$ ).*

Cuando las células presentaban una confluencia del 80-95% se tripsinizaron con 1ml de tripsina-EDTA (0,5 mg/ml y 0,22 mg/ml respectivamente, PAA Laboratories GmbH) durante menos de 1 minuto y el efecto se revirtió añadiendo 9ml de RPMI con un 10% de FBS. Se realizó una centrifugación 380G durante 5 minutos y se realizaron 3 lavados del pellet con PBS atemperado (Phosphated-Buffer Saline, PAA Laboratories GmbH). Tras el último lavado se resuspendió el pellet en 5ml de medio y se realizó un conteo celular utilizando una cámara de conteo de Neubauer.

En ese momento las células se sembraron en placas de petri de 100mm de diámetro (135.000 células por placa) y se indujo la diferenciación celular durante 14 días en condiciones restrictivas (ausencia de IFN- $\gamma$  a 37°C) en una incubadora con 95% aire/5% CO<sub>2</sub>. En esta situación la proliferación se reduce muy significativamente y las

células van adquiriendo progresivamente las características morfológicas de los podocitos diferenciados *in vivo*. Durante este proceso de diferenciación las células fueron cultivadas en medio DMEM con una concentración de glucosa estándar (5mM) conteniendo 1% de FBS Gold, 100UI/ml penicilina con 100µg/ml estreptomicina, 2mM de glutamina y 0.1mM de piruvato sódico (todos ellos de PAA Laboratories GmbH). Durante estos días se realizó cambio de medio de cultivo cada 72 horas.

Evolución de la morfología celular durante el proceso de diferenciación: Destaca el progresivo incremento del tamaño citoplasmático, así como el desarrollo de procesos de interdigitación, siendo estos los puntos de contacto entre los mismos. Al finalizar la diferenciación observamos células planas de gran citoplasma, uni o binucleadas, arborizadas y con prominentes procesos interdigitados con las células vecinas (177).  
*Figuras 18 a 22.*



*Figura 18: Día 2 de diferenciación.*

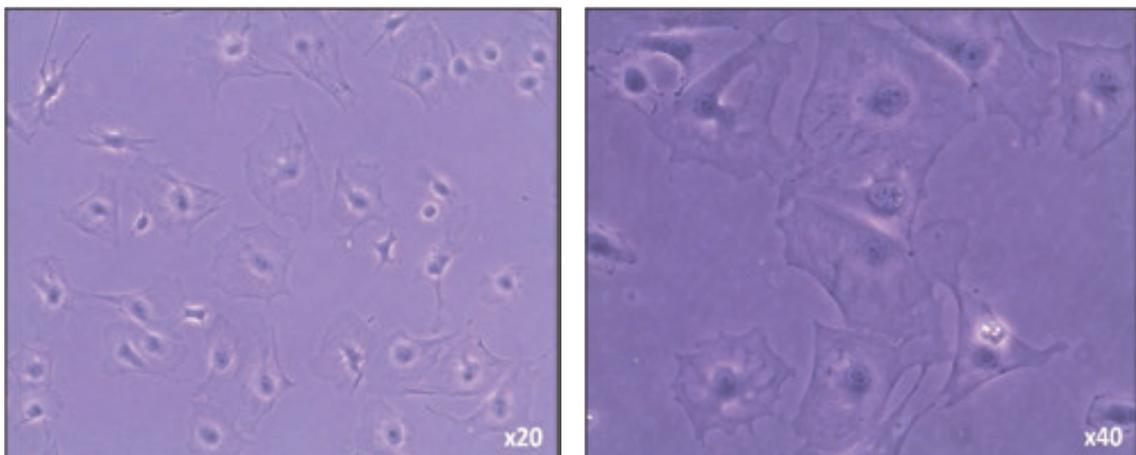


Figura 19: Día 5 de diferenciación.

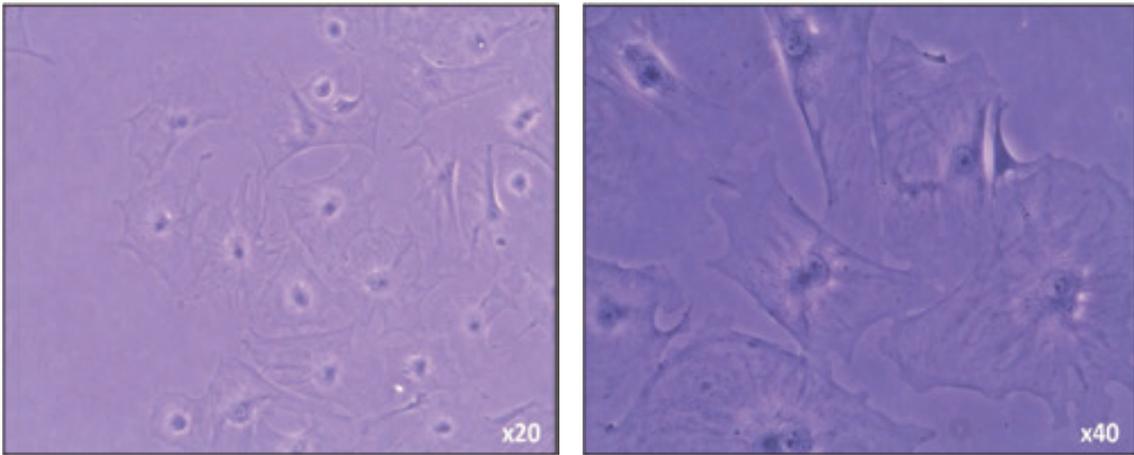


Figura 20: Día 7 de diferenciación.

En ambos procesos, proliferación y diferenciación, las células fueron cultivadas en frascos o placas con una cobertura de colágeno tipo-I a una concentración de  $50\mu\text{g/ml}$  (BD Bioscience) en ácido acético  $0,2\text{N}$ .

El día 12 de diferenciación se cambió el medio de cultivo retirando el FBS, denominado periodo de *starvation* (*inanición*). Tras 24 horas se realizó la incubación con insulina del siguiente modo: se modificó el medio de cultivo utilizando DMEM con alta concentración de glucosa ( $25\text{mM}$ ) y añadiendo insulina (concentración final:  $100$  o  $200\text{nM}$  según experimentos) y/o albúmina ( $10\text{mg/ml}$  de albúmina de suero bovino, Applichem) durante 1 hora, 24 horas o 48 horas dependiendo del experimento. Se realizó un grupo control para cada situación temporal. En cada grupo el número de experimentos fue al menos de  $n = 5$ .

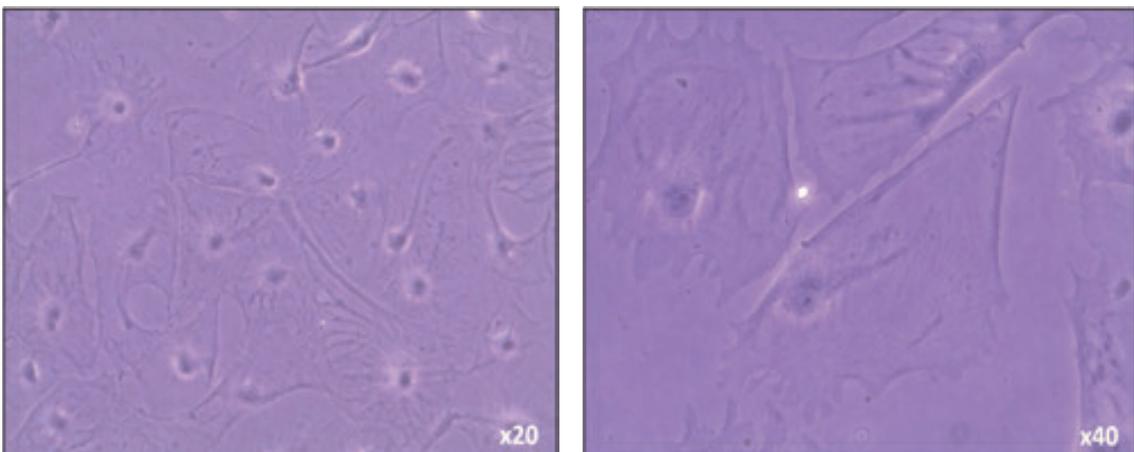


Figura 21: Día 12 de diferenciación.

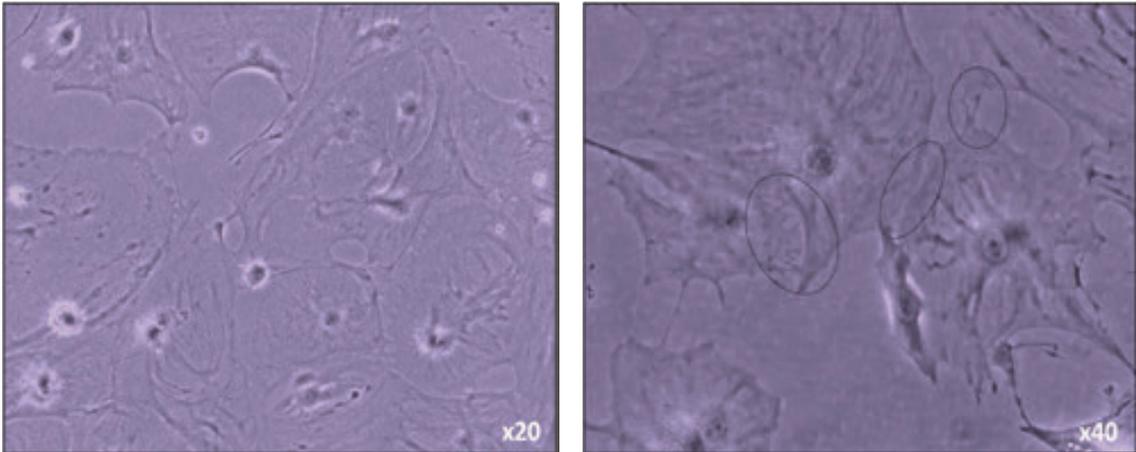


Figura 22: Día 14 de diferenciación.

## C. TÉCNICAS ESPECÍFICAS

### C.1. Western Blot

El Western Blot (WB) es una técnica utilizada para detectar proteínas en una muestra determinada. Las proteínas, una vez desnaturalizadas y negativizada su carga, se separan mediante electroforesis en un gel de acrilamida en función de su peso molecular. Posteriormente estas proteínas son transferidas a una membrana adsorbente utilizando una corriente eléctrica. Para detectar la proteína a estudio se utilizan anticuerpos específicos y se detecta su presencia mediante métodos fluorescentes.

Figura 23.

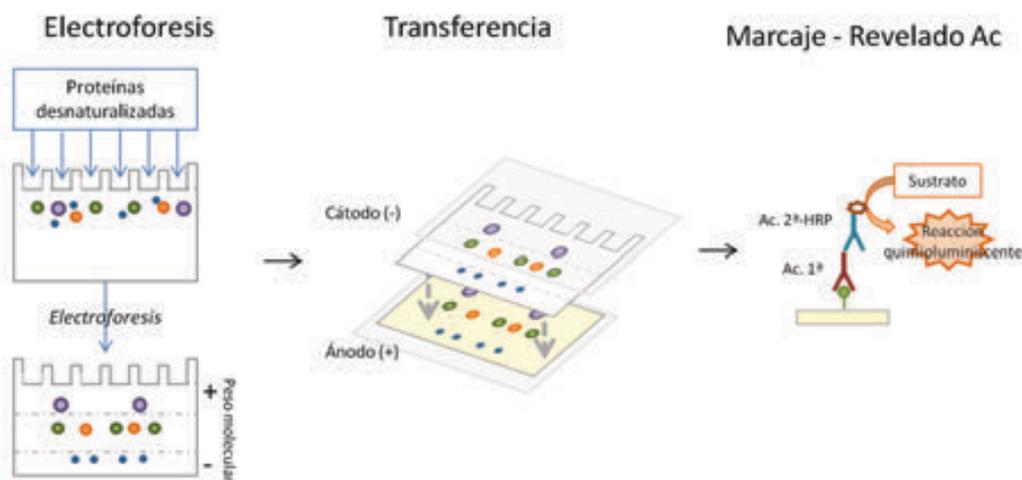


Figura 23: Figura esquemática del proceso de un WB.

El WB se realizó utilizando una técnica estándar:

- Preparación muestras:

- Células: Se lavaron con PBS frío (x2), se levantaron de la superficie de cultivo mediante un rascador con una solución tamponada (buffer) para la lisis celular que contenía 50mM Tris-HCl pH 6,8, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM Pefabloc SC Plus y un coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA (ambos de Roche) y un 1% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich).

- Tejido renal: Éste se encontraba congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se tomó una muestra de córtex renal que se homogenizó con el mismo buffer que el utilizado en células.

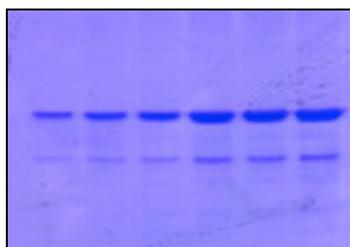
Los homogenizados, de células o tejido, se clarificaron mediante centrifugación a 14000G durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración proteica de los sobrenadantes fue determinada mediante un kit comercial: Micro BCA Assay Kit (Thermo Scientific), utilizando albúmina de suero bovino para la curva patrón.

Se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína en las muestras celulares y 15  $\mu\text{g}$  de proteína en el caso del córtex renal. Las proteínas se desnaturalizaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos diluidas en un tampón de carga compuesto por: 21mM TrisHCl a pH 6,8, 20% SDS, 34% glicerol, 19% beta-mercaptoetanol y azul de bromofenol.

- La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%.

- Las muestras se transfirieron a una membrana mediante un sistema de transferencia húmeda (Bio-Rad) con un buffer con alta concentración de glicina y baja de etanol que favorecía la transferencia en estas muestras. Se utilizó una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Science) que requiere activación previa con metanol.

- La eficacia global de la transferencia se comprobó tiñendo la membrana con Rojo Ponceau y el gel con Azul de Coomassie, tinciones que marcan las proteínas transferidas a la membrana o que persisten en el gel. *Figura 24.*

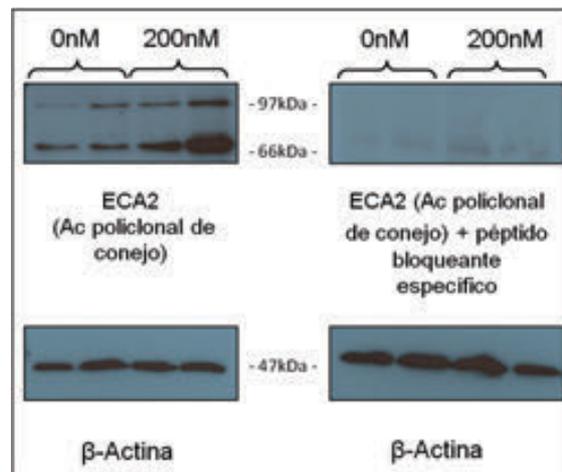


*Figura 24: Izquierda: Gel teñido con Azul de Coomassie mostrando las bandas proteicas. Derecha: Membrana teñida con Rojo Ponceau mostrando una correcta transferencia proteica.*

- Las membranas se incubaron durante 30 minutos con una solución de bloqueo compuesta por leche desnatada al 2,5% en TBS (Tris-buffered saline; PAA Laboratories GmbH) con un 0,2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) para bloquear los sitios de unión inespecíficos libres de la membrana.

- Posteriormente se procedió a la incubación y agitación, durante 16 horas a 4°C, con un anticuerpo (Ac) policlonal tipo IgG de conejo contra ECA2 (ab15347, Abcam) con una dilución en solución de bloqueo de 1:2000. Tras 3 lavados de la membrana con TBS-T se realizó la incubación con el Ac secundario anti-conejo conjugado con una peroxidasa (Sigma) con una dilución de 1:3000.

La especificidad del Ac primario contra ECA2 se confirmó realizando una pre-incubación de varias de las muestras con un péptido bloqueante específico del Ac utilizado y observando que la señal desaparecía. *Figura 25.*



*Figura 25: Izquierda: Marcaje con Ac primario ECA2. Derecha: Las mismas muestras incubadas con Ac primario y el péptido bloqueante específico mostrando la desaparición de la señal indicando la especificidad del marcaje.*

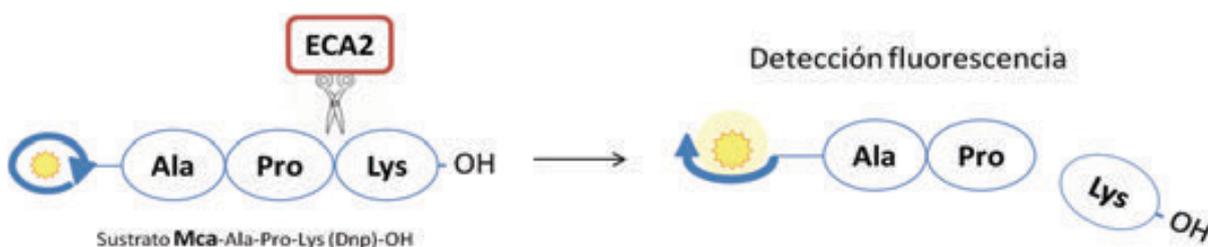
- Como control de la carga proteica, todas las membranas se incubaron con un Ac monoclonal de ratón anti- $\beta$ -actina a una concentración de 1:4000 (A1978, Sigma).

- Las proteínas se detectaron en películas fotosensibles (X-Ray Film, AGFA) mediante quimioluminiscencia (ECL Plus, GE Healthcare Life Science).

- El análisis densitométrico de las bandas proteicas se realizó utilizando el software Image J. Los resultados se expresan en cociente ECA2/ $\beta$ -actina.

## C.2. Actividad enzimática de ECA2

La medición de la actividad enzimática del ECA2 se realiza mediante un ensayo fluorométrico usando un sustrato específico para ECA2: Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Enzo Life Sciences) (112, 178). Cuando el enzima hidroliza el sustrato se produce la externalización de la fluorescencia pudiendo medirse y por tanto calcularse la actividad del enzima. *Figura 26.*



*Figura 26: Representación esquemática del proceso del ensayo para medición de la actividad enzimática de ECA2.*

El proceso del ensayo presenta variaciones en función de la muestra a estudiar:

- Suero y orina: Un total de 5  $\mu$ L de suero o 0,2  $\mu$ L de orina se incubaron con un buffer específico optimizado para el ensayo consistente en: 100mM Tris-HCl con pH 7,5, 600mM NaCl y 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> en presencia de inhibidores de proteasas incluyendo: 100  $\mu$ M captopril, 5  $\mu$ M amastatina, 5  $\mu$ M bestatina (todos de Sigma-Aldrich) y 10  $\mu$ M de Z-Pro-prolinal (Enzo Life Sciences).

- Las muestras se incubaron con 20  $\mu$ M del sustrato fluorogénico (volumen final de la reacción: 100  $\mu$ L) durante 16 horas a 37°C.

- Los resultados se expresan en unidades relativas de fluorescencia por  $\mu$ l de muestra y por horas de incubación (RFU/ $\mu$ g/h).

- Córtex renal: Muestras de córtex renal congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se homogenizaron en un buffer consistente en: 50 mM HEPES con pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 y 0,025 mM  $\text{ZnCl}_2$  junto con inhibidores de proteasas (0,1 mM Pefabloc SC Plus y un coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA, ambos de Roche). Los homogeneizados se clarificaron mediante centrifugación a 14000G durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración proteica de los sobrenadantes fue determinada mediante Micro BCA Assay Kit (Thermo Scientific). Se utilizaron 0,5  $\mu\text{g}$  de proteína total para el ensayo por duplicado.

- Las muestras tisulares se incubaron con un buffer con las mismas características que el utilizado en suero y orina. Para confirmar la especificidad de la señal un inhibidor específico del ECA2, MLN-4760 (Millennium Pharmaceuticals), se añadió para sustraer la actividad inespecífica no relacionada con ECA2.

- Posteriormente se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  de sustrato fluorogénico (volumen final de la reacción: 100  $\mu\text{L}$ ) durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia por  $\mu\text{g}$  de proteína y por horas de incubación (RFU/ $\mu\text{g}/\text{h}$ ).

- Muestras celulares: Las células se lavaron con PBS frío (x2), se levantaron de la superficie de cultivo mediante un rascador con un buffer HEPES de las mismas características utilizadas para el estudio del córtex renal. Los homogeneizados celulares se clarificaron mediante centrifugación a 14000G durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración proteica de los sobrenadantes se determinó mediante Micro BCA Assay Kit (Thermo Scientific). Para la realización del ensayo se utilizaron 6  $\mu\text{g}$  por muestra en cuadruplicado.

- Las muestras se incubaron con el buffer específico del ensayo. Para confirmar la especificidad de la señal se añadió como control negativo en la mitad de las réplicas un quelante del calcio que inhibe la actividad de ECA2, con el mismo poder inhibidor que el MLN-4760 en el caso de la actividad en podocitos.

- A este buffer se añadió el sustrato fluorogénico a una concentración final de 5 $\mu\text{M}$  con un volumen total de la reacción de 100  $\mu\text{L}$ . La actividad enzimática se determinó tras 6 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Los resultados se expresan en unidades relativas de fluorescencia por  $\mu\text{g}$  de proteína y por horas de incubación (RFU/ $\mu\text{g}/\text{h}$ ).

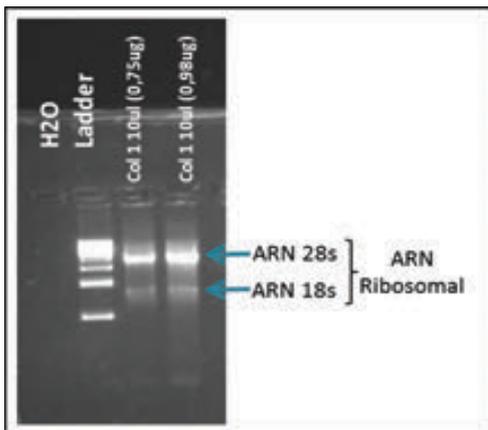
En todos los casos la fluorescencia se detectó por un fluorímetro (Tecan Infinite 2000 plate reader, TECAN Instruments) con una longitud de onda de excitación de 320 nm y de emisión de 400 nm.

*Figura 27 : Gel de agarosa con 2 muestras de ARN del mismo volumen, pero diferente cantidad de RNA (0,75 µg y 0,98 µg).*

### C.3. Aislamiento de ARN y cuantificación

La purificación de ARN total de las células en cultivo se realizó utilizando un kit comercial RNeasy Mini-kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lisaron con un buffer con una alta concentración de tiocianato de guanidinio, posteriormente se añadió etanol al 70% al homogenizado y la muestra se colocó en las columnas RNeasy® del kit que retienen el ARN. Después se añadió un buffer astringente para limpiar biomoléculas (proteínas, carbohidratos...) que pueden estar unidas a la membrana de la columna de modo no específico. Posteriormente se añadió un buffer con alta concentración de etanol para eliminar los posibles restos de sales. Tras realizar una última centrifugación para eliminar cualquier resto de los buffer utilizados, se añadieron 30 µl de agua RNasa-free a la columna para eluir el ARN.

La cantidad de ARN de cada muestra se midió mediante espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Su integridad fue comprobada en un gel de agarosa. *Figura 27.*

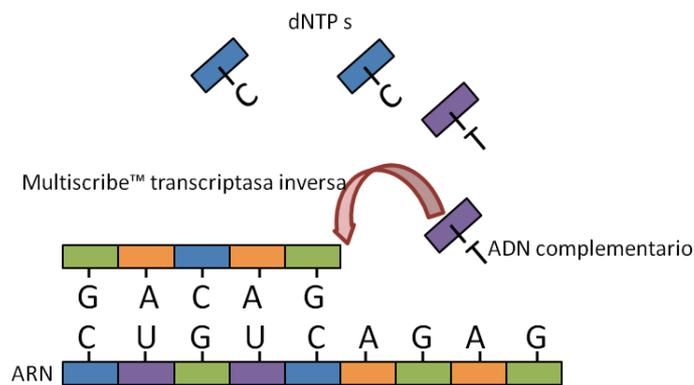


### C.4. Retrotranscripción

El ADN complementario se obtuvo por retrotranscripción (RT) a partir de 0,5 µg del ARN extraído utilizando un kit comercial: High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit (Life Technologies). Brevemente, con un volumen final de la reacción de 20 µl se mezcló el ARN con 10 µl de la RT Master Mix 2x (tampón para RT, cebadores aleatorios, mezcla de dNTP, transcriptasa inversa Multiscribe™ e inhibidores de RNAsas). *Figura 28.*

La RT se realizó en una termo-cicladora (TProfessional Basic, Biometra) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y a 85°C durante los últimos 5 minutos.



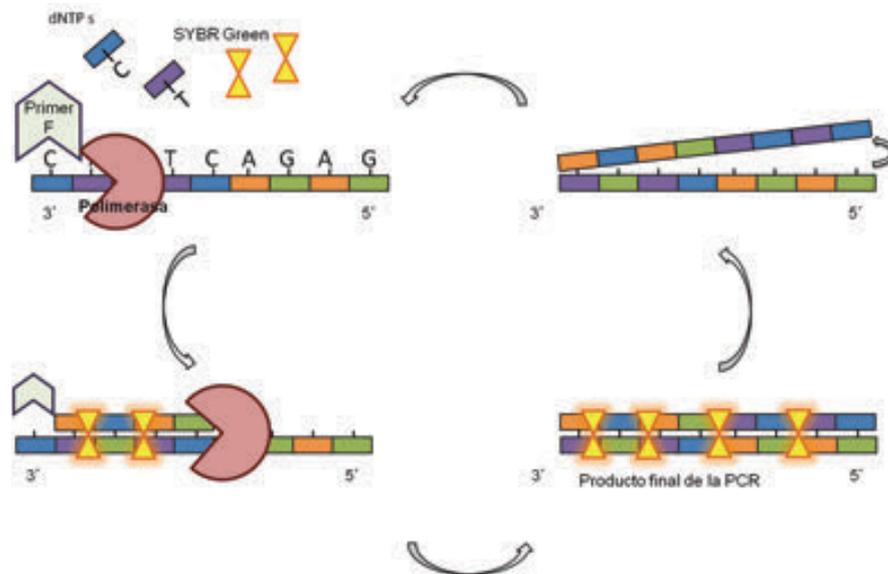
*Figura 28: Visión esquemática del proceso de retrotranscripción*

### C.5. PCR cuantitativa

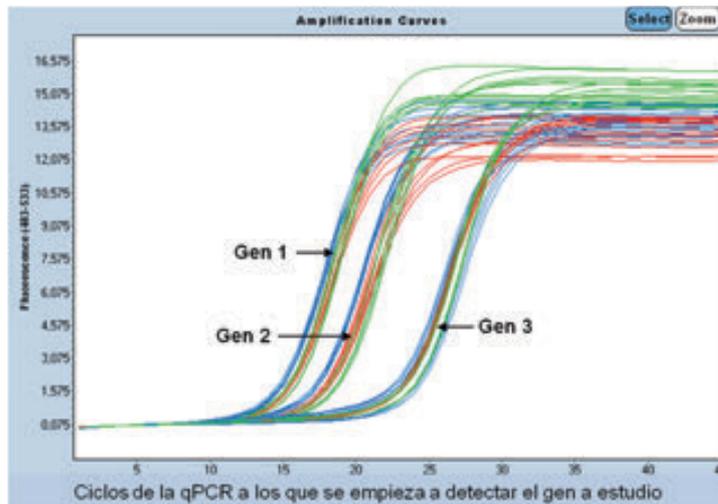
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que nos permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en concreto. Para ello es necesaria una muestra de ADN, los cebadores del gen a estudio, dNTPs para hacer las copias de las nuevas cadenas de ADN y un enzima, la Taq polimerasa, consiguiéndose así que se sintetice la cadena de ADN complementaria a la muestra. Cada uno de estos ADN de doble cadena se desnaturaliza y sufre el mismo proceso. Esto ocurre durante todos los ciclos de la PCR obteniéndose así un número de copias exponencial. La PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) es una variación de la PCR convencional que permite que cada doble cadena de ADN emita una señal fluorescente, así en cada ciclo de amplificación se puede detectar el incremento de fluorescencia que correlaciona con el incremento de copias del producto de amplificación.

La qPCR para amplificar el ADN complementario obtenido de los cultivos celulares se realizó mediante el sistema LightCycler 480 SYBR Green System®

(Roche). Este sistema utiliza para la detección de las copias el SYBR Green I que se intercala en el ADN de doble cadena que es el producto de PCR que se va generando durante los ciclos de la misma. *Figuras 29 y 30.*



*Figura 29. Visión esquemática de un ciclo de PCR utilizando SYBR Green como marcador de producto de PCR. Se muestra sólo un proceso de una cadena reversa.*



*Figura 30. Ejemplo de resultado mostrando la curva de detección del producto de la PCR cuantitativa.*

Se utilizó SYBR Green Master Mix y cebadores específicos de cada gen (secuencias posteriormente, *Tabla 4*) con una concentración final en todos de 250nM. La amplificación se realizó en 45 ciclos.

Como gen control se utilizó la  $\beta$ -Actina. Los resultados se expresan en ratio gen/ $\beta$ -Actina.

Gen	Secuencia (5' - 3')
<b>Agt</b>	Forward CGTGCCCCTAGGTGAGAGAG Reverse TCCAAGTCAGGAGGTCGTTC
<b>ECA2</b>	Forward ACCCTTCCTACATCAGCCCCACTG Reverse TGTCCAAAATCTACCCACATAT
<b>ECA</b>	Forward CGCCGCTATGGGGACAAATA Reverse ATGTCTCCCAGCAAATGGGC
<b>AT1-R</b>	Forward TACGAGTCCCGGAATTCAAC Reverse AGGAAGCCCAGGATGTTCTT
<b>AT2-R</b>	Forward TTTGGCTACCCTCCCTCTCT Reverse CACAGGTCCAAAAGCCAAT
<b>Fbn</b>	Forward GCACAGACCATGCGGTTTTG Reverse GGCACAGAGCACCATTGGAA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Forward TGAGTGGCTGTCTTTTGACG Reverse AGCCCTGTATCCGTCCT
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Forward GTCCACACCCGCCACCAGTTTCG Reverse GGAGCCGTTGTTCGACGACCA

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados.

## C.6. Tinción de Inmunofluorescencia

Para la diferenciación la siembra de podocitos se realizó sobre cubre-objetos esterilizados con una cobertura de colágeno tipo I. Tras la diferenciación y la intervención correspondiente las células se permeabilizaron con metanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tras realizar 2 lavados con PBS frío se incubaron con una solución al 5% de BSA en PBS conteniendo un 0.1% Tween-20 sobre hielo. Después se realizó una incubación con el Ac primario durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de 2 lavados con PBS y la incubación con el Ac secundario correspondiente (Tabla 5). Se realizó el montaje sobre porta-objetos con una solución de Mowiol / DABCO 2.5%. DAPI (4',6-diamino-2-phenylindol) fue utilizado como marcador nuclear.

Los controles negativos consistieron en sustituir el Ac primario por solución de bloqueo. No se detectó señal en ninguno de los controles negativos.

La tinción se valoró con el microscopio confocal de alta resolución *Leica TCS SPE microscope*. La intensidad de la fluorescencia se midió mediante el software Image

J y los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia/célula (UAF/cel), tomando como 1 UAF/cel el grupo control.

Ac Primarios para IF				
	Origen	Dilución	Referencia	Secundario (LifeTech)
ECA2	Conejo	1:500	Ab15347, Abcam	Alexa fluor 488; 1:2000
ECA2	Rata	1:500	MAB3437, R&DSystems	Alexa fluor 555; 1:2000
Nefrina	Conejo	1:150	Obsequio Dr Holzmann	Alexa fluor 488; 1:2000
Calnexina	Conejo	1:200	Ab22595, Abcam	Alexa fluor 488; 1:2000
Wilms'Tumor-1	Cobaya	1:150	SC-192, Tebu-Bio	Alexa fluor 555; 1:2000

Tabla 5: Ac primarios y secundarios utilizados para los estudios de inmunofluorescencia.

### C.7. Estudios de apoptosis

Inicialmente se valoró la diferencia en el número de células entre el momento 0 del estudio (previo a la incubación correspondiente) y el punto final. Se examinaron 8 campos por condición en 3 clonas diferentes (20 x aumentos). Dados los resultados observados se amplió el estudio mediante tinción de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), una de las técnicas más comúnmente utilizadas para detectar células apoptóticas. Se basa en el marcaje de los puntos de rotura del ADN durante el proceso de apoptosis por la acción de las ADNasas, estos puntos se denominan *nicks*. Los *nicks* son marcados en su extremo 3'-OH con nucleótidos modificados que presentan fluorescencia (dUTP) gracias a la acción catalítica de una transferasa terminal (TdT). *Figura 31*.

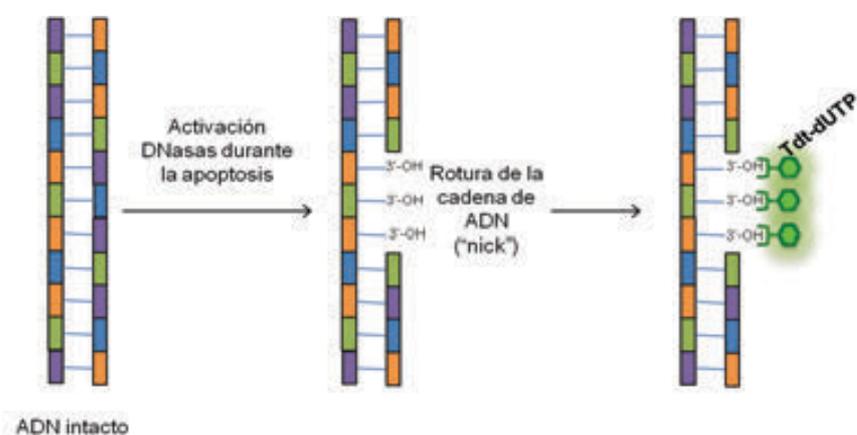


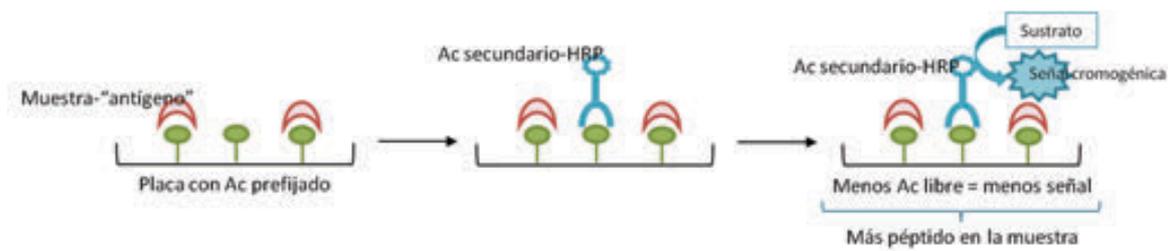
Figura 31. Visión esquemática de la técnica TUNEL para estudio apoptosis.

La apoptosis se estudió en podocitos cultivados sobre cubre-objetos, como en el caso de la IF, usando un kit comercial de tinción TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* [Roche]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y después se permeabilizaron con una solución de citrato sódico al 0,1% en agua con un 0,1% de Tritón X-100. Posteriormente, las células se incubaron con la mezcla reactiva (solución enzimática + marcador fluorescente) durante 2 horas a 37°C en ambiente húmedo. Además se realizó un control positivo aplicando DNAsa tipo I (30UI/ml) sobre los cubreobjetos control.

La intensidad de la fluorescencia se midió mediante el software Image J y los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia/célula (UAF/cel), tomando como 1 UAF/cel el grupo control.

### C.8. Cuantificación Angiotensina II

La determinación de niveles de Ang-II se realizó mediante un kit de ELISA competitivo. ELISA es el acrónimo de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay en inglés), uno de sus tipos es el ELISA competitivo. El proceso básico de este tipo de ensayos consiste en utilizar una placa con Ac específico de la proteína a estudio prefijado en la misma. La muestra, que actúa como antígeno (Ag), se incuba en la placa junto a un Ac primario que compite para unirse de modo específico a estos Ac. Tras este paso se añade un Ac secundario que se une a los Ac prefijados que quedan libres tras la incubación, por tanto cuanto menos Ag unido más Ac secundario se une, de aquí que se denomine competitivo. Posteriormente se añade un sustrato, en este caso cromogénico, que emite señal cuando entra en contacto con el Ac secundario (unido a un enzima que activa el sustrato). *Figura 32.*



*Figura 32: Visión esquemática del funcionamiento de un ELISA competitivo.*

EL kit de ELISA utilizado para medición de la concentración de Ang-II es un kit comercial Angiotensin II EIA (Bachem). Brevemente, se utilizaron 50  $\mu$ l de cada muestra o del estándar por duplicado. Se añadieron en cada pocillo 25  $\mu$ l de anti-suero específico y 25  $\mu$ l de Bt-tracer (marcador biotinilado) que se unirá al anti-suero cuando esté fijado en la placa. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente se realizaron 5 lavados con el buffer del ensayo y posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras un nuevo proceso de lavado se añadieron 100  $\mu$ l de TMB sustrato sobre el que actuar el HRP emitiendo color. Tras 15 minutos se paró la reacción con 100  $\mu$ l de HCl 2N y se realizó la lectura de absorbancia a 450nm. Los resultados se expresan en ng/ml.

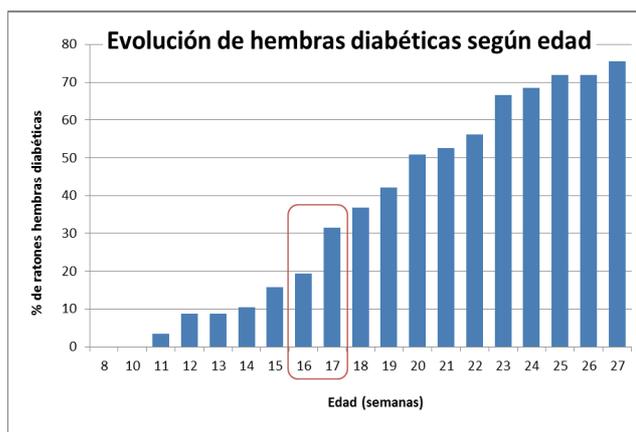
#### **D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante *t de student* o *U-Mann Whitney* en función de la distribución normal o no normal, respectivamente, de los datos a analizar. Los estudios de asociación entre variables cuantitativas se realizaron mediante correlación de *Spearman*. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media. La significancia estadística se definió como una  $p \leq 0.05$ . Para el análisis se utilizó el software estadístico SPSS 16.0.

## V. RESULTADOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

### A. PARÁMETROS GENERALES

La *Figura 33* muestra el desarrollo de la DM en las hembras NOD en nuestro estabulario. Para los experimentos se utilizaron hembras diabéticas de 16-17 semanas de edad.



*Figura 33. Evolución del desarrollo de DM en las hembras NOD.*

Los parámetros generales comparados entre los ratones diabéticos (NOD), los ratones diabéticos tratados con insulina (NODins) y los ratones control (NOR) de edad similar se muestran, en el momento del sacrificio, en la *Tabla 6*.

En el momento del sacrificio, se observó un aumento significativo de la glucemia plasmática en el ratón diabético NOD en comparación con los ratones controles NOR. Este aumento fue evidente en ambos estadios, temprano y tardío, de la diabetes. El tratamiento con pellets de insulina normalizó la glucemia capilar de los ratones diabéticos igualando los valores a los de los controles NOR.

	<b>Estadio temprano: 21 días de seguimiento</b>		
	<b>NOR</b>	<b>NOD</b>	<b>NODins</b>
<i>n</i>	8	9	7
Edad (semanas)	21,6±0,20	21,49±0,60	20,53±0,77
Glucemia (mg/dl)	112,0±4,9	571,1±20,3*\$	122,7±27,0
Peso corporal (gr)	27,2±1,12	24,9±1,03	24,4±0,71
Peso renal (derecho, mg)	150±6,55	253,3±14,2*\$	215,7±11,7#
Cociente peso renal/corporal	0,010±0,0005	0,020±0,0006*\$	0,017±0,0006#

	<b>Estadio tardío: 40 días de seguimiento</b>		
	<b>NOR</b>	<b>NOD</b>	<b>NODins</b>
<i>n</i>	8	8	6
Edad (semanas)	21,7±0,16	20,8±0,97	22,43±1,03
Glucemia (mg/dl)	138,8±4,82	560,6±32,9*	97,7±9,48
Peso corporal (gr)	28,67±0,72	17,2±0,49*\$	24,3±1,03#
Peso renal (derecho, mg)	147,5±9,77	136,3±9,62\$	188,3±15,6#
Cociente peso renal/corporal	0,010±0,0006	0,015±0,009*	0,015±0,022#

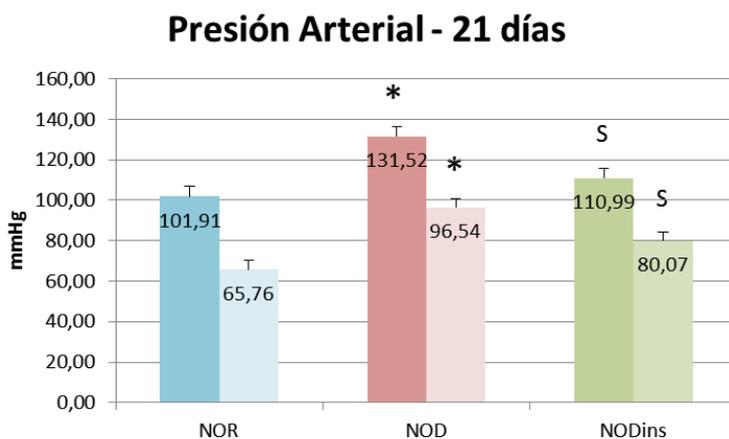
Tabla 6. Tabla de parámetros general de los diferentes grupos animales en ambos estadios (precoz y tardío). \*  $p \leq 0,05$  NOD vs NOR. \$  $p \leq 0,05$  NOD vs NODins. #  $p \leq 0,05$  NOR vs NODins.

En el grupo con un seguimiento de 21 días (**estadio precoz**) los ratones NOD presentaron un incremento significativo del peso renal comparado con el grupo control. La administración de insulina disminuyó el peso del riñón, pero sin alcanzar los niveles del grupo control. En consecuencia, el cociente peso renal/peso corporal estaba incrementado en los ratones diabéticos comparado con los controles y este cociente disminuyó tras la administración de insulina.

En el grupo con un seguimiento de 40 días (**estadio tardío**), no se detectaron diferencias en los pesos renales de los grupos, pero sí volvió a observarse un aumento significativo del cociente peso renal/peso corporal en el grupo diabético, probablemente a expensas de la disminución del peso corporal total de los ratones NOD y el empeoramiento del estado general por el grado de evolución de la DM no controlada en este grupo. En este estadio los ratones NODins presentaron un incremento en el peso renal y en el cociente peso real/peso corporal comparado con el grupo control.

## B. PRESIÓN ARTERIAL

Las PA sistólica y diastólica se midieron una semana antes del sacrificio en los ratones con un seguimiento de 21 días de DM. La PA fue significativamente más elevada en los ratones NOD respecto a los controles NOR. El grupo NODins presentó una práctica normalización de los niveles de PA. *Figura 34*.

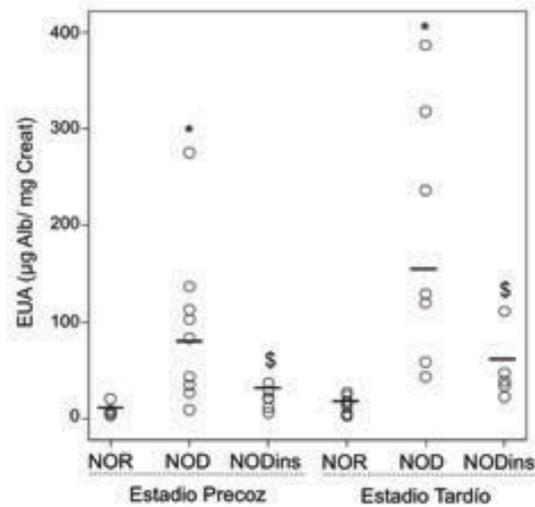


**Figura 34.** Mediciones de la presión arterial en los grupos de estudio a 21 días. Barras oscuras representan PA sistólica y barras claras PA diastólica. \*  $p < 0,05$  vs NOR, §  $p < 0,05$  vs NOD.

## C. EVALUACIÓN FUNCIÓN RENAL: EXCRECIÓN URINARIA DE ALBÚMINA Y FILTRADO GLOMERULAR

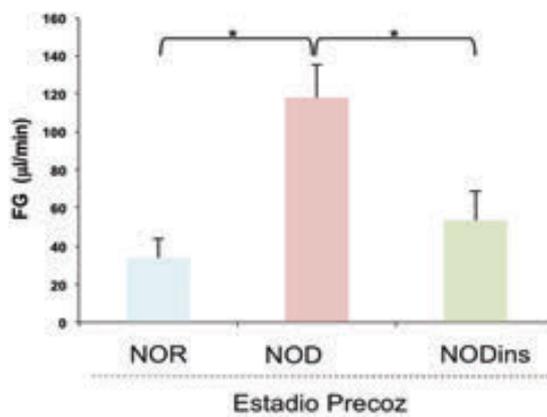
Los ratones NOD en el estadio precoz de DM presentaron un nivel de EUA 10 veces mayor que el grupo control, la administración de insulina disminuyó

significativamente los niveles de EUA. En el estadio tardío los ratones NOD presentaron un nivel de EUA 21 veces mayor que los controles y, de nuevo, el control glucémico con la administración de insulina disminuyó significativamente los niveles de EUA. *Figura 35.*



*Figura 35. EUA en los grupos de estudio en ambos estadios. \*  $p < 0,05$  vs NOR; \$  $p > 0,05$  vs NOD*

El **FG calculado** mediante el aclaramiento de inulina, realizado en el estadio precoz, está significativamente elevado en los ratones NOD en comparación con los controles ( $118 \pm 17,16 \mu\text{L}/\text{min}$  vs,  $34,1 \pm 10,03$ ,  $p < 0,05$ ), lo cual parece reflejar un estado de hiperfiltración en el estadio más precoz de DM. Los ratones NODins presentaron una disminución significativa del FG en comparación con los NOD no tratados ( $53,9 \pm 14,72$ ,  $p < 0,05$ ). *Figura 36.*

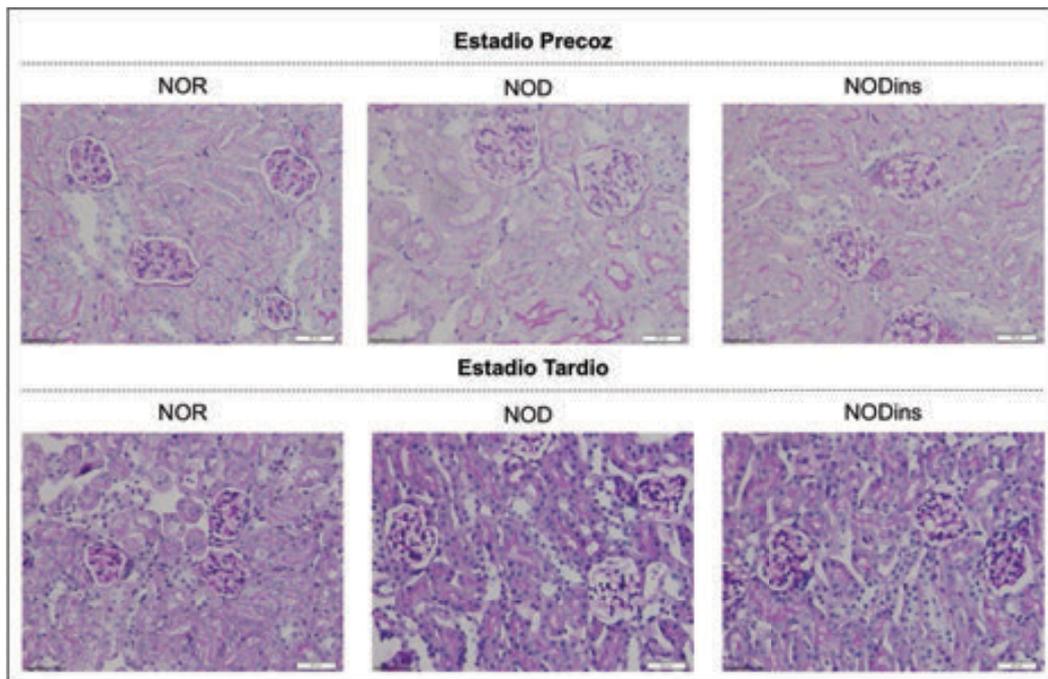


*Figura 36. Filtrado Glomerular medido por aclaramiento de inulina. \* $p < 0,05$*

## D. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

### D.1. Microscopio Óptico

El análisis mediante microscopio óptico de los riñones del grupo NOD, tanto en estadio precoz como tardío, no mostraron alteraciones, ni en región cortical ni medular, al compararlos con los riñones del grupo control. La administración de insulina tampoco modificó la arquitectura renal valorada mediante microscopio óptico. *Figura 37.*



*Figura 37. Tinción de PAS de córtex renal de los diferentes grupos y estadios. 400x.*

Los análisis morfométricos de los riñones de los 3 grupos, en ambos estadios, se recogen en la *Tabla 7.*

	<b>Estadio Precoz</b>		
	<b>NOR</b>	<b>NOD</b>	<b>NODins</b>
<i>N</i>	8	9	7
Area Ovillo Glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )	6237,60 $\pm$ 226,2	8323,79 $\pm$ 270,98*‡	6539,19 $\pm$ 196,44
Células por glomérulo	27,57 $\pm$ 0,91	31,06 $\pm$ 1,31	30,14 $\pm$ 1,05
% Podocito/Células Glomerular	46,79 $\pm$ 1,94	39,41 $\pm$ 2,84	42,10 $\pm$ 2,50
	<b>Estadio Tardío</b>		
	<b>NOR</b>	<b>NOD</b>	<b>NODins</b>
<i>N</i>	8	8	6
Area Ovillo Glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )	6896,86 $\pm$ 346,69	7086,47 $\pm$ 201,51	8256,17 $\pm$ 542,04
Células por glomérulo	33,09 $\pm$ 1,60	34,38 $\pm$ 2,06	29,29 $\pm$ 1,98
% Podocito/Células Glomerular	36,31 $\pm$ 2,43	26,66 $\pm$ 1,56*‡	33,50 $\pm$ 2,38

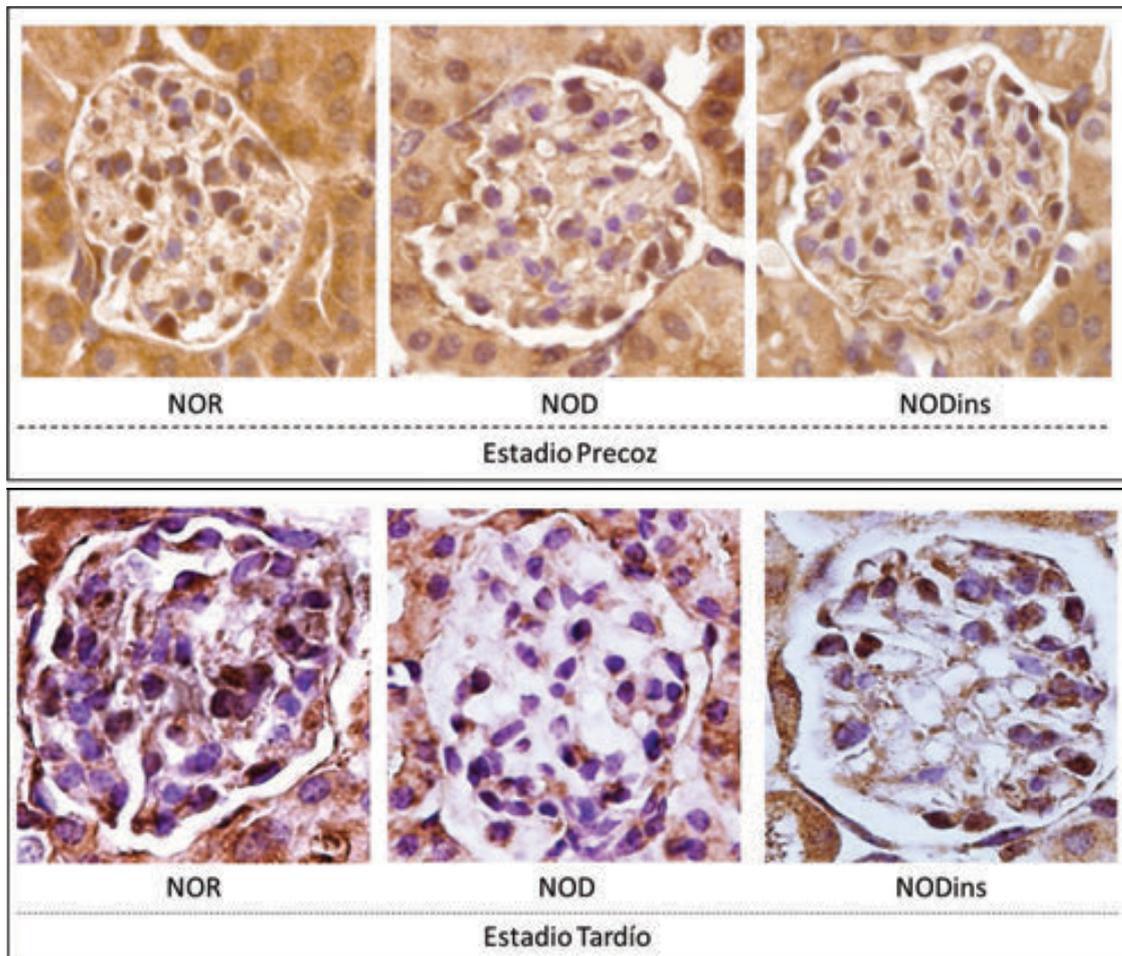
Tabla 7. Análisis morfométricos de los grupos. \*  $p \leq 0,05$  NOD vs NOR, ‡  $p \leq 0,05$  NOD vs NODins.

El área del ovillo glomerular de los ratones diabéticos, en el **estadio precoz**, estaba aumentada de modo estadísticamente significativo respecto al control. La administración de insulina consiguió prevenir esta modificación. En el **estadio tardío** no se encuentran estas diferencias. Estos resultados son coherentes con la falta de incremento del peso renal y pérdida de peso corporal en los ratones NOD.

Los diabéticos en **estadio precoz** además presentaron una mayor celularidad glomerular comparado con el grupo control, pero no resultó estadísticamente significativo. El tratamiento con insulina reduce discretamente la hiper celularidad gomerular comparado con los ratones no tratados.

En el **estadio avanzado** se observó un descenso estadísticamente significativo en el número de podocitos en comparación con el control (% de células glomerulares que son podocitos: NOD 26,66  $\pm$  1,56 vs NOR 36,1  $\pm$  2,43,  $p < 0,05$ ). La administración de insulina previene la pérdida podocitaria detectada en el grupo NOD (% de células

glomerulares que son podocitos: NOD  $26,66 \pm 1,56$  vs  $33,5 \pm 2,38$ ,  $p < 0,05$ ). Estas diferencias no se observaron en el estadio precoz. *Figura 38.*



*Figura 38. Tinción para WT-1 que marca núcleos podocitarios junto con contra-tinción con Hematoxilina para contabilización de núcleos glomerulares totales. 400x.*

## D.2. Microscopio Electrónico

El análisis ultraestructural de los glomérulos de los ratones NOD en un estadio tardío mostró una moderada expansión mesangial, a expensas de la matriz mesangial, comparado con el ratón control NOR. La administración de insulina previno la expansión mesangial ya que no se observaron cambios ultraestructurales comparados con los controles. No se detectaron alteraciones en el estadio precoz. *Figura 39.*

Se realizaron medidas de MBG detectando, en el estadio tardío de DM, un incremento del grosor de la MBG comparado con los ratones control NOR (NOD 202,8nm vs NOR 157,5nm). La administración de insulina previno este incremento

(NOD 202,8nm vs NODins 137,8nm). No se detectaron cambios a nivel de la MBG en el estadio precoz.

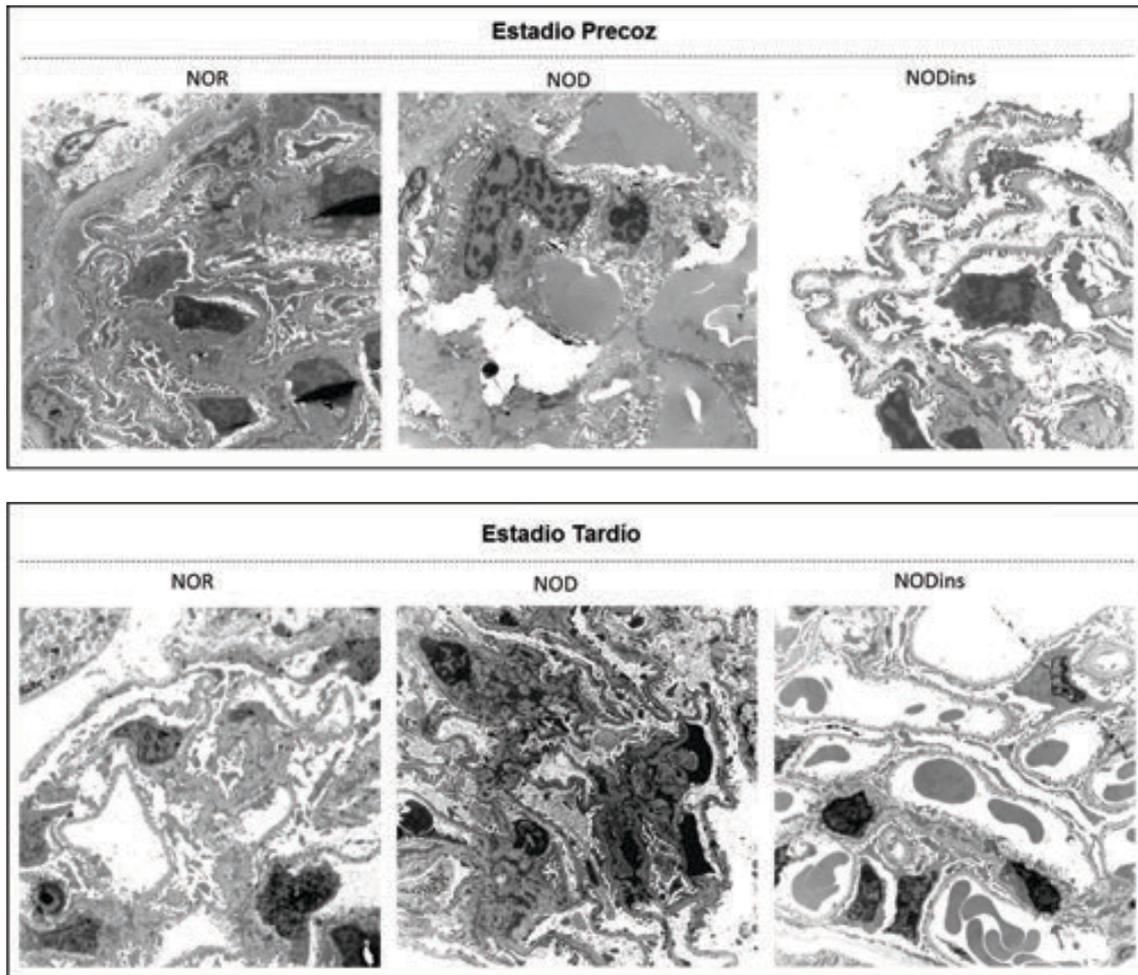


Figura 39. Microscopía electrónica de ambos estadios y los 3 grupos. Destacar en el grupo NOD y estadio tardío la expansión mesangial a expensas de aumento de la matriz mesangial (asteriscos). X46000.

## E. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL ECA2 EN SUERO Y ORINA

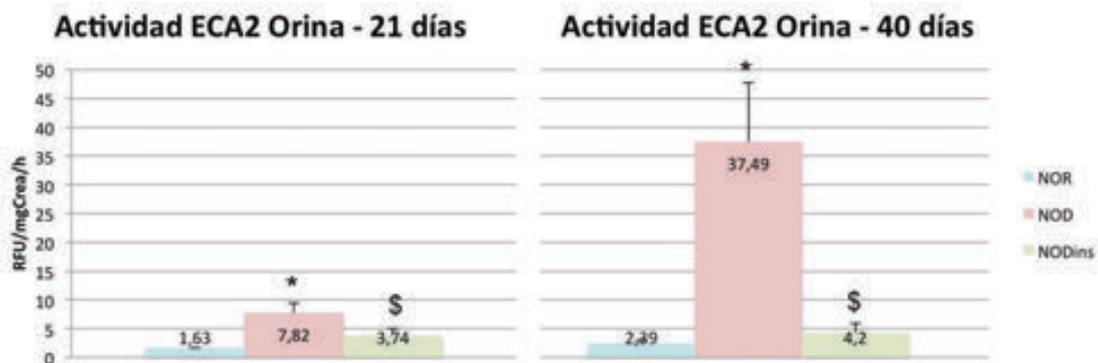
La actividad enzimática del ECA2 se midió en suero y orina en ambos estadios en los 3 grupos de estudio. Los ratones diabéticos presentaron una mayor actividad sérica de ECA2 en ambos estadios comparado con el grupo control, siendo estadísticamente significativo (estadio temprano: NOD  $249,8 \pm 39$  vs NOR  $71,54 \pm 4,26$ ,  $p < 0,05$ ; estadio tardío NOD  $543,53 \pm 145,9$  vs NOR  $60,91 \pm 2,46$ ,  $p < 0,05$ . Expresado en RFU/ $\mu$ L/h). Los ratones tratados con insulina mostraron niveles de actividad de ECA2 sérica comparables con los ratones control (estadio temprano:

NODins  $126,7 \pm 14,8$ ; estadio tardío: NODins  $106,6 \pm 15,62$ ,  $p < 0,05$  vs NOD. Expresado en RFU/ $\mu$ L/h). *Figura 40.*



*Figura 40. Actividad sérica de ECA2 en los diferentes grupos y momentos de evolución. \*  $p < 0,05$  vs NOR, \$  $p < 0,05$  vs NOD.*

Las muestras de orina puntual obtenidas en los diferentes grupos mostraron las mismas tendencias que las muestras de suero. En ambos estadios el grupo NOD presentó niveles de actividad urinaria de ECA2 significativamente más elevados que los controles NOR (estadio temprano: NOD  $7,82 \pm 1,63$  vs  $1,63 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ; estadio tardío: NOD  $37,49 \pm 10,27$  vs NOR  $2,39 \pm 0,71$ ,  $p < 0,05$ . Expresado en RFU/ $\mu$ gCrea/h). Los ratones diabéticos tratados con insulina mostraron una actividad enzimática con niveles similares a los controles en ambos estadios (estadio precoz: NODins  $3,74 \pm 1,31$ ; estadio tardío: NODins  $4,2 \pm 1,69$ ,  $p < 0,05$  vs NOD. RFU/ $\mu$ gCrea/h). *Figura 41.*



*Figura 41. Actividad en muestra aislada de orina de ECA2 en los diferentes grupos y momentos de evolución. \*  $p < 0,05$  vs NOR, \$  $p < 0,05$  vs NOD.*

## F. ESTUDIOS ECA2 EN CÓRTEX RENAL

### F.1. Actividad enzimática ECA2 en córtex renal

Al igual que en la expresión proteica en la actividad enzimática se detecta un incremento estadísticamente significativo respecto a los NOR en el grupo de diabéticos y en ambos estadios (estadio precoz: NOD  $4512 \pm 426$  vs NOR  $3285 \pm 167$ ; estadio tardío: NOD  $4852 \pm 219$  vs NOR  $3637 \pm 206$ ,  $p < 0,05$ . Expresado en RFU/ $\mu$ g/h). El tratamiento con insulina disminuye significativamente la actividad enzimática en el estadio tardío comparado con los NOD (estadio tardío: NODins  $3859 \pm 268$ ,  $p < 0,05$  vs NOD. Expresado en RFU/ $\mu$ g/h). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estadio precoz tras la administración de insulina a los ratones diabéticos. *Figura 42.*



*Figura 42.* Actividad enzimática de ECA2 en extractos de córtex renal. \*  $p < 0,05$  vs NOR, \$  $p < 0,05$  vs NOD.

### F.2. Expresión proteica

La expresión proteica de ECA2 mediante WB en córtex renal estaba aumentada en el grupo de ratones NOD, en ambos puntos de seguimiento, comparado con los NOR (estadio precoz: NOD  $1,48 \pm 0,26$  vs NOR  $1 \pm 0,10$ ,  $p < 0,05$ ; estadio tardío: NOD  $1,64 \pm 0,14$  vs NOR  $1 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ . Expresado en cociente ECA2/ $\beta$ -actina). El control de la glucemia con insulina disminuye discretamente la expresión proteica de ECA2 comparado con los NOD no tratados en ambos estadios (estadio precoz: NODins  $1,01 \pm 0,16$ ; estadio tardío: NODins  $1,59 \pm 0,15$ ,  $p = ns$  vs NOD. Expresado en cociente ECA2/ $\beta$ -actina). *Figura 43.*

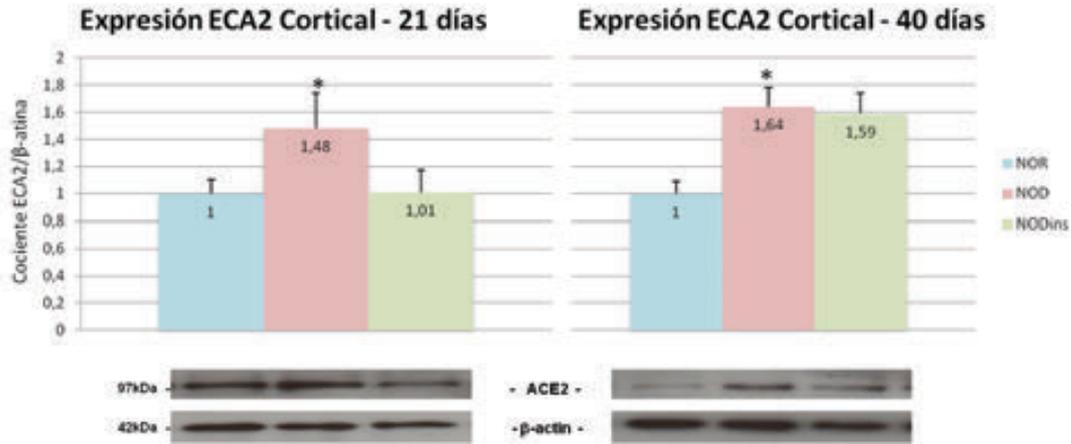


Figura 43 - Expresión proteica mediante WB del ECA2 en los diferentes grupos de estudio. En el area inferior de la figura una imagen de los WB correspondientes. \*p<0,05 vs NOR.

## G. CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y FUNCIÓN RENAL

En el grupo denominado estadio precoz se detectó una correlación positiva entre la actividad sérica y urinaria de ECA2 y el FG por aclaramiento de inulina ( $r=0,84$ ,  $p<0,001$  en ambos casos). Además existe una correlación directa entre ambas actividades enzimáticas y la EUA (suero  $r=0,79$ / orina  $r=0,81$ ,  $p<0,001$ ). Figuras 44 y 45.

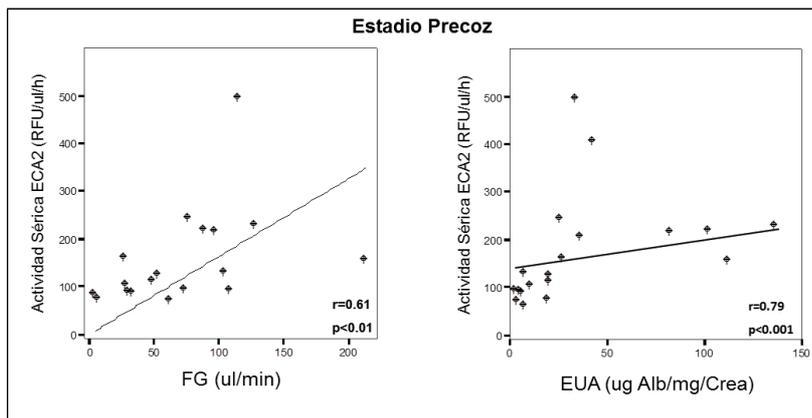


Figura 44. Correlaciones en estadio precoz: Actividad Enzimática en Sérica con FG y EUA.

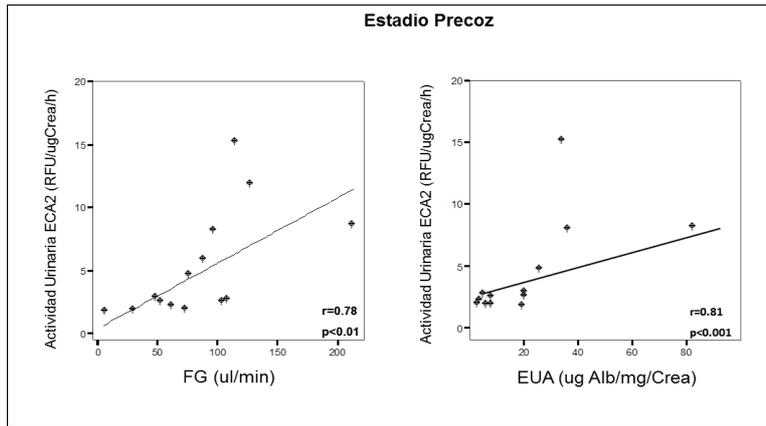


Figura 45. Correlaciones en estadio precoz: Actividad Enzimática en Orina con FG y EUA.

En el estadio tardío se observó una correlación directa entre la actividad urinaria y sérica de ECA2 y la EUA (Orina  $r=0,79$ / Suero  $r=0,72$ ,  $p<0,01$ ). Figura 46.

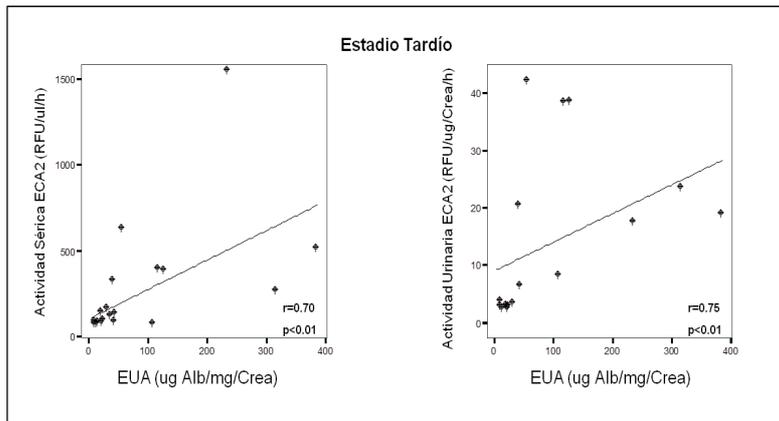


Figura 46: Correlaciones en estadio tardío entre la EUA y las actividades sérica y urinaria de ECA2.

En el estadio tardío se detecta una correlación indirecta entre la actividad sérica de ECA2 y el % de podocitos por glomérulo ( $r=-0,59$ ,  $p<0,05$ ). En este grupo también se detecta una correlación negativa entre la EUA y el porcentaje de podocitos por glomérulo ( $r=-0,50$ ,  $p<0,05$ ). Figura 47.

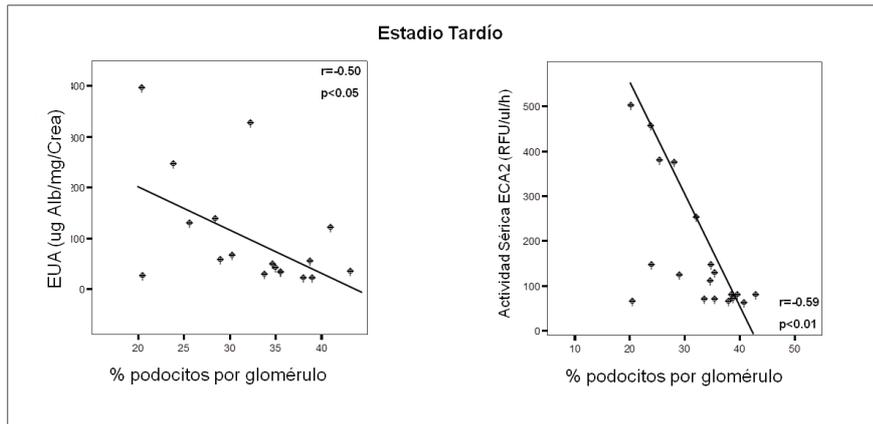
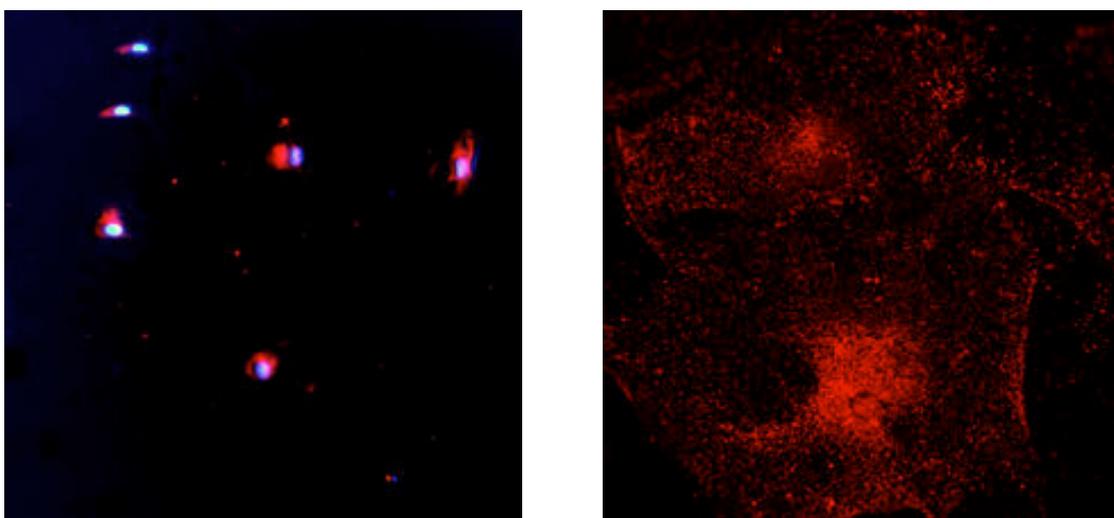


Figura 47. Correlación negativa entre el % de podocitos por glomérulo con la actividad sérica de ECA2 y con la EUA.

## VI. RESULTADOS ESTUDIOS EN EL MODELO CELULAR

### A. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR

Se caracterizó la línea celular mediante la presencia de la típica apariencia en empedrado (“cobblestone”) y la tinción positiva de marcadores específicos: WT-1, marcador nuclear específico de esta célula (Tebu-Bio) y Nefrina, proteína característica del podocito (anticuerpo policlonal de conejo, obsequio del Profesor L.B. Holzmann, University of Pennsylvania, Philadelphia). *Figura 48.*



**Figura 48:** Izquierda: Imagen de inmunofluorescencia de colocalización de la tinción para WT-1 (rojo) con el marcador nuclear inespecífico DAPI (azul). Derecha: Imagen de inmunofluorescencia para nefrina.

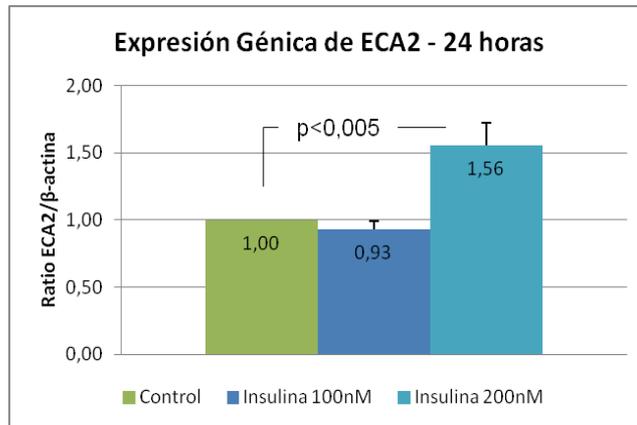
### B. ESTUDIO DOSIS DEPENDIENTE

Los primeros experimentos realizados en los cultivos celulares se centraron en confirmar la presencia de ECA2 en los podocitos y observar su respuesta a la insulina. Las células se incubaron con insulina a dos concentraciones diferentes (100nM y 200nM) tras 24 horas de *starvation* y en un medio con alta concentración de glucosa (25mM). El grupo control siguió el mismo proceso, pero sin incubar con insulina.

#### B.1. Expresión génica

La expresión génica de ECA2 aumentó de modo estadísticamente significativo en el grupo incubado con insulina 200nM, sin observarse efecto en el grupo de 100nM

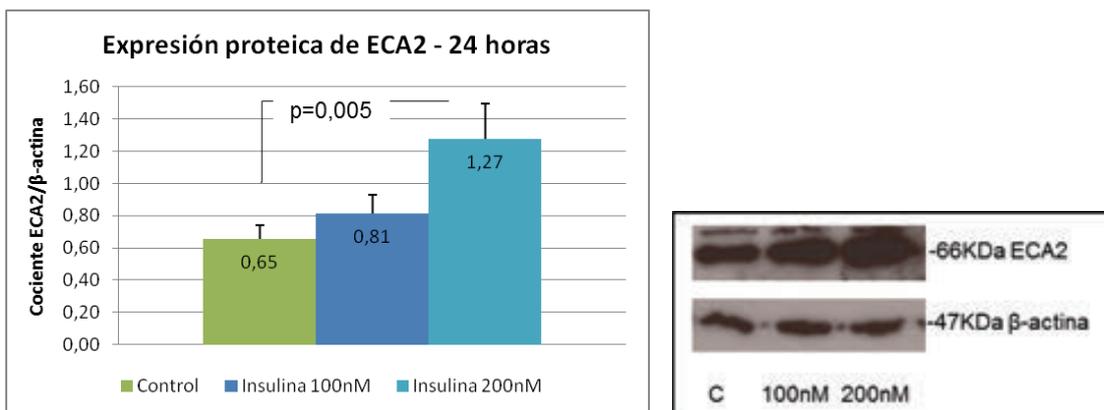
(cociente ECA2/ $\beta$ -actina: control como 1, 100nM  $0,93 \pm 0,06$ ; 200nM  $1,56 \pm 0,16$ ;  $p < 0,005$  control vs 200nM). *Figura 49.*



*Figura 49. Resultados de expresión génica ECA2 tras 24 horas de incubación con insulina (100nM y 200nM).*

## B.2. Expresión proteica

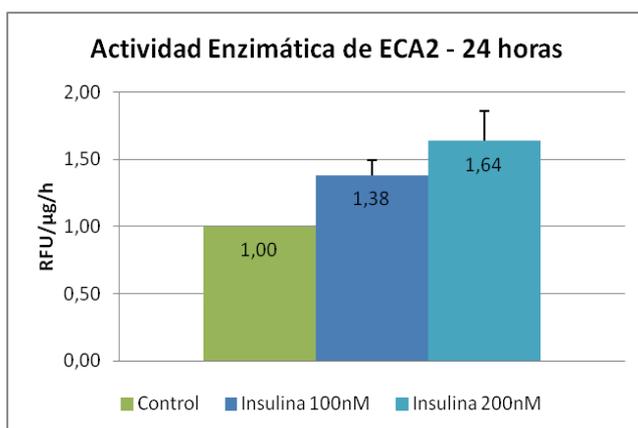
Los estudios de expresión proteica mediante WB mostraron un aumento en el ECA2 en ambos grupos respecto al control, siendo estadísticamente significativo únicamente en el grupo de 200nM (Cociente ECA2/ $\beta$ -actina: Control  $0,65 \pm 0,09$ ; 100nM  $0,81 \pm 0,11$ ; 200nM  $1,27 \pm 0,22$ ;  $p = 0,005$  control vs 200nM). *Figura 50.*



*Figura 50. Expresión proteica de ECA2 tras incubación con insulina 24 horas (100nM y 200nM). Derecha: Foto del Film de WB con las bandas de ECA2 de los diferentes grupos y su correspondiente control de carga ( $\beta$ -actina).*

### B.3. Actividad enzimática

Se detectó una tendencia a aumentar la actividad enzimática en los podocitos que recibieron insulina en comparación con los controles: un 38% y un 64%, expresada como RFU/ $\mu\text{g/h}$ , en los grupos de 100nM y 200nM, respectivamente, pero sin alcanzar significación estadística. *Figura 51.*



*Figura 51. Actividad enzimática de ECA2 tras incubación con insulina 24 horas (100nM y 200nM)*

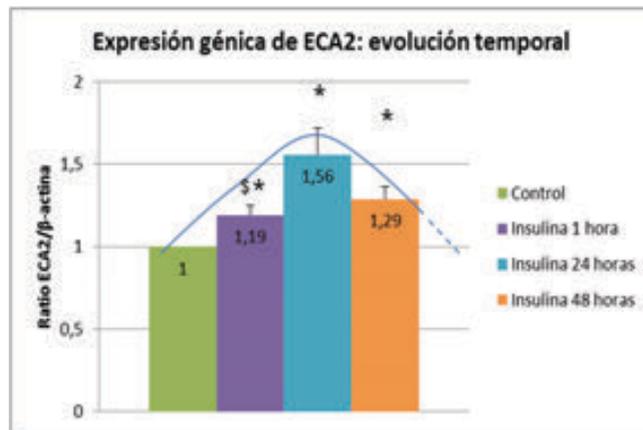
## C. ESTUDIO TIEMPO-DEPENDIENTE

El siguiente paso tras observar la respuesta de los podocitos a la insulina en los experimentos iniciales fue estudiar la evolución temporal de esta respuesta. Para ello se decidió escoger la concentración de insulina de 200nM, ya que era la que presentaba resultados más evidentes, realizar incubaciones, tras 24 horas de *starvation*, a 1 hora, 24 horas y 48 horas. Se estudió de nuevo la expresión génica, proteica y actividad enzimática de las células en las diferentes condiciones. Para cada punto temporal se realizó un grupo control para evitar las posibles variaciones relacionadas con el momento de maduración de las células. Posteriormente se normalizó cada grupo a su control para que los resultados pudiesen ser comparables.

### C.1. Expresión génica

Se detectó un aumento estadísticamente significativo de la expresión génica de ECA2 en los 3 puntos temporales. A las 24 horas se detectaron los mayores niveles, aunque únicamente fue estadísticamente significativo respecto al grupo de 1 hora (ratio

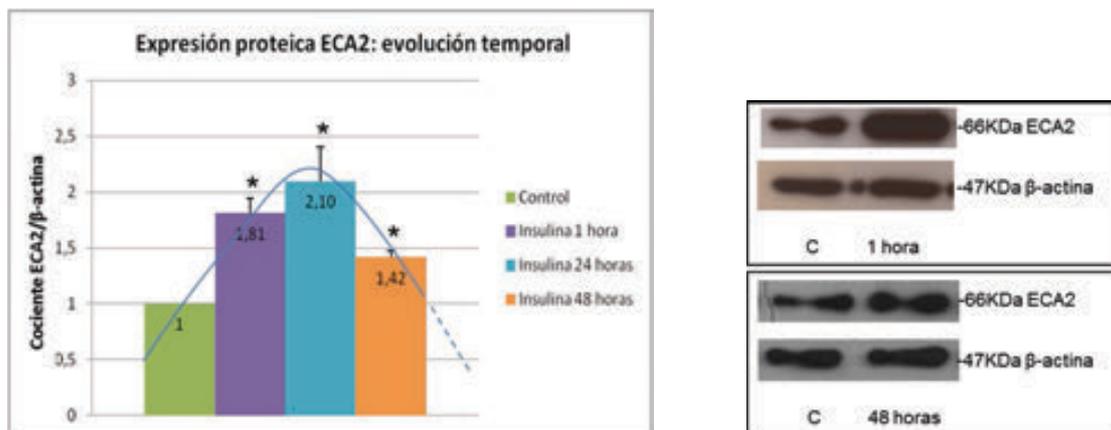
ECA2/ $\beta$ -actina: control como 1; 1 hora  $1,19 \pm 0,06$ ; 24 horas  $1,55 \pm 0,16$ ; 48 horas  $1,29 \pm 0,07$ ). *Figura 52*.



*Figura 52. Evolución temporal de la expresión génica ECA2. \*  $p < 0,05$  vs Control; \$  $p < 0,05$  vs 24 horas.*

## C.2. Expresión proteica

La expresión proteica de ECA2 presentaba un perfil similar a la expresión génica. En todos los puntos temporales es estadísticamente significativa mayor que su respectivo control, pero sin detectar diferencias entre los diferentes tiempos de incubación (Cociente ECA2/ $\beta$ -actina: control como 1, 1 hora  $1,81 \pm 0,13$ ; 24 horas  $2,10 \pm 0,3$ ; 48 horas  $1,42 \pm 0,06$ ;  $p < 0,05$  vs control en todos los grupos). *Figura 53*.



*Figura 53. Expresión proteica de ECA2 mediante WB: evolución en el tiempo. \*  $p < 0,05$  vs Control. Imagen de la derecha corresponde a foto WB con marcaje ECA2 y  $\beta$ -actina en cada punto temporal junto con su correspondiente grupo control.*

Con la finalidad de completar el estudio de expresión proteica se realizaron tinciones de IF para ECA2. La medición se realizó por unidades arbitrarias de fluorescencia por célula y los hallazgos fueron comparables con el estudio por WB (UAF/cel: control como 1; 1 hora  $3,3 \pm 0,22$ ; 24 horas  $3,7 \pm 0,38$ ; 48 horas  $2,2 \pm 0,42$ ;  $p < 0,05$  vs control). Figuras 54 y 55.

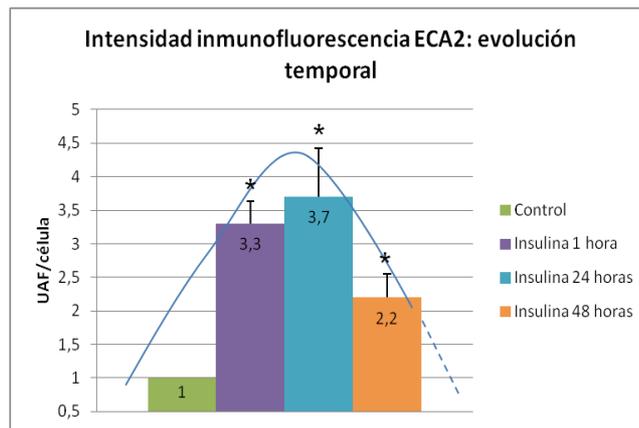


Figura 54. Expresión proteica de ECA2 mediante IF: evolución en el tiempo. \*  $p < 0,05$  vs Control.

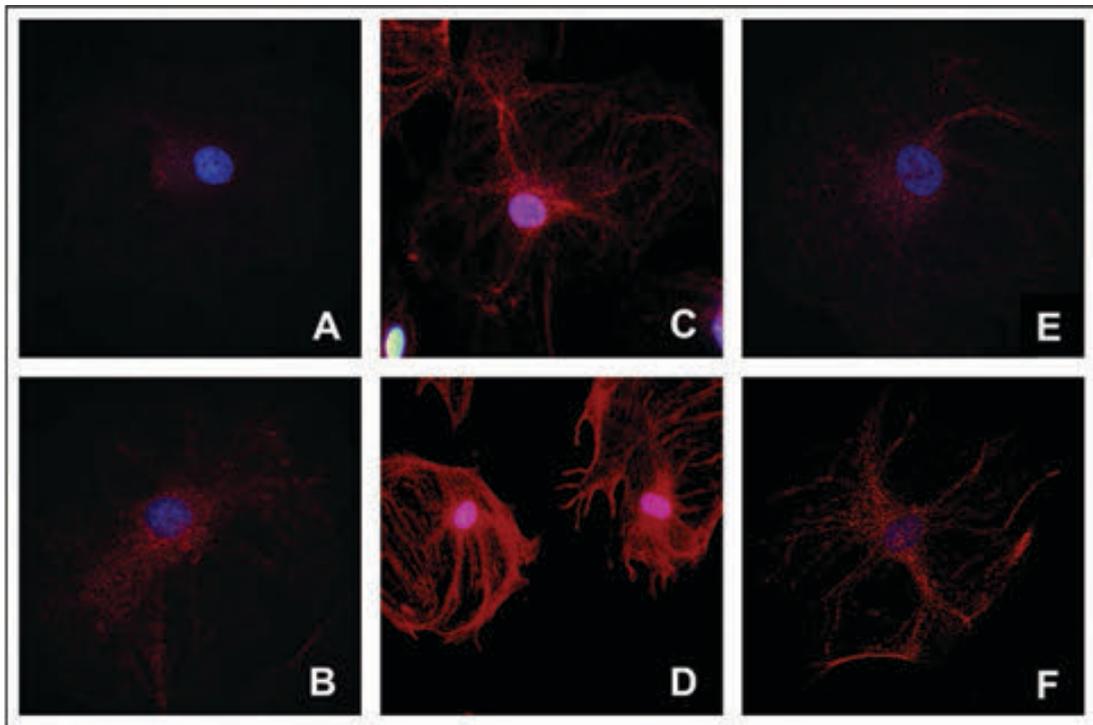
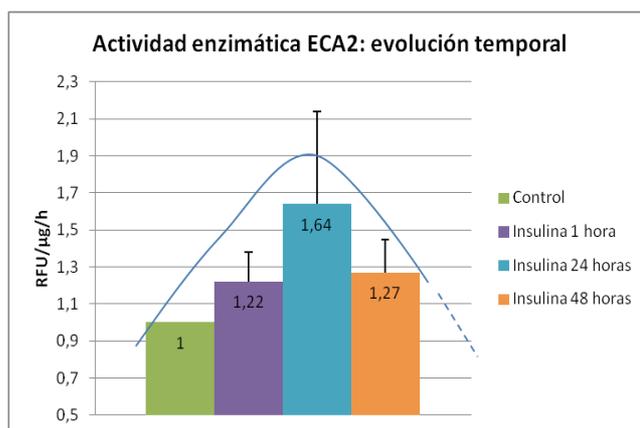


Figura 55. Marcaje con IF para ECA2 (ab15347, rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul) a un aumento de 40x. A y B: control e insulina a 1 hora, respectivamente. C y D: control e insulina a 24 horas, respectivamente. E y F: control e insulina a 48 horas, respectivamente.

### C.3. Actividad enzimática

El estudio de actividad enzimática mostró un perfil paralelo a los de expresión proteica con un incremento de actividad, expresada en RFU/ $\mu$ g/h, del 22%, 64% y 27% a 1, 24 y 48 horas, respectivamente. En ningún caso las diferencias resultaron estadísticamente significativas, destacando la elevada desviación de los grupos. *Figura 56.*



*Figura 56. Evolución en el tiempo de actividad enzimática ECA2 en presencia de insulina (200nM).*

## D. ESTUDIO DE LA RESPUESTA A LA INSULINA EN PRESENCIA DE ALBÚMINA

Observando los resultados previos se decidió estudiar el efecto de la insulina añadiendo un elemento más presente en la ND, la albuminuria. Para intentar elucidar el efecto de la insulina en el podocito en una situación de ND establecida se realizaron los siguientes experimentos: incubar las células con insulina (Ins; concentración en el medio de 200nM), albúmina (Alb; concentración en el medio de 10mg/ml) o albúmina e insulina (Alb+Ins) y estudiar las variaciones en la respuesta génica y proteica del ECA2. Estos estudios se realizaron tras 48 horas de incubación, simulando una exposición a largo plazo.

### D.1. Expresión génica

La expresión génica de ECA2 se ve incrementada en presencia de insulina de modo estadísticamente significativo respecto al control, pero la presencia de albúmina no tiene ningún efecto a este nivel (Ratio ECA2/ $\beta$ -actina: control como 1; Ins  $1,38 \pm 0,06$ ; Alb  $1,02 \pm 0,14$ ; Alb+Ins  $1,33 \pm 0,13$ ). *Figura 57.*

\*

\*

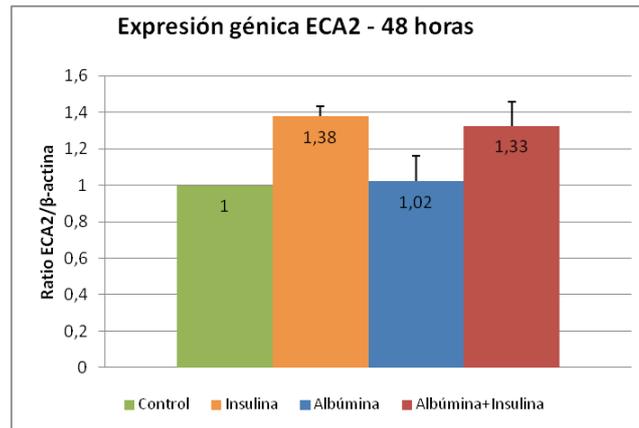


Figura 57. Expresión génica a 48 horas de incubación con insulina con o sin albúmina. \*  $p < 0,05$  vs Control.

## D.2. Expresión proteica

Los resultados de expresión proteica mediante WB fueron similares en el grupo de insulina y en el de albúmina, aumento de expresión de ECA2 estadísticamente significativo respecto al control en el primero y sin variaciones en el segundo. Pero destacada que, de modo contrario a la expresión génica, el grupo incubado con albúmina e insulina, presenta una disminución estadísticamente significativa de la expresión proteica de ECA2 tanto con el grupo control como con el de insulina (Cociente ECA2/ $\beta$ -actina: control  $0,77 \pm 0,10$ ; Ins  $1,27 \pm 0,09$ ; Alb  $0,90 \pm 0,13$ ; Alb+Ins  $0,38 \pm 0,05$ ). Figura 58.

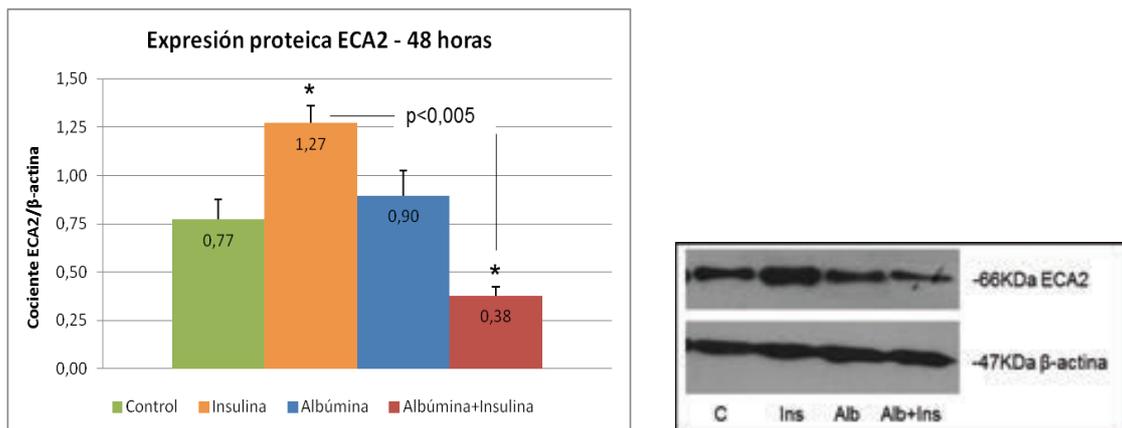
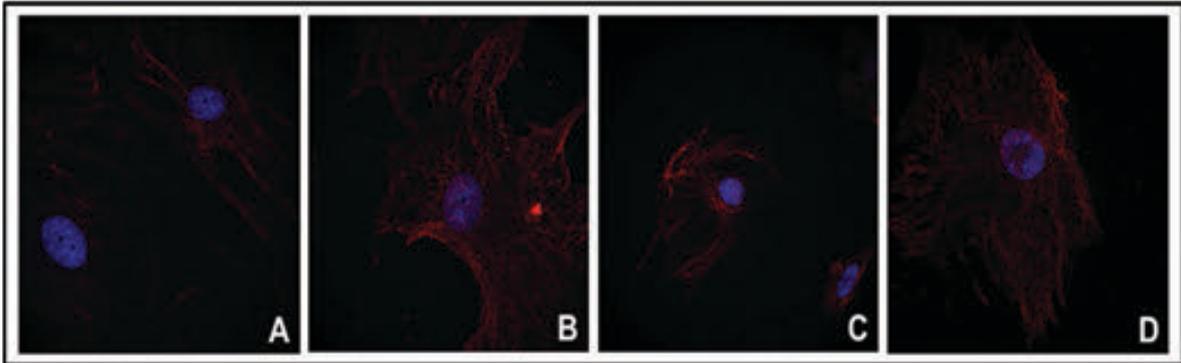


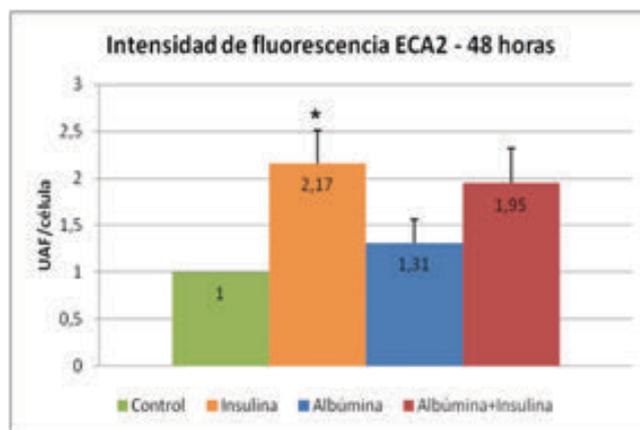
Figura 58. Expresión proteica mediante WB a 48 horas de incubación con insulina con o sin albúmina. \*  $p < 0,05$  vs Control. La imagen de la derecha corresponde al WB con los diferentes grupos de estudio.

Para profundizar en el estudio de la expresión proteica de ECA2 en estas condiciones se realizaron estudios de IF para ECA2. Los resultados de la medición de la fluorescencia en los diferentes grupos fueron similares a los encontrados en la expresión

génica, no a los encontrados en el WB. El grupo incubado únicamente con insulina presentaba un aumento estadísticamente significativo respecto al control, el grupo de la albúmina no presentaba diferencias y el grupo de la combinación presentaba mayor fluorescencia que el grupo control sin alcanzar la significación estadística y no presentaba diferencias con el grupo de insulina (UAF/cel: control como 1; Ins  $2,17 \pm 0,34$ ; Alb  $1,31 \pm 0,25$ ; Alb+Ins  $1,95 \pm 0,37$ ). Figuras 59 y 60.



**Figura 59.** Marcaje con IF para ECA2 (ab15347, rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul) a un aumento de 40x. A: control, B: Insulina, C: Albúmina, D: Albúmina+Insulina.



**Figura 60.** Expresión proteica mediante IF (UAF/cel). \*  $p < 0,05$  vs Control.

### D.3. Actividad enzimática

Para completar el estudio se realizó actividad enzimática de ECA2 en todos los grupos. Respecto al grupo control se detectó un 31% más de actividad en el grupo de insulina, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El grupo de albúmina no presentó cambios, y el grupo de albúmina e insulina presentó una disminución del 28%, estadísticamente significativa respecto al grupo control. Comparado con el grupo con insulina sola esta disminución también resultó significativa. Figura 61.

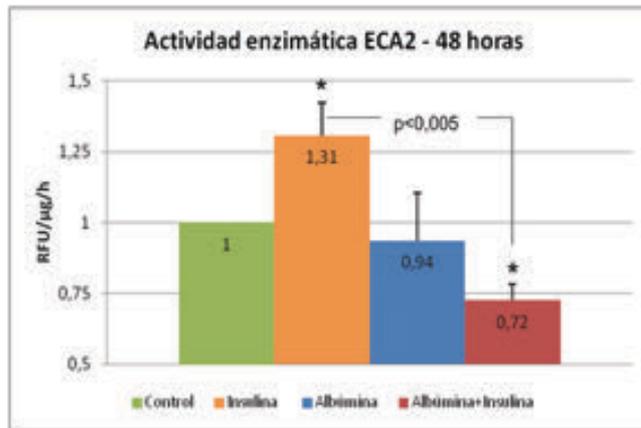


Figura 61. Actividad enzimática en los diferentes grupos de estudio. \*  $p < 0,05$  vs Control.

#### D.4. Estudios de co-localización de ECA2

Encontramos una discordancia entre los resultados de expresión génica y visualización mediante IF de la expresión proteica con respecto a la expresión proteica de ECA2 mediante WB y su actividad enzimática. En consecuencia se realizaron estudios de co-localización del ECA2 con diferentes estructuras celulares. Inicialmente se realizaron estudios de co-localización con citoesqueleto, utilizando como marcador el  $\beta$ -actina. En ninguno de los grupos se detectó co-localización. En el grupo incubado con albúmina se detecta una redistribución de fibras de actina hacia la periferia que es compatible con la descrita en la literatura en diferentes situaciones patológicas. La presencia de insulina en el medio junto con la albúmina no evita estos cambios. Figura 62.

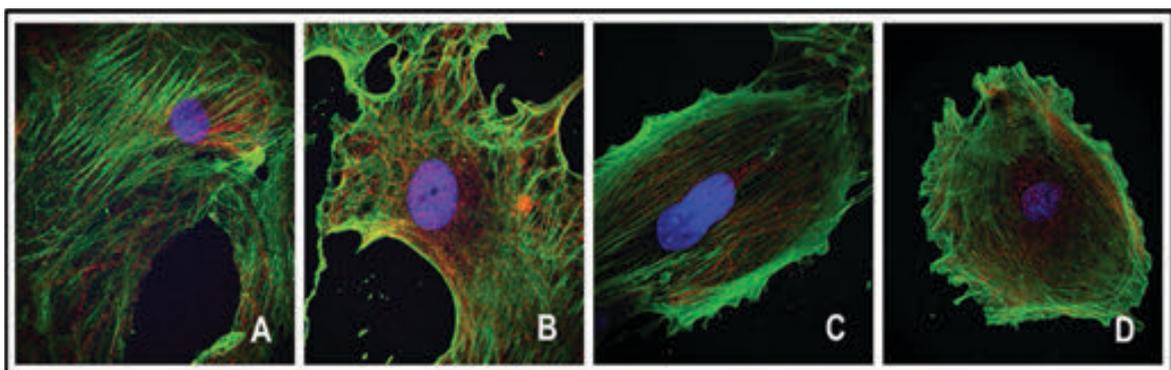
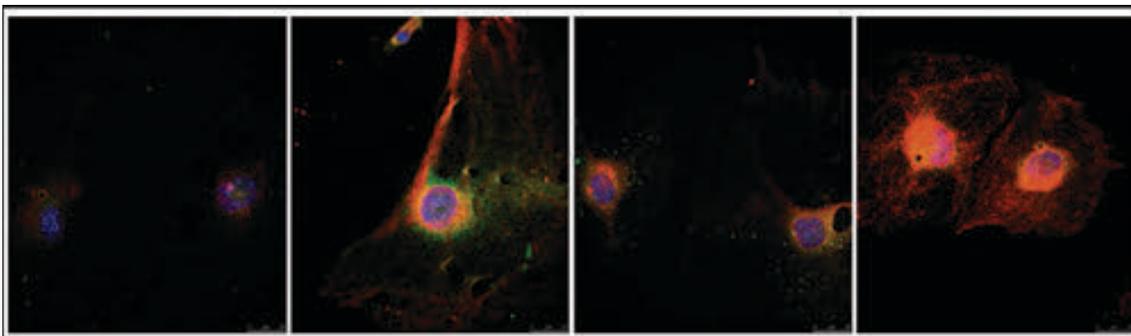


Figura 62. Marcaje con IF para ECA2 (ab15347, rojo),  $\beta$ -actina (A1978, verde) y marcaje nuclear con DAPI (azul) a un aumento de 40x. A: control, B: Insulina, C: Albúmina, D: Albúmina+Insulina. Destaca en las imágenes C y D la distribución más marcada en la periferia de las fibras.

Se realizaron estudios de co-localización con calnexina que es un marcador de retículo endoplásmico (RE). Se utilizó otro Ac primario para marcar el ECA2 ya que la calnexina es un Ac anti-conejo (como el ab15347 utilizado para las otras IF), por tanto incompatibles. Primero se realizó una tinción para ECA2 con el Ac primario para marcar el ECA2 anti rata (MAB3437) y se comprobó su especificidad y que los resultados obtenidos eran paralelos a los obtenidos con el otro Ac. Posteriormente se procedió a realizar los estudios de co-localización. Se observó co-localización ECA2-RE mucho más significativa en el grupo incubado con insulina+albúmina que en ninguno de los otros grupos, lo que podría explicar los hallazgos en expresión génica, proteica y en la actividad enzimática. *Figura 63.*

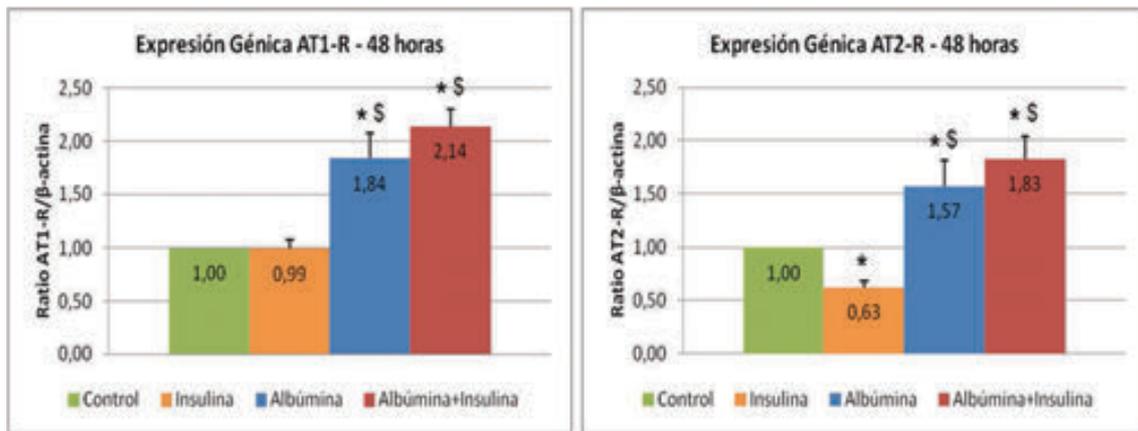


*Figura 63: Marcaje con IF para ECA2 (MAB3437, verde), Calnexina (ab22595, rojo), la superposición de ambos aparece como amarillo. Marcaje nuclear con DAPI (azul) a un aumento de 40x. A: control, B: Insulina, C: Albúmina, D: Albúmina+Insulina.*

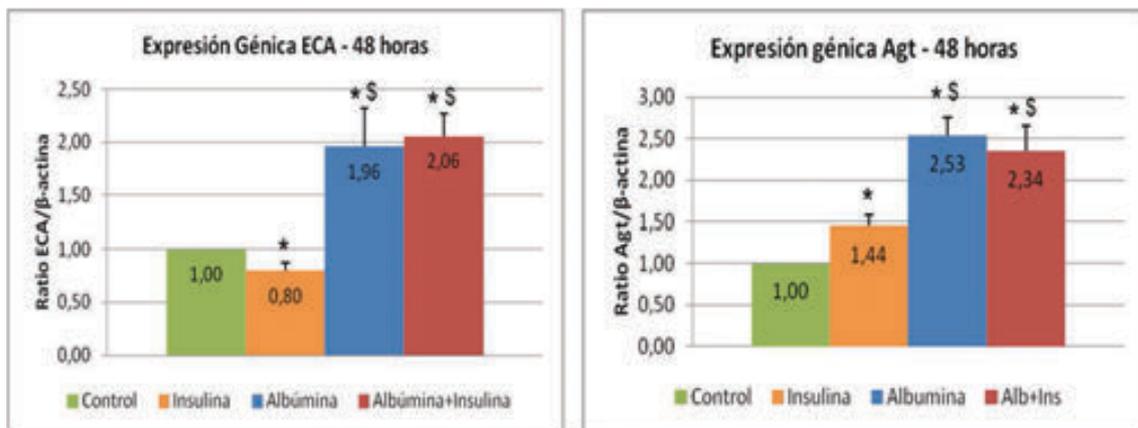
## **E. INFLUENCIA DE LA INSULINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL SRAA PODOCITARIO EN PRESENCIA DE ALBÚMINA EN EL MEDIO**

Se realizaron estudios de expresión génica de diferentes elementos del SRA en las condiciones indicadas. En el grupo incubado con insulina no se observaron modificaciones en la expresión génica del AT1-R respecto al control (ratio AT1-R/ $\beta$ -actina: control como 1; Ins  $0,99 \pm 0,08$ ), se detectó un descenso significativo en la expresión génica de AT2-R y ECA (ratio gen/ $\beta$ -actina: control como 1; Ins  $0,63 \pm 0,06$  y  $0,80 \pm 0,08$  respectivamente). En este grupo se observó un aumento significativo de los niveles de Agt respecto al control (ratio Agt/ $\beta$ -actina control como 1; Ins  $1,44 \pm 0,14$ ).

La incubación con albúmina sola o en presencia de insulina aumenta la expresión génica de AT1-R, AT2-R, ECA (ratio gen/ $\beta$ -actina: Alb 1,84  $\pm$  0,24/1,57  $\pm$  0,24/1,96  $\pm$  0,36 respectivamente; Alb+Ins 2,14  $\pm$  0,16/1,83  $\pm$  0,21/2,06  $\pm$  0,21 respectivamente) de modo significativo con respecto al control y respecto al grupo con insulina. La expresión de Agt también es más elevada de modo significativo con respecto al control y también respecto al grupo de insulina (ratio Agt/ $\beta$ -actina control como 1; Ins 1,44  $\pm$  0,14; Alb 2,53  $\pm$  0,2; Alb+Ins 2,34  $\pm$  0,31). *Figura 64 y 65.*



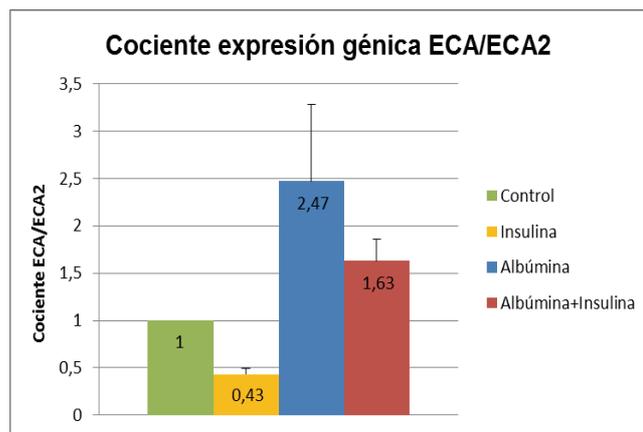
*Figura 64. Representación de la expresión génica de los receptores AT1-R y AT2-R. \*  $p < 0,05$  vs Control; \$  $p < 0,05$  vs Insulina.*



*Figura 65. Representación de la expresión génica de Agt y ECA. \*  $p < 0,05$  vs Control; \$  $p < 0,05$  vs Insulina.*

Realizando una valoración del balance entre ECA y ECA2 en estas diferentes situaciones mediante un cociente ECA/ECA2 se detecta que en presencia de insulina se produce un balance a favor de ECA2 respecto a lo que se detecta en el grupo control,

siendo estadísticamente significativo (control como 1; Ins  $0,43 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ). Este efecto no se mantiene cuando se realiza la incubación con insulina en presencia de albúmina sino que se favorece el ECA, siendo estadísticamente significativo con respecto al control y a la insulina sola (control como 1, Ins  $0,43 \pm 0,06$ ; Alb+Ins  $1,63 \pm 0,23$ ). La presencia de albúmina desequilibra el balance claramente a favor del ECA aunque no alcanza la significación estadística respecto al control (control como 1; Alb  $2,47 \pm 0,81$ ). *Figura 66.*



*Figura 66. Cociente ECA/ECA2 de expresión génica. \*  $p < 0,05$  vs Control;  $p < 0,05$  vs Insulina.*

Por tanto, valorando conjuntamente todos estos elementos parece que la insulina favorece un perfil de expresión génica que disminuiría la síntesis de Ang-II, pero no es capaz de revertir el efecto pro-Ang-II que causa la presencia de albúmina.

## F. CONCENTRACIÓN DE ANG-II

Realizando los análisis sobre los lisados celulares no se detectó ninguna diferencia entre los diferentes grupos. Es posible que esto sea debido a que la concentración se encontraba en el límite inferior de detección del kit de ELISA utilizado. *Figura 67.*

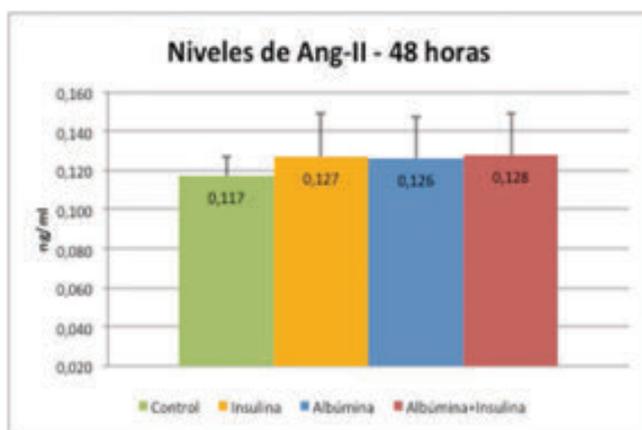


Figura 67. Concentración de Ang-II en lisados celulares en las diferentes situaciones de estudio.

## G. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE FACTORES INFLAMATORIOS Y PRO-FIBRÓTICOS.

Los desequilibrios en el SRA en la ND favorecen los procesos pro-inflamatorios y pro-fibróticos, por lo que se hizo una aproximación a estos efectos estudiando la expresión génica de TGF-  $\beta$  y Fbn como representantes de ambos procesos.

Se observó un incremento en la expresión génica del TGF-  $\beta$  en el grupo de insulina sin alcanzar la significación estadística (control como 1; Ins  $1,39 \pm 0,15$  ratio gen/ $\beta$ -actina;  $p=ns$ ). Por el contrario, en los grupos incubados con albúmina, en presencia o no de insulina, se observó un aumento estadísticamente significativo respecto al control y al grupo de insulina sola (Alb  $2,54 \pm 0,31$ ; Alb+Ins  $2,43 \pm 0,20$ ;  $p<0,001$  vs Control y  $p<0,01$  vs Insulina). *Figura 68.*

La expresión de Fbn disminuyó de modo significativo respecto al control en el grupo incubado con insulina (Control cm 1; Ins  $0,89 \pm 0,02$  ratio gen/ $\beta$ -actina;;  $p<0,005$ ). En los grupos con albúmina se observó un incremento estadísticamente significativo respecto al control y al grupo con insulina sola (Control cm 1; Ins  $0,89 \pm 0,02$ ; Alb  $1,66 \pm 0,17$ ; Alb+Ins  $1,67 \pm 0,15$ ;  $p<0,005$  vs Control y vs Insulina). *Figura 69.*

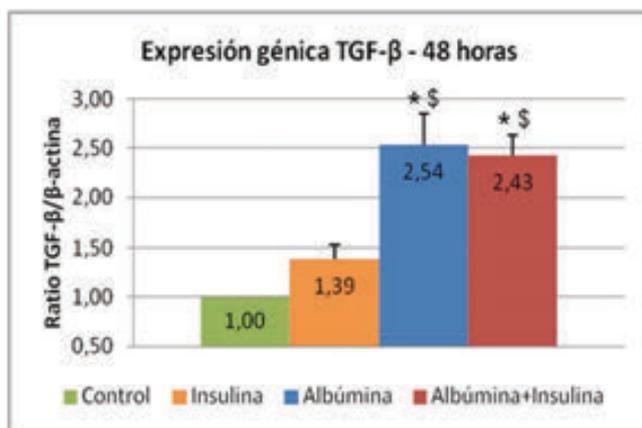


Figura 68. Expresión génica de TGF-β. \*  $p < 0,05$  vs control \$  $p < 0,05$  vs insulina

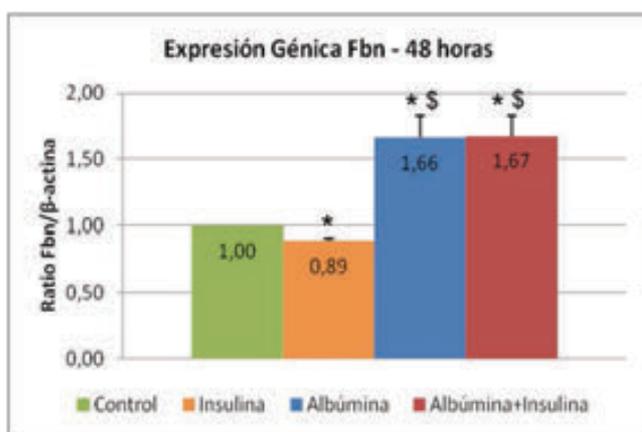


Figura 69. Expresión génica de Fbn. \*  $p < 0,001$  vs control \$  $p < 0,01$  vs insulina

## H. VALORACIÓN DE MUERTE/APOPTOSIS CELULAR

Uno de los principales elementos en la fisiopatología de la podocitopatía en la ND es la muerte celular y secundario desprendimiento de los podocitos.

Para realizar una primera aproximación se realizó un conteo de células en los diferentes tiempos del experimento. Se seleccionaron varios campos por condición y en varias clonas, se realizaron fotos a 20x aumentos en pre-incubación (punto 0) y tras la incubación (punto final). Se detectó que en el grupo de las células incubadas con albúmina hubo un descenso estadísticamente significativo del número de células por campo entre el punto 0 y el punto final (-210%,  $p = 0,01$ ). En cambio en los grupos que se incubaron con insulina se observó un aumento en el número de células, aunque sin que las diferencias fuesen estadísticamente significativas (Ins +80%; Alb+Ins +50%).

Figura 70.

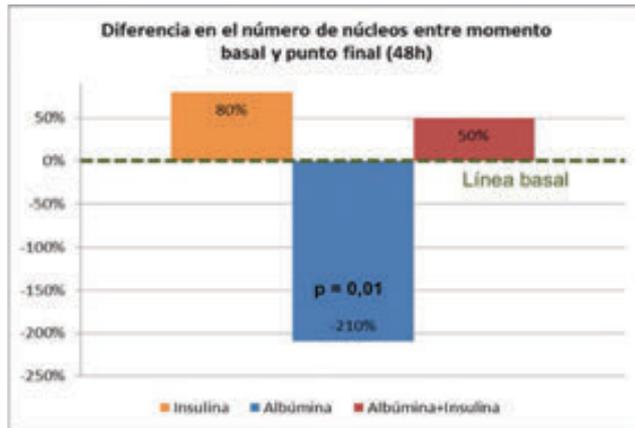


Figura 70. Diferencia entre el número de núcleos celulares entre el punto 0 y el punto final.

Estos resultados iniciales hicieron plantear diferentes hipótesis que lo explicasen: movimiento de las células, muerte celular por necrosis o apoptosis y posterior desprendimiento. Realizando un análisis exhaustivo de las imágenes se detectó en la evolución de uno de los campos estudiados una imagen que sugería que las células podían estar sufriendo procesos de muerte celular. *Figura 71.*

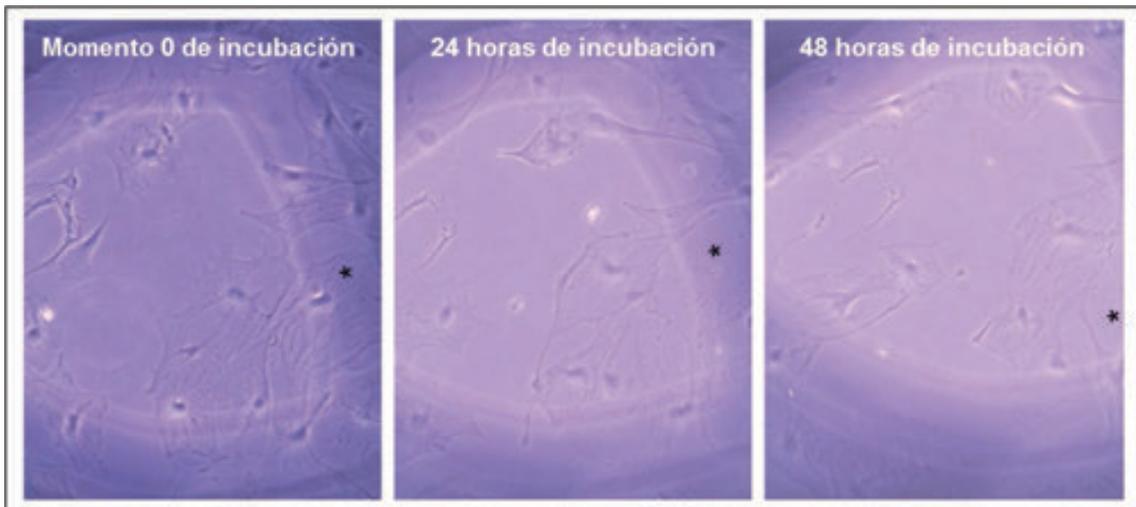


Figura 71. A: Punto 0, B: 24 horas tras el inicio de la incubación con albúmina, C: 48 horas tras el inicio de la incubación con albúmina. El asterisco señala la célula que probablemente ha sufrido un proceso de muerte celular y finalmente se ha desprendido.

Se decidió valorar la apoptosis como causa de la muerte celular y posterior desprendimiento. El grupo de incubación con insulina mostró una disminución de la apoptosis del 22% respecto al grupo control, sin alcanzar la significación estadística. En el grupo incubado con albúmina se detecta un aumento de la apoptosis celular del 19%

no estadísticamente significativo. Llamativamente se observa que en el grupo incubado con insulina en presencia de albúmina el efecto de ésta no es revertido por la insulina, sino que hay un 47% más de apoptosis en el grupo respecto al control y que las diferencias son estadísticamente significativas si comparamos Ins vs Alb+Ins ( $p=0,05$ ).

Figura 72.

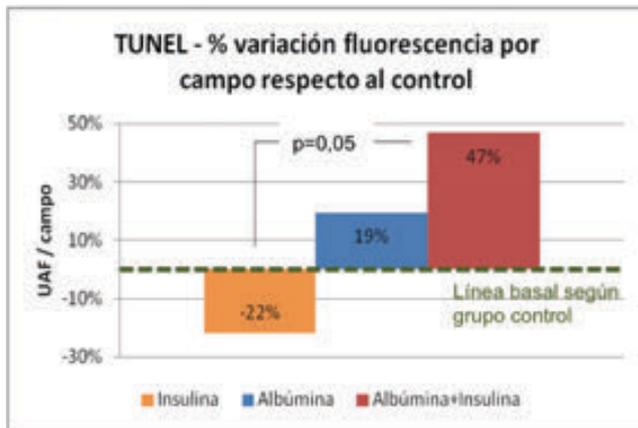


Figura 72. Gráfico que representa % de variación en fluorescencia del TUNEL respecto al control en los diferentes grupos.

## VII. DISCUSIÓN

### A. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

Para los estudios realizados en modelo experimental animal de ND se utilizaron ratones diabéticos NOD. Es un modelo de gran interés ya que desarrolla una DM-1 similar a la humana con una destrucción de células  $\beta$  pancreáticas dependiente de células T y macrófagos principalmente, aunque también participan las células B y células NK (171, 172, 179). Descrito por primera vez en 1980 se ha utilizado principalmente para estudios inmunológicos de la fisiopatología de la DM-1 (71), llegando a considerarse inicialmente la *Piedra Rosetta* de la inmunología de la DM-1 (172). Su utilización para estudios de intervenciones terapéuticas en esta patología es más limitado debido a la necesidad absoluta de insulina para el mantenimiento del animal en condiciones adecuadas durante un periodo de tiempo largo (180) y a las diferencias en la expresión clínica de la DM-1 comparado con humanos: ausencia de desarrollo de cetoacidosis diabética (172) o desarrollo de DM-1 con diferente frecuencia dependiendo del sexo (80-90% de hembras y 10-40% de machos a las 30 semanas) (171). Desde su descripción también ha sido un modelo utilizado para el estudio de ND, ya que se consiguen observar lesiones glomerulares similares a las humanas; no obstante, las diferencias referidas y la dificultad en el manejo explican que no haya sido un modelo ampliamente utilizado para este fin (73, 74, 181-183). En el caso del presente trabajo, los ratones NOD se designaron aleatoriamente a dos grupos: tratamiento con insulina y sin tratamiento, realizando un seguimiento de 21 o 40 días. Es fundamental tener en cuenta el largo tiempo que se mantuvieron sin tratamiento, dadas las características ya explicadas de la cepa, a la hora de interpretar los resultados. Como grupo control se han utilizado ratones NOR, una de las cepas descritas como control de los NOD. Presentan un fondo inmunológico igual a los ratones NOD, pero no desarrollan DM-1 (179).

De los parámetros generales valorados en los diferentes grupos de experimentación destaca el correcto **control glucémico** conseguido con el pellet de liberación de insulina, con niveles de glucemia en el grupo NODins comparables a los

del grupo control. El control glucémico previene los cambios en peso corporal y renal observados en los ratones no tratados.

La valoración de la **PA** se realizó únicamente en los ratones con un seguimiento de 21 días ya que, por las características de la cepa, los ratones diabéticos no tratados del grupo de 40 días, muy caquéuticos, no tolerarían el estrés que suponen estas determinaciones. En los ratones NOD se observó un aumento de la PA sistólica y diastólica, la administración de insulina hizo que los niveles de PA fueron comparables a los del grupo control. La normalización de la PA en presencia del tratamiento con insulina podría ser por dos razones fundamentales: el buen control glucémico o el efecto directo de la insulina. Estudios previos han demostrado que la hiperglucemia en la ND produce activación del SRAA renal, así como la generación de AGEs secundaria al aumento del estrés oxidativo existente en situación de hiperglucemia (14, 184). Por tanto el control de la hiperglucemia podría normalizar el SRAA intrarrenal y ejercer un efecto beneficioso al frenar estos mecanismos que desencadenan HTA.

Además puede existir un efecto de la insulina no dependiente del control glucémico. A nivel molecular ésta produce activación de la eNOS y por tanto aumento de la síntesis de óxido nítrico, con efecto vasodilatador. De modo opuesto aumenta la síntesis de endotelina-1 con efecto vasoconstrictor (185). Estudios en humanos sanos han observado que la administración de insulina manteniendo euglucemia disminuía la PA media (186). Por tanto es evidente que la insulina estimula la liberación de mediadores en la célula endotelial con acciones hemodinámicas que impactan en la regulación de la PA, aunque son necesarios más estudios con la finalidad de elucidar los mecanismos implicados en dicho efecto.

El aumento de la PA en los ratones NOD no se observa en todos los modelos murinos de DM, por lo que es necesario tener en cuenta un componente dependiente de la cepa. Un trabajo que analizaba la influencia del fondo genético en la nefropatía en diferentes cepas demostró la influencia del género y del tipo de inducción de la DM. La PA de animales diabéticos no evoluciona en el mismo sentido si la DM se ha inducido químicamente que si lo ha sido por modificación genética. Salvo en el modelo Akita, en el que sí se observó un aumento en la PA (62), ninguna de las cepas con DM inducida por STZ estudiadas presentaba alta PA. No hay estudios en ratones NOD con las mismas características que el presentado en esta tesis.

En cuanto a la valoración de la **función renal** hay que destacar que el tratamiento con insulina y el buen control glucémico en los ratones diabéticos NOD mantienen los niveles de EUA en el rango de los controles, lo que remarca la trascendencia del control glucémico para frenar la progresión de la ND, hecho ya observado en humanos (3-5). Como elemento fundamental del estudio de la función renal destaca el FG calculado por aclaramiento de inulina, ya que esta técnica es la considerada *gold-estándar* para determinación del FG (175). Dadas las características de la cepa estudiada no fue posible realizarlo en estadios avanzados por el estado general de los animales. El FG calculado aporta interesante información relacionada con los estadios más iniciales de la afectación renal en estos animales. Se observa un incremento en el FG en los animales no tratados, reflejo de un estado de hiperfiltración en la DM no controlada en estadios iniciales (8). En los animales con control glucémico adecuado por la administración de insulina se observa un FG calculado como el de los controles.

Asociado a esta etapa de hiperfiltración se observa un aumento del **peso renal** y del tamaño glomerular en los ratones diabéticos no tratados. Estos hallazgos son coherentes con otros encontrados en la literatura en este mismo modelo, donde además encuentran que el punto máximo de aumento del peso renal es a los 20 días del diagnóstico de DM-1 (74, 180, 183). La hipertrofia renal inicial en la ND también se ha descrito en la literatura tanto en estudio en humanos (187) como en trabajos con otros modelos animales de diabetes (188, 189). El control de la glucemia con insulina previene la hiperfiltración glomerular, representada por los cambios en el tamaño renal y en el FG. Dichos resultados están en concordancia con estudios previos en humanos y ratas diabéticas por STZ donde se demostró que la normalización de la glucosa normalizada la función renal y la hipertrofia renal (190, 191).

Un trabajo realizado en un modelo de roedor con DM de diferentes características orienta hacia la existencia de vías no dependientes del control glucémico que influyen en el desarrollo de la hipertrofia renal. A un roedor obeso que desarrolla una DM similar a la tipo 2, con presencia de hiperinsulinemia e hiperglucemia, le inducen una situación de hipoinsulinemia mediante inyección de STZ. Comparando los animales con hiperinsulinemia y los que presentan hipoinsulinemia, ambos con control glucémico deficiente, observan un aumento del tamaño renal y del índice peso renal/peso corporal (como marcador de hipertrofia renal) en los grupos

hipoinsulinémicos comparado con los hiperinsulinémicos. Es un modelo no comparable con el utilizado en esta tesis ya que es una DM tipo 2 junto con destrucción de células beta pancreáticas, pero sí indica la existencia de posibles vías independientes del control glucémico en la prevención de las alteraciones a niveles renal de la DM (192).

En el estadio temprano de DM estudiado, por tanto, se observa una afectación a nivel de funcionalismo renal, ya que existe un incremento de la EUA y un estado de hiperfiltración junto con un aumento en el tamaño renal representativo de esa alteración. Sin embargo, a nivel **histológico** los cambios son discretos. En la valoración por microscopía óptica existe un aumento en el área del ovillo glomerular y una disminución no significativa del número de podocitos por glomérulo. Estas alteraciones clínicas acompañadas de leves cambios histológicos se han observado previamente en este modelo animal (73, 74, 180, 183). En la evaluación por microscopía electrónica no se observan alteraciones en los ratones NOD. La existencia de albuminuria en los diabéticos no tratados traduce alguna alteración en la barrera de filtración glomerular que no es obvia en el examen histológico, únicamente se observa una disminución del número de podocitos por glomérulo, aunque no significativa. Estudios previos mostraron alteraciones en la composición de la MBG y la MEC glomerular en este mismo tiempo de evolución de DM en estos ratones (180), por tanto es posible que estas alteraciones a nivel molecular estén ocurriendo sin que observemos aún en alteraciones histológicas visibles, pero sí clínicas.

En el estadio tardío el área glomerular de los ratones diabéticos se iguala a los controles, pero existe una disminución significativa del número de podocitos por glomérulo. Este resultado es coherente con la persistencia de una elevada EUA y es un hecho ya descrito en la literatura (43, 47, 48, 51). En el trabajo presentado esta relación se refuerza con el hecho de que exista una correlación negativa entre la EUA y el porcentaje de podocitos por glomérulo. En el examen con microscopio electrónico se observa un aumento del grosor en la MBG y una expansión mesangial en el grupo de ratones diabéticos no tratados. Escasos trabajos estudian la afectación renal por la DM en este modelo en un momento tan tardío de la evolución. En concordancia, Maeda *et al.* encontraron las mismas alteraciones a nivel óptico y electrónico a los 40 días del diagnóstico de DM, en estadios previos no observaron alteraciones (183).

Parte fundamental de este trabajo es la valoración del **ECA2**, sistémico y local, en este modelo animal de DM tipo 1 con alteraciones renales secundarias a la misma. La actividad sérica y urinaria de ECA2 está aumentada en los ratones NOD en estadios precoces (nefropatía incipiente) y tardíos de la enfermedad. El control glucémico con insulina previene este aumento de actividad inducido por la DM. El aumento de la actividad correlaciona con las alteraciones en la función renal observadas en los ratones NOD, la elevada EUA y la hiperfiltración por FG. En el mismo sentido, en otros modelos experimentales, DM inducida por STZ en ratones y ratas, la actividad de ECA2 circulante está aumentada comparada con los respectivos controles (119, 193). En un reciente estudio realizado en pacientes con DM tipo 1 se analizó la actividad de ECA2 circulante y se detectó una elevación de dicha actividad en los pacientes con alteración en la función renal. Los pacientes con actividades del ECA2 más elevadas presentaban una DM de mayor tiempo de evolución, una PA más elevada, microalbuminuria y un peor FG. Además se observó una correlación negativa entre la actividad de ECA2 y el FG (194). Un trabajo previo de nuestro grupo ha demostrado que la actividad de ECA2 circulante en pacientes trasplantados renales correlaciona directamente con la creatinina sérica y la urea (195).

En cuanto a la actividad urinaria de ECA2 también se ve elevada en los ratones NOD no tratados respecto a los NOR y a los tratados que presentan niveles de actividad iguales. Actualmente sólo existe un trabajo que haya estudiado la actividad del enzima en orina en humanos, la mayoría de trabajos en humanos estudian únicamente su presencia en orina. Analizando la presencia de ECA2 en orina, mediante expresión proteica con WB y ELISA, se observó que estaba aumentada en paciente con ERC comparado con controles sanos, y dentro de los pacientes con ERC era mayor en los que tenían ND (196). Un estudio realizado en trasplantados renales observó que los diabéticos tenían una mayor cantidad de ECA2, medido mediante dos técnicas distintas (WB y ELISA) y también una mayor actividad del enzima en orina que en los no diabéticos (197). En pacientes con ND secundaria a DM tipo 2 se observó un aumento en el ARN mensajero de ECA2 en orina comparado con voluntarios sanos. Además se confirmó una correlación positiva entre el ECA2 urinario y el grado de proteinuria que presentaban los diabéticos y un correlación negativa con el FG (198). Recientemente se han estudiado los niveles proteicos de ECA2 en orina en pacientes con metabolismo de la glucosa alterado: glucemia basal alterada, test de tolerancia a la glucosa positivo o

DM tipo 2. Cualquiera de estas alteraciones en el metabolismo de la glucosa se asoció a un aumento en la cuantificación de ECA2 en orina. Además se vislumbró un valor predictivo de desarrollo de albuminuria y del desarrollo de DM tipo 2 (199).

En nuestro caso la correlación entre la actividad sérica y urinaria de ECA2 y el FG en estadios iniciales en los ratones NOD no tratados fue positiva. En estadios más avanzados no se pudo realizar el FG. La correlación entre ambas actividades y la EUA fue positiva en los 2 estadios. Estos hallazgos sugieren que el origen del ECA2 presente en orina es por filtración plasmática por la alteración de la barrera de filtración glomerular, ya que se confirmaron correlaciones positivas con el FG y la EUA. Por tanto, la actividad urinaria podría ser un reflejo de la actividad enzimática circulante. Sin embargo hay estudios que muestran un incremento en la actividad urinaria y no en la plasmática (196), lo que sugeriría un componente de secreción por las células de la nefrona. Es un tema aún no aclarado.

La actividad enzimática de ECA2 en córtex renal en los ratones diabéticos NOD no tratados sigue el mismo perfil que la actividad plasmática y urinaria. Así mismo, la expresión proteica de ECA2 está elevada en los ratones diabéticos. La actividad cortical del ECA2 en modelos de ND no ha sido ampliamente estudiada. Diversos estudios en diferentes modelos de DM (STZ, db/db y Akita) observaron un aumento en la expresión de ECA2 cortical (116-118). Además, en los modelos STZ y db/db la actividad cortical de ECA2 correlacionaba con su expresión proteica (117, 118). Posteriormente, se publicó un estudio realizado en dos modelos de DM: tipo 1 con ratas con DM inducida por STZ y tipo 2 con ratas obesas (*Zucker Diabetic Fatty*). En ambos modelos se observó una disminución de la actividad enzimática y la expresión proteica de ECA2 en glomérulo en los animales diabéticos (200). Estas diferencias se pueden explicar por el diferente análisis realizado. En diversos trabajos se ha demostrado que el ECA2 está aumentado en córtex renal en ratones diabéticos, fundamentalmente a nivel tubular (110, 116, 117). Dado que el córtex renal contiene fundamentalmente túbulos, su análisis parece corresponder más con el compartimento tubular que el glomerular. Tikellis *et al.* en ratas con DM inducida por STZ observaron una disminución de la expresión de ECA2 a nivel tubular con un aumento de la expresión glomerular. En este caso era una DM muy evolucionada (establecida, 24 semanas de diabetes) respecto a los dos puntos de estudio utilizados en los experimentos de esta tesis, por lo que no es

comparable (115). En este sentido un trabajo realizado con biopsias de pacientes con DM tipo 2 de larga evolución (mediana de 11 años) mostró una disminución de expresión tubular y glomerular de ECA2 respecto a los sanos (133). Por tanto, es posible que en una DM más evolucionada el perfil de ECA2 se modifique, pero dadas las características del modelo utilizado en esta tesis esta valoración no es posible.

El elemento central de los estudios realizados con este modelo murino de DM tipo 1 es el estudio del ECA2. Observamos que existe un aumento de expresión proteica de ECA2 en córtex renal y de su actividad en suero, orina y córtex renal. El ECA2 degrada la Ang-II a Ang-(1-7) (106, 107), por tanto previene el acúmulo de Ang-II y favorece la formación de Ang-(1-7) que tiene acciones principalmente vasodilatadoras, natriuréticas y anti-proliferativas (201). En diferentes modelos animales de diabetes KO para ECA2 se ha demostrado que su ausencia empeora las lesiones y la evolución de la afectación renal por la DM (118-120), incluso en un modelo animal no diabético KO para el enzima se observaron lesiones renales compatibles con las de una ND (113).

Este papel protector del ECA2 puede ser debido al aumento en la formación de Ang-(1-7) o a la disminución de la Ang-II por su degradación ya que la acción protectora de la Ang-(1-7) es controvertida. Esta controversia se basa en que la infusión directa en ratones diabéticos por inyección de STZ acelera las lesiones renales, posiblemente porque en altas dosis aumenta su afinidad por los receptores AT1-R de la Ang-II (129, 201).

Otra de las posibles explicaciones de la nefroprotección del ECA2 en la ND es la disminución en la formación de Ang-II. Esto se ha demostrado en los modelos KO para ECA2 a los que se administra un ARA-2 observando una mejoría en las alteraciones renales, por tanto reafirman que los daños observado son por aumento de Ang-II (114, 118, 120).

Es interesante remarcar que el ECA2 tiene funciones más allá de la catalítica como angiotensinasa. El dominio intracelular del ECA2 es susceptible de fosforilación e interacciona con la calmodulina (202). Dado que la calmodulina es un regulador de la transducción de la señal intracelular de calcio regulando diferentes procesos biológicos, se podría pensar que el ECA2 mediante esta interacción puede influir en procesos de inflamación o metabólicos.

Otra de las posibles funciones independientes de su acción como proteasa es debida a su homología con la colectrina (202). La colectrina regula la expresión en la

membrana celular de un transportador de aminoácidos existente en el borde en cepillo de las células tubulares proximales. Esta misma función parece realizarla el ECA2 en el borde en cepillo de los enterocitos del intestino delgado (202). Hasta el momento no se ha demostrado una relación entre ECA2 y la expresión de transportadores de aminoácidos en el túbulo (203), pero el hecho de que estudios en ND experimental observen un aumento en la expresión de ECA2 tubular, principalmente en proximal (116), puede hacer pensar en una posible relación aún no encontrada.

Otra función del ECA2 en la que se está empezando a profundizar es la interacción entre el ECA2 y las integrinas. Las integrinas con proteínas de membrana que actúan como moléculas de señalización bidireccionales participando en la regulación de la proliferación celular, procesos de diferenciación y migración entre otros (204). El dominio extracelular del ECA2 interacciona con estas proteínas actuando a diferentes niveles funcionando como sustrato de la adhesión celular dependiente de integrinas. Además se ha observado que su presencia aumenta los niveles de elementos fosforilados de la cascada de señalización de las integrinas, por tanto parece tener un papel en la modulación de estas vías (204).

El ECA2 urinario parece reflejar la situación del enzima a nivel sistémico y renal, al menos en este modelo de afectación renal por DM tipo 1 y valorando conjuntamente los diferentes datos de la literatura. En este sentido, se podría plantear su papel como marcador no invasivo de alteraciones renales en la ND. Son necesarios estudios específicos con la finalidad de elucidar si la detección de dicho enzima a nivel urinario puede ser un marcador de progresión de la ND.

Por lo tanto, la elevación del ECA2 en estados de ND no controlada, como en el modelo utilizado en esta tesis, parece traducir un intento de mecanismo compensador del SRAA frente al aumento de Ang-II observado en esta patología. La normalización de la glucemia conlleva una normalización de los parámetros de función renal (EUA, FG) que se acompaña de una regulación de la hiperactivación del ECA2. Las probables acciones protectoras del ECA2 no parecen estar medidas su acción sobre el metabolismo de la Ang-II. Por otro lado, el aumento de la actividad de ECA2, circulante y urinario, podría ser un marcador que traduzca una situación de hiperestimulación del SRAA en la ND.

## **B. MODELO CELULAR *IN VITRO***

Diversos trabajos han estudiado el SRAA podocitario demostrando que posee toda la maquinaria necesaria para producir Ang-II, el principal efector del sistema (33, 34). En presencia de algunas de las alteraciones de la fisiopatología de la ND, como la hiperglucemia, existen variaciones en la expresión de los diferentes elementos del SRAA intrapodocitario (142, 144, 154). En el momento en que la modulación de este sistema es fundamental para frenar la evolución de la ND, su estudio en los podocitos adquiere una gran relevancia.

Los podocitos en cultivo son células sensibles a la insulina desde el inicio de su diferenciación y son las únicas células de la barrera de filtración glomerular que presentan esta sensibilidad (205). Estudios en podocitos KO para el receptor de la insulina han demostrado un incremento compensador en la expresión génica del receptor para IGF-1 cuyo ligando también es la insulina, indicando lo esencial que resultan las vías de señalización de esta hormona en los podocitos (94). EL modelo de ratón no diabético que únicamente es KO para el receptor de insulina en los podocitos desarrolla, a las 5 semanas de vida, albuminuria con pérdida pedicelar. A las 8 semanas de vida presenta además lesiones renales comparables con la ND: aumento de MEC, engrosamiento de la MBG, esclerosis y además apoptosis podocitaria (94).

Todo ello confiere gran interés al estudio de la respuesta de estas células a la insulina y en concreto de diferentes elementos del SRAA, que en esta tesis se focaliza en el enzima ECA2.

Los primeros resultados presentados corresponden al **estudio de la respuesta de los podocitos a la insulina en diferentes concentraciones** escogidas dentro de los rangos citados en la literatura (205, 206). La incubación se realizó durante un periodo inicial de 24 horas en presencia de un medio con alta concentración de glucosa (25mM) remedando una situación de hiperglucemia.

Se observó un incremento en la expresión génica, proteica (estudiada por WB) y en la actividad enzimática del ECA2 en el grupo incubado con la concentración de insulina más elevada (200nM). En el grupo incubado con 100nM de insulina se detectó un incremento en la expresión proteica y en la actividad enzimática del ECA2, pero sin detectarse incremento en la expresión génica. El gen del ECA2 es un gen con expresión constitutiva en el podocito, es decir, se expresa en condiciones basales, pero a la vez es

inducible por la presencia de diversos estímulos, en este caso de la insulina a una concentración de 200nM, aunque no a concentraciones menores (100nM). La expresión proteica se eleva ya en presencia de la concentración baja de insulina por lo que es posible que existan mecanismos de control de la traducción que aumenten la velocidad o frecuencia de la misma en presencia de este estímulo sin necesidad de incrementar la expresión génica.

Resultaba interesante valorar la **respuesta en el tiempo a este estímulo** por lo que se escogieron 2 puntos de tiempo complementarios a 24 horas: 1 hora, para estudiar una respuesta más temprana, y 48 horas para el estudio del mantenimiento de la respuesta. No se realizaron estudios más prolongados por el posible efecto de mantener tanto tiempo las células en cultivo sobre la correcta diferenciación de las mismas (20, 177). Se decidió realizar el estudio con la concentración de insulina de 200nM ya que con ella se observaban los efectos más estables y completos.

Se detectó respuesta, que se podría denominar precoz, a la incubación con insulina tras 1 hora con un incremento en la expresión génica, proteica (estudiada por WB e IF) y en la actividad enzimática del ECA2 intrapodocitario. Así este mismo efecto se mantuvo a las 48 horas de incubación, aunque con menor intensidad que en las 24 horas.

La presencia de ECA2 en podocitos se ha demostrado tanto en estudios de colocalización en glomérulo (110) como en cultivo de podocitos murinos observando la degradación de Ang-II en Ang-(1-7) dependiente de dicha enzima (34). A pesar de ello, los niveles de Ang-(1-7) detectados se encontraban en el límite de detección de la técnica, por lo que no se observaron diferencias significativas en su concentración entre muestras con y sin inhibidor específico del ECA2 (DX-600). Pero por otro lado, la presencia de DX-600 disminuyó significativamente la degradación de Ang-II, como signo indirecto de la inhibición de la actividad del ECA2 (34). Aunque estos estudios describen la presencia de ECA2 en los podocitos (34, 110), no hay estudios en la literatura focalizados en las variaciones del ECA2 en el podocito en un contexto diabético lo que confiere un especial interés al trabajo presentado.

El aumento de ECA2 a nivel podocitario en respuesta a la insulina podría tener una elevada trascendencia en la función glomerular en la DM. Un reciente e interesante

trabajo describe específicamente la trascendencia del ECA2 en los podocitos. Los autores desarrollaron un modelo de ratón con sobre-expresión de ECA2 únicamente a nivel podocitario al que se le indujo DM mediante inyección de STZ (153). En el glomérulo (analizado de modo aislado por microdissección glomerular) la actividad de ECA2 y la expresión proteica fueron mayores que en los controles diabéticos no transgénicos confirmando la sobre-expresión del enzima a nivel podocitario. En un punto precoz de seguimiento el grupo transgénico no presentaban diferencias significativas en el grado de albuminuria respecto al control no diabético. Los diabéticos no transgénicos, contrariamente, presentaban elevados niveles de albuminuria. Posteriormente los niveles de albuminuria se igualaron. En cuanto a los hallazgos histológicos, de un modo precoz, la expansión mesangial, la disminución en la nefrina y sinaptopodina y la pérdida podocitaria resultó significativamente menor en los ratones que sobre-expresaban ECA2 comparado con el grupo diabético no transgénico. En un punto más tardío de la evolución estas diferencias desaparecieron. Lo mismo ocurrió con los niveles corticales de TGF- $\beta$  (153). Los autores de este trabajo postulan que la ausencia de persistencia del efecto en momentos más tardíos podría ser debido a que la actividad intrapodocitaria no está suficientemente elevada para contrarrestar los efectos deletéreos de la Ang-II (153).

Si en un modelo animal con aumento de ECA2 en el podocito por modificación génica se observa un papel nefroprotector de esta elevación en cuanto a progresión de la ND, podemos pensar que el podocito es capaz de aumentar la expresión de ECA2 en presencia de insulina, no sólo en el modelo *in vitro* mostrado en esta tesis, sino también *in vivo* con las mismas consecuencias protectoras.

Posteriormente se quiso completar el estudio añadiendo un elemento más presente en la ND, la **albuminuria**. En la barrera de filtración glomerular la mayoría de las proteínas plasmáticas no llegan a alcanzar el DF, por tanto no llegan a contactar con el podocito debido a que quedan retenidas en la luz capilar, fundamentalmente por la barrera que supone la MBG (207). En el caso de la ND esta barrera también se encuentra dañada, por lo que la exposición del DF y el podocito a las proteínas es mayor. Diversos estudios se han centrado en valorar la respuesta del podocito en cultivo a la presencia de una sobrecarga de albúmina, pero ninguno ha valorado la respuesta del SRAA. En este trabajo valoramos si la respuesta a la insulina observada se mantenía en

presencia de albúmina. Se utilizó una concentración de albúmina de 10mg/ml ya que ha sido la más ampliamente utilizada previamente (208, 209). Los estudios de incubación con insulina en presencia o no albúmina se realizaron tras 48 horas de incubación para valorar una exposición prolongada (“crónica”) a esta situación.

En primer lugar se confirmó la respuesta a la insulina (200nM) tras 48 horas de incubación mostrando un incremento significativo de la expresión génica, proteica (por WB e IF) y actividad enzimática del ECA2. La incubación con albúmina sola no modificó la expresión génica, proteica ni la actividad del enzima. De modo interesante al añadir albúmina a la incubación con insulina se obtuvieron resultados diferentes a los observados con la insulina aislada. Encontramos una discordancia evidente entre los resultados de expresión génica respecto a la expresión proteica de ECA2 mediante WB y su actividad enzimática. En consecuencia se plantearon varias hipótesis. Es conocido que algunas proteínas requieren de un citoesqueleto intacto para ser transportadas a la membrana celular. Un ejemplo es el receptor de glucosa GLUT-4 que se encuentra en vesículas citoplasmáticas y es trasladado a la superficie celular para su funcionamiento. En presencia de citocalasina D, que causa disrupción del citoesqueleto de actina, no se produce ese transporte y se observa una diferente distribución del receptor con respecto al control que presenta un citoesqueleto intacto (205). Sabiendo que la presencia de albúmina en el medio es capaz de alterar la estructura de actina (209, 210) evaluamos la integridad de esta estructura y su posible relación con el ECA2 en las diferentes situaciones. En ninguno de los grupos estudiados se observó co-localización de ambos elementos, sí se detectó un cambio en la distribución de las fibras de actina hacia la periferia celular en los grupos incubados con albúmina (grupos Alb y Alb+Ins), pero sin relación con la distribución del ECA2. Estas alteraciones en la distribución de las fibras de actina fueron comparables con las encontradas en la literatura en presencia de albúmina (209, 210) y en presencia de altas concentraciones de Ang-II (161).

Se realizó también un estudio de co-localización con RE. El RE es un compartimento intracelular con un papel imprescindible en el plegamiento y maduración de las proteínas que se van sintetizando en la célula. El podocito tiene un gran número de estas organelas en su cuerpo celular representativo del alto nivel de actividad anabólica/catabólica que presenta (17). En el estudio realizado se observa co-localización evidente entre el ECA2 y el RE (mediante su marcador calnexina) en los tres grupos de intervención (Ins, Alb, Alb+Ins). Esta co-localización fue claramente más significativa en el grupo Alb+Ins. Este hallazgo parece traducir el aumento de las

proteínas sintetizadas (ECA2) con necesidad de procesamiento ante el estímulo de la insulina junto con una disminución de la capacidad del RE de manejar esta sobrecarga en presencia de albúmina. Dichos resultados están en concordancia con estudios publicados previamente (210, 211).

En estas mismas condiciones (insulina con o sin albúmina) se estudió su influencia en la **expresión génica de otros elementos de SRAA**.

En el grupo Ins se observó una disminución en la expresión génica de ECA sin cambios en la expresión de AT1-R. De modo contrario se encontró un aumento de la expresión génica de todos los elementos del SRAA estudiados (Agt, ECA, AT1-R, AT2-R) en los grupos incubados con albúmina que resultó significativo respecto al grupo control y al de insulina sola. Por tanto, parece que la presencia de insulina no es capaz de revertir el efecto observado con la albúmina, sino que hay un aumento significativo de ECA, ambos receptores y Agt en el grupo Alb+Ins respecto al grupo que se incubó con insulina sola.

Completando en esta valoración del SRAA se realizó un cociente entre la expresión génica de ECA y ECA2. Se detectó que existe un balance positivo a favor de ECA2 en el grupo incubado con insulina y que este balance es a favor de ECA en los grupos con presencia de albúmina.

Estos resultados, conjuntamente con los observados en los estudios centrados en el ECA2, indican que la presencia de insulina induce una disminución del cociente de la expresión génica del ECA/ECA2 y un perfil de expresión génica del SRAA que favorece un efecto “anti-Ang-II”. La presencia de albúmina produce el efecto contrario, un efecto “pro-Ang-II”.

El Agt es el primer péptido en la cascada del SRAA y su presencia en podocitos se demostró detectando ARNm en una línea celular de podocitos de ratón (33). Diferentes estudios han mostrado que la hiperglucemia incrementa el ARN mensajero y la expresión proteica del Agt en podocitos en cultivo (144, 212). En el caso del estudio presentado todas las células tenían un medio con glucosa elevada por lo que las diferencias expuestas no se podrían atribuir a la glucosa del medio. No hay estudios en la literatura que lo valoren en las mismas condiciones que las empeladas en esta tesis.

La detección de expresión génica de ECA es un hecho a destacar ya que la presencia o ausencia de ECA en los podocitos es un tema controvertido. Diferentes estudios han demostrado la presencia de este enzima con métodos directos e indirectos.

Algunos grupos han detectado expresión génica de ECA (33, 144) y/o expresión proteica (34, 144). También se evidenció la presencia de ECA con un método indirecto, detectando la generación de Ang-II sensible a la acción de un IECA (captopril). En el mismo trabajo se estudió el papel de ECA en la degradación de Ang-(1-7), células co-incubadas con Ang-II y captopril mostraron una tendencia a acumular Ang-(1-7) (34). Contrariamente, Ye *et al.* no encontraron expresión de ECA en podocitos utilizando técnicas de IF e inmunomarcaje coloidal con oro sobre tejido renal de ratón (110).

Otras investigaciones se han centrado en el estudio de la posible actividad de ECA en la generación de Ang-II. Yoo *et al.* mostraron que la presencia de alta glucosa incrementaba niveles de Ang-II de modo dependiente de ECA, quimasas y PKC aunque no detectaron elevación de los niveles de ECA en presencia de alta glucosa (144).

Durvasula *et al.* confirmaron la elevación de Ang-II en presencia de alta glucosa y de modo dosis-dependiente, pero no obstante la pre-incubación con captopril fue incapaz de antagonizar la generación de Ang-II secundaria a la glucosa elevada, en cambio la presencia de un inhibidor de las quimasas si, lo cual sugiere el papel de vías no dependientes de ECA en la producción de Ang-II en esta situación (142). La participación de vías no dependientes de ECA en la generación de Ang-II en podocitos se observó en otro estudio en que la incubación con captopril de podocitos humanos en cultivo no reducía la concentración de Ang-II (33). Este mismo grupo estudió los efectos del estrés mecánico en el SRAA en cultivo primario de podocitos. Encontraron un incremento significativo en los niveles de Ang-II a las 24 horas del inicio del experimento y estos cambios se mantuvieron tras 72 horas. La preincubación con un inhibidor del ECA no bloqueó la generación de Ang-II, lo cual sugiere de nuevo que vías no dependientes de ECA participan en su formación (37).

Los podocitos expresan los dos receptores de Ang-II, AT1-R y AT2-R, pero los efectos de la Ang-II observados sobre ellos son principalmente a través del AT1-R (33, 148, 149).

Ratas transgénicas que sobre-expresaban AT1-R únicamente en los podocitos presentaban albuminuria asociada a alteraciones podocitarias no observadas en los controles: formación de pseudoquistes en podocitos, posteriormente borramiento pedicelar, despegamiento y pérdida de podocitos; finalmente se desarrollaban adhesiones a la cápsula de Bowman (35). Suzuki *et al.* desarrollaron diferentes experimentos para valorar el papel de los receptores AT1-R y AT2-R en la regulación de la barrera glomerular. Uno de ellos se centraba en el efecto directo de la Ang-II sobre

las moléculas del DF. Se observó una disminución de la expresión génica de nefrina que únicamente se prevenía por la incubación con un antagonista del AT1-R. Experimentos *in vivo* mostraron resultados similares y además una relación con la severidad de la albuminuria (165).

Ratas diabéticas tratadas con antagonistas del AT1-R mostraron un mayor número de podocitos por glomérulo que los animales no tratados sugiriendo un papel renoprotector del bloqueo del SRAA a nivel podocitario (213). Estos datos evidencian que el incremento en la señal del AT1-R puede llevar al desarrollo de proteinuria, alteraciones estructurales y progresión hacia la glomeruloesclerosis.

La presencia de AT2-R en la membrana de podocitos se ha demostrado en diferentes trabajos (33, 148, 149), pero la trascendencia del AT2-R en el podocito aún está por aclarar ya que existe escasa literatura focalizada en su función en podocitos (165).

Por tanto los hallazgos presentados en las células en un “ambiente diabético” (glucosa elevada y albúmina en el medio) parecen coherentes con la fisiopatología del SRAA en la podocitopatía diabética. El hecho de que la insulina, fármaco fundamental en el tratamiento de los dos tipos de DM, module este sistema en el podocito hacia un perfil “anti-Ang-II” resulta de elevado interés, teniendo en cuenta además la pérdida de este efecto en presencia de albúmina.

Existen diversos estudios y revisiones focalizados en la relación entre vías de señalización de insulina y del SRAA, pero escasos centrados en lo que ocurre en el riñón (214, 215). Un interesante trabajo en células tubulares en cultivo evidenció por primera vez la existencia de un *cross-talk* entre las vías de señalización del SRAA y de la insulina (216). Es obvio que este estudio y el presentado en la tesis no son equiparables por diversas razones: las células tubulares y los podocitos son células de la misma estirpe, pero los últimos son células muy especializadas no comparables y en el artículo no estudian la influencia de la insulina en el SRAA del mismo modo ni evalúan las mismas consecuencias. Pero ese trabajo sí pone de manifiesto la existencia de interacción entre el SRAA y las vías de señalización de insulina en el riñón. Es de mención que la capacidad de la insulina de modular directamente el SRAA ha sido escasamente estudiada. En este sentido los resultados presentados en esta tesis resultan interesantes y remarcan la necesidad de explorar esta relación con mayor profundidad ya que tanto el SRAA como la insulina son fundamentales en la fisiopatología y tratamiento en la ND.

Continuando con la valoración del SRAA en el podocito en respuesta a la insulina se realizó un ELISA para cuantificar la Ang-II en la célula. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, tampoco una tendencia. Está descrita en la literatura la presencia de Ang-II en el podocito (33, 34). Además en el FG inicial en el túbulo proximal la concentración de Ang-II alcanza unos elevados niveles que no se pueden justificar únicamente por la filtración del péptido del plasma, sino que probablemente los podocitos contribuyan en cierta medida con su propia síntesis de Ang-II (33). Dado que existen vías de formación y degradación de Ang-II no dependientes de ECA/ECA2 en el podocito es posible que los cambios observados en estas enzimas no causen variaciones en su concentración (33, 34, 37, 142). Otro elemento a tener en cuenta en la valoración de los resultados obtenidos en la determinación de Ang-II en los lisados celulares es que probablemente la concentración del péptido presente en estas células en estas condiciones estaba en límite bajo de detección de la técnica.

El desequilibrio del SRAA en el ND favorece los **procesos pro-inflamatorios y pro-fibróticos** por lo que se realizó una aproximación a estos efectos estudiando la expresión génica de dos elementos que representan ambos procesos: el TGF- $\beta$  y la Fbn.

En el grupo incubado con insulina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, por el contrario, en el grupo incubado con albúmina se observó un aumento del mRNA del TGF- $\beta$  respecto a Control y Ins. Este efecto no pudo ser revertido con la presencia de insulina. En cuanto a la expresión génica de Fbn ésta disminuye significativamente en presencia de insulina respecto al control, sin embargo en el grupo con albúmina aumenta significativamente sin que la insulina consiga revertir este efecto.

El incremento de TGF- $\beta$  en presencia de albúmina observado en este trabajo confirma datos ya descritos en la literatura (169, 217, 218). El hecho de que esta elevación no sea revertida por la presencia de insulina tiene gran importancia ya que el TGF- $\beta$  tiene consecuencias en la fisiopatología de la podocitopatía diabética. Un aumento de esta citoquina conduce a la desdiferenciación del podocito con pérdida de proteínas clave como la nefrina o la ZO-1 (36, 208, 219), una reorganización del citoesqueleto (219) y un incremento de la permeabilidad de la monocapa celular a la albúmina (36, 219). La secreción de la citoquina al medio por el podocito, utilizando ese medio en un cultivo de células mesangiales, origina una transformación fenotípica de las células mesangiales (208). Por otro lado, su incremento favorece la apoptosis

podocitaria (36, 220), por tanto globalmente favorece la pérdida podocitaria, hecho patológico con gran trascendencia en la ND.

La Fbn es una glicoproteína presente en la matriz mesangial y que es producida por el podocito contribuyendo así a la síntesis de la matriz mesangial (221, 222). Su incremento está asociado con el proceso de expansión de matriz mesangial, esclerosis y fibrosis glomerular en la ND (223).

En un estudio centrado en la TEM en podocitos se incubaron las células (podocitos de ratón) con TGF- $\beta$ 1. Detectaron inducción de la expresión de componentes de la matriz intersticial, entre ellos, la Fbn. Este hecho se acompañó de cambios fenotípicos de la TEM: disminución de la expresión de P-cadherina como marcador epitelial fundamental del podocito, nefrina y ZO-1, además de aumento en la expresión de desmina (marcador mesenquimal). En el mismo trabajo, estudios funcionales demostraron que la incubación con TGF- $\beta$ 1 incrementa la permeabilidad a la albúmina de la monocapa de podocitos. Las mismas alteraciones fueron encontradas en estudios *in vivo* (36).

La capacidad de la insulina de reducir su expresión génica observada en este trabajo, por tanto, puede ser un factor protector, que desaparece en el momento en que existe una elevada concentración de albúmina en el medio.

Resulta interesante valorar conjuntamente estos dos elementos, TGF- $\beta$  y Fbn, ya que se ha definido claramente su relación en diversos trabajos. En cultivos de células epiteliales glomerulares se ha descrito un incremento en la expresión génica de Fbn secundaria un aumento de TGF- $\beta$  exógeno (36, 224) o causado por la presencia de LDL colesterol oxidado o de niveles elevados de glucosa (222, 225). Este incremento en Fbn secundario al TGF- $\beta$  es dosis y tiempo-dependiente (219).

Aunque los estudios presentados en esta tesis son descriptivos, no mecanísticos, se podrían extrapolar los datos observados en la literatura. El incremento de Fbn observado en presencia de albúmina podría ser secundario al aumento del TGF- $\beta$  y la insulina no consigue revertir dicho efecto en presencia de albúmina.

Múltiples estudios han demostrado que la **pérdida podocitaria** en un hecho clave en la ND (42, 43, 47-49, 51, 226) por lo que en el trabajo presentado se realizó una valoración de la misma. La primera aproximación fue realizar una contabilización de los núcleos en el momento del inicio de la incubación y contabilizarlos de nuevo tras la incubación durante 48 horas. Se detectó una disminución significativa en el número

de núcleos en el grupo incubado con albúmina. También se observó un incremento en el número de núcleos en los grupos incubados con insulina, tanto sin como con albúmina. Es sabido que los podocitos maduros no tiene la capacidad de proliferar debido a la expresión de inhibidores de ciclinas que impiden la entrada de la célula en el ciclo celular (17), por tanto, una de las explicaciones posibles para estas variaciones observadas fue que por la movilidad de las células se modificase el número de núcleos por campo estudiado. Pero en algunos campos se observaron imágenes compatibles con un posible proceso de muerte celular con despegamiento de la célula (*Figura 71*). Estos hallazgos nos llevaron a estudiar la muerte celular, en forma de apoptosis, pensando que durante la incubación las células sufren un proceso de apoptosis y algunas de ellas se desprenden previamente al conteo final y otras están sufriendo aún este proceso.

El grupo de células incubadas con insulina mostró una disminución evidente, aunque no significativa estadísticamente, de la apoptosis respecto al control. En los grupos incubados con albúmina se observó un aumento de la fluorescencia en ambos, más marcada en el grupo Alb+Ins, que fue significativamente mayor que en el grupo Ins.

La disminución de apoptosis en el grupo incubado con insulina respecto al control pone de manifiesto una posible función protectora anti-apoptótica de la insulina en estas células. En concordancia, estudios realizados en otras células renales han objetivado esta función protectora. En células mesangiales se ha demostrado que la insulina *per se* tiene efecto anti-apoptótico dependiente de la activación de la vía PI3K/Akt e inhibición de la vía ERK/MAPK la cual se encuentra estimulada durante la apoptosis (227). Dicho efecto también se ha observado en células tubulares donde la incubación con insulina demostró una disminución de la actividad de la caspasa-3 (pro-apoptótica) mediada por PI3K/Akt (228). Aunque no existen estudios específicos sobre la influencia directa de la insulina en la supervivencia celular en podocitos se podría suponer que esta hormona tiene los mismos efectos en ellos. Esta hipótesis se ve apoyada por diferentes estudios publicados en podocitos. La incubación con estatinas en el medio de cultivo protege a los podocitos de la pérdida de nefrina y de la apoptosis secundaria a la presencia de colesterol LDL oxidado, y este efecto protector es dependiente, al menos en parte, de la vía PI3K/Akt (229). Otro estudio demostró que la incubación con IGF-1 (insulin growth factor 1), hormona que actúa tanto a través de su receptor específico como a través del receptor de insulina, disminuye la apoptosis podocitaria por la activación de la misma vía, PI3K/Akt (230). Con estos datos de la

literatura se podría suponer que, en el experimento presentado, la disminución de la apoptosis en presencia de insulina podría ser un efecto directo de la misma mediado, al menos en parte, por PI3K/Akt.

El aumento de la apoptosis podocitaria en presencia de albúmina es un hecho ampliamente descrito en la literatura. Está demostrado que el podocito tiene la capacidad de endocitosis de albúmina (209, 231, 232) en consecuencia, en presencia de altas concentraciones de albúmina ésta produce efectos deletéreos en la célula. La sobrecarga de albúmina producida en un modelo experimental de rata o la exposición en el medio de podocitos en cultivo mostró, junto con otras alteraciones como borramiento de pedicelos, pérdida de nefrina y alteraciones del citoesqueleto, un aumento de la apoptosis podocitaria mediado por activación de TGF- $\beta$  y la vía efectora MAPK (233). La activación de la vía de las caspasas, concretamente las caspasas 3 y 12, tienen un papel principal en la apoptosis podocitaria secundaria a albúmina (220, 231, 234). El incremento de TGF- $\beta$ , que se detecta en presencia de sobrecarga de albúmina (208), también activa la vía de las caspasas (220). Otra de los factores desencadenantes de este proceso es que la sobrecarga de albúmina causa un aumento de concentración de calcio intracelular a través del canal de calcio TRPC6 (210).

Se podría concluir que el efecto anti-apoptótico de la insulina desaparece o es insuficiente para compensar el aumento de la apoptosis secundaria a la presencia de albúmina y por tanto la pérdida podocitaria, hecho clave en la evolución de la ND como demuestran muchos trabajos publicados.

En biopsias de pacientes con DM tipo 1 y diferentes grados de albuminuria se demostró que, apareados por edad, los diabéticos presentaban un menor número de podocitos, independientemente de edad o duración de la DM, en comparación con controles sanos (42). Otros trabajos focalizados en pacientes con DM, tanto tipo 1 como 2, mostraron una asociación entre la pérdida de podocitos y el grado de EUA (47, 48). Recientemente se ha publicado un exhaustivo estudio con microscopía electrónica valorando la fenestración de los capilares glomerulares y los podocitos en pacientes con DM tipo 2. Encontraron que el desprendimiento podocitario correlaciona positivamente con el incremento de la albuminuria. En cambio, el número de podocitos no correlacionaba con la albuminuria, indicando la implicación de la lesión podocitaria, no sólo su pérdida, como el factor estructural principal en la alteración de permeabilidad glomerular en la ND (226).

Todos estos datos subrayan el significado de la pérdida podocitaria en la evolución de la ND y, por tanto, el potencial del tratamiento con insulina para preservar la normalidad a este nivel.

## VIII. CONCLUSIONES

1. En un modelo experimental de DM tipo 1 que desarrolla afectación renal, el ratón NOD, se observa una normalización de las alteraciones a ese nivel con el control glucémico mediante insulina.
2. En la DM no controlada del ratón NOD se observa una elevación de la actividad enzimática del ECA2 a nivel sistémico y renal.
3. El control glucémico con insulina de los ratones NOD diabéticos iguala los niveles de ECA2 a los del control no diabético.
4. La elevación del ECA2 en la diabetes no controlada parece traducir la activación del SRAA típica de esta patología.
5. El tratamiento con insulina en la DM del ratón NOD parece tener un papel protector a nivel renal, al menos en parte, secundario al buen control glucémico.
6. La insulina incrementa los niveles de ECA2 intrapodocitarios sugiriendo un papel nefroprotector en la ND.
7. La insulina tiene una influencia directa sobre la expresión del SRAA intrapodocitario, pero su influencia desaparece en presencia de albúmina.
8. La insulina protege frente a la apoptosis podocitaria, pero no en presencia de albúmina.
9. La insulina tiene un papel protector sobre el podocito que desaparece en presencia de albúmina, por tanto su utilización precoz en la ND podría ser beneficiosa al menos a este nivel celular.

## **IX. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

### **A. LIMITACIONES DEL TRABAJO EXPUESTO**

- En el caso del modelo animal experimental las características intrínsecas del mismo nos ofrecen limitaciones. El hecho de que no sobrevivan en condiciones aceptables sin insulina limita los estudios que se pueden realizar en estadios avanzados. En el caso de este trabajo no fue posible valorar la PA ni el FG por el mal estado general de los animales tras 40 días de DM sin tratamiento.

- En los estudios *in vitro* con la línea celular de podocitos de ratón no se valoró la glucosa en el medio de cultivo tras las incubaciones con insulina. Consideramos que los niveles de glucosa en el medio eran suficientes para el mantenimiento celular y durante la incubación se cambió el medio cada 24 horas para no exponer a las células en ningún momento a una situación de “hipoglucemia”.

- En una valoración global del trabajo presentado, aunque metodológicamente es correcto y estudia el ECA2 abordándolo desde diferentes perspectivas, es mayoritariamente descriptivo, quedando por aclarar los mecanismos implicados.

### **B. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Las limitaciones de este trabajo nos llevan a plantearnos futuras líneas de investigación que se pueden establecer en base a los resultados obtenidos. Estas futuras líneas de investigación irán encaminadas a:

- Profundizar en el estudio de otros elementos del SRAA para poder realizar una valoración integrada de este sistema, principalmente el estudio de los péptidos activos del sistema (Ang-II y Ang-(1-7)).

- Estudios de las consecuencias de la modulación del ECA2 en el modelo diabético NOD y sus cambios en presencia de un correcto control glicémico. Parece interesante plantearse estudios acerca de las vías de señalización de integrinas y su modificación en presencia de tratamiento con insulina.

- Estudios específicos de la respuesta del ECA2 podocitario frente a diferentes concentraciones de glucosa en el medio.

- Estudios en profundidad de posibles vías activadas en podocitos como la PI3k y su relación con la modulación de la apoptosis por la insulina.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S.E.N. Registro de la Sociedad Española de Nefrología. 2011.
2. Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1(1):10.
3. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003 Jun 5;348(23):2285-93.
4. Giorgino F, Laviola L, Cavallo Perin P, Solnica B, Fuller J, Chaturvedi N. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric Type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2004 Jun;47(6):1020-8.
5. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*. 1998 Jul 9;339(2):69-75.
6. Berger M, Monks D, Wanner C, Lindner TH. Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication? *Kidney Blood Press Res*. 2003;26(3):143-54.
7. Marshall SM. Recent advances in diabetic nephropathy. *Clin Med*. 2004 May-Jun;4(3):277-82.
8. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*. 2004 Dec;34(12):785-96.
9. Earle K, Walker J, Hill C, Viberti G. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 1992 Mar 5;326(10):673-7.
10. Fogarty DG, Rich SS, Hanna L, Warram JH, Krolewski AS. Urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes is heritable and genetically correlated to blood pressure. *Kidney Int*. 2000 Jan;57(1):250-7.
11. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Apr;16(3):120-6.
12. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for  $\text{tgf-Beta}$  as the major mediator. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan;15 Suppl 1:S55-7.
13. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Mar;16 Suppl 1:S30-3.
14. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Jan;233(1):4-11.
15. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007 Mar;27(2):195-207.
16. Stout LC, Kumar S, Whorton EB. Focal mesangiolysis and the pathogenesis of the Kimmelstiel-Wilson nodule. *Hum Pathol*. 1993 Jan;24(1):77-89.
17. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003 Jan;83(1):253-307.
18. Graham RC, Jr., Karnovsky MJ. Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *J Exp Med*. 1966 Dec 1;124(6):1123-34.
19. Schneeberger EE, Levey RH, McCluskey RT, Karnovsky MJ. The isoporos substructure of the human glomerular slit diaphragm. *Kidney Int*. 1975 Jul;8(1):48-52.
20. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*. 1997 Oct 10;236(1):248-58.
21. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1626-34.

22. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol*. 2003 Dec;7(4):255-9.
23. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*. 1990 Sep;111(3):1255-63.
24. Fukasawa H, Bornheimer S, Kudlicka K, Farquhar MG. Slit diaphragms contain tight junction proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul;20(7):1491-503.
25. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998 Mar;1(4):575-82.
26. Li H, Zhu J, Aoudjit L, Latreille M, Kawachi H, Larose L, et al. Rat nephrin modulates cell morphology via the adaptor protein Nck. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 13;349(1):310-6.
27. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*. 2006 Apr 6;440(7085):818-23.
28. Welsh GI, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*. 2010 Feb;220(3):328-37.
29. Sabljic M. Podocyte Injury in Glomerular Diseases. *eJIFCC*. 2009;20/01:20-6.
30. Coward RJ, Welsh GI, Koziell A, Hussain S, Lennon R, Ni L, et al. Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):1127-35.
31. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):1023-30.
32. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003 Dec;52(12):2969-74.
33. Liebau MC, Lang D, Bohm J, Endlich N, Bek MJ, Witherden I, et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Mar;290(3):F710-9.
34. Velez JC, Bland AM, Arthur JM, Raymond JR, Janech MG. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jul;293(1):F398-407.
35. Hoffmann S, Podlich D, Hahnel B, Kriz W, Gretz N. Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jun;15(6):1475-87.
36. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol*. 2008 Feb;172(2):299-308.
37. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int*. 2004 Jan;65(1):30-9.
38. Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, et al. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J Pathol*. 2006 Jan;168(1):42-54.
39. Pavenstadt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Feb;278(2):F173-9.
40. Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:1127-39.
41. Jia J, Ding G, Zhu J, Chen C, Liang W, Franki N, et al. Angiotensin II infusion induces nephrin expression changes and podocyte apoptosis. *Am J Nephrol*. 2008;28(3):500-7.
42. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int*. 2001 Jun;59(6):2104-13.

43. Siu B, Saha J, Smoyer WE, Sullivan KA, Brosius FC, 3rd. Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment. *BMC Nephrol*. 2006;7:6.
44. Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jun;16(6):1733-41.
45. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009 May;20(5):1041-52.
46. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Sep;15(9):1379-83.
47. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest*. 1997 Jan 15;99(2):342-8.
48. White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):3083-9.
49. Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori ML, Mauer M. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):2155-60.
50. Camici M. Urinary detection of podocyte injury. *Biomed Pharmacother*. 2007 Jun;61(5):245-9.
51. Weil EJ, Lemley KV, Yee B, Lovato T, Richardson M, Myers BD, et al. Podocyte detachment in type 2 diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2011;33 Suppl 1:21-4.
52. Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between urinary podocytes and kidney diseases. *Ren Fail*. 2012;34(3):403-7.
53. Han SY, Kang YS, Jee YH, Han KH, Cha DR, Kang SW, et al. High glucose and angiotensin II increase beta1 integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes. *Cell Tissue Res*. 2006 Feb;323(2):321-32.
54. Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, Beynon AJ, Peters TA, Weening JJ, et al. Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol*. 2006 Oct 9;175(1):33-9.
55. Woodall BP, Nystrom A, Iozzo RA, Eble JA, Niland S, Krieg T, et al. Integrin alpha2beta1 is the required receptor for endorepellin angiostatic activity. *J Biol Chem*. 2008 Jan 25;283(4):2335-43.
56. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8):2063-71.
57. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Feb;21(2):212-22.
58. Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, et al. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*. 2000 Jan;24(1):23-5.
59. Babinet C. Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Nov;11 Suppl 16:S88-94.
60. Mansouri A. Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice. *Methods Mol Biol*. 2001;175:397-413.
61. Qi Z, Fujita H, Jin J, Davis LS, Wang Y, Fogo AB, et al. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2628-37.
62. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jan;290(1):F214-22.

63. Brosius FC, 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;20(12):2503-12.
64. Rossini AA, Like AA, Dulin WE, Cahill GF, Jr. Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes*. 1977 Dec;26(12):1120-4.
65. Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM. Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin in vivo. *Mutat Res*. 1994 Jun 1;307(2):495-9.
66. Huang SW, Taylor GE. Immune insulinitis and antibodies to nucleic acids induced with streptozotocin in mice. *Clin Exp Immunol*. 1981 Feb;43(2):425-9.
67. Fujita A, Sasaki H, Ogawa K, Okamoto K, Matsuno S, Matsumoto E, et al. Increased gene expression of antioxidant enzymes in KKAY diabetic mice but not in STZ diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Aug;69(2):113-9.
68. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*. 1997 May;46(5):887-94.
69. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(1):27-37.
70. Gurley SB, Mach CL, Stegbauer J, Yang J, Snow KP, Hu A, et al. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+/-C96Y) (Akita) mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F788-95.
71. Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980 Jan;29(1):1-13.
72. Cameron MJ, Meagher C, Delovitch TL. Failure in immune regulation begets IDDM in NOD mice. *Diabetes Metab Rev*. 1998 Jun;14(2):177-85.
73. Doi T, Hattori M, Agodoa LY, Sato T, Yoshida H, Striker LJ, et al. Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after the onset of hyperglycemia. *Lab Invest*. 1990 Aug;63(2):204-12.
74. Segev Y, Landau D, Marbach M, Shehadeh N, Flyvbjerg A, Phillip M. Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Mar;8(3):436-44.
75. Zhao HJ, Wang S, Cheng H, Zhang MZ, Takahashi T, Fogo AB, et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Oct;17(10):2664-9.
76. Kanetsuna Y, Takahashi K, Nagata M, Gannon MA, Breyer MD, Harris RC, et al. Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1473-84.
77. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):539-50.
78. Epstein PN, Overbeek PA, Means AR. Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell*. 1989 Sep 22;58(6):1067-73.
79. Zheng S, Noonan WT, Metreveli NS, Coventry S, Kralik PM, Carlson EC, et al. Development of late-stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Diabetes*. 2004 Dec;53(12):3248-57.
80. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*. 1966 Sep 2;153(3740):1127-8.
81. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):491-5.
82. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996 Feb 15;379(6566):632-5.

83. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jun;284(6):F1138-44.
84. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):8015-20.
85. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995 May;44(5):645-51.
86. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998 Jan;136(1):17-24.
87. Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Jan;296(1):F118-26.
88. Mohan S, Reddick RL, Musi N, Horn DA, Yan B, Prihoda TJ, et al. Diabetic eNOS knockout mice develop distinct macro- and microvascular complications. *Lab Invest*. 2008 May;88(5):515-28.
89. Ranheim T, Dumke C, Schueler KL, Cartee GD, Attie AD. Interaction between BTBR and C57BL/6J genomes produces an insulin resistance syndrome in (BTBR x C57BL/6J) F1 mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):3286-93.
90. Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PLoS One*. 2008;3(8):e3067.
91. Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, Kowalewska J, Banas MC, Spencer MW, et al. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;21(9):1533-42.
92. Heilig CW, Liu Y, England RL, Freytag SO, Gilbert JD, Heilig KO, et al. D-glucose stimulates mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1997 Jun;46(6):1030-9.
93. Wang Y, Heilig K, Saunders T, Minto A, Deb DK, Chang A, et al. Transgenic overexpression of GLUT1 in mouse glomeruli produces renal disease resembling diabetic glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jul;299(1):F99-F111.
94. Welsh GI, Hale LJ, Eremina V, Jeansson M, Maezawa Y, Lennon R, et al. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab*. 2010 Oct 6;12(4):329-40.
95. Bjorck S, Nyberg G, Mulec H, Granerus G, Herlitz H, Aurell M. Beneficial effects of angiotensin converting enzyme inhibition on renal function in patients with diabetic nephropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Aug 23;293(6545):471-4.
96. Taguma Y, Kitamoto Y, Futaki G, Ueda H, Monma H, Ishizaki M, et al. Effect of captopril on heavy proteinuria in azotemic diabetics. *N Engl J Med*. 1985 Dec 26;313(26):1617-20.
97. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1993 Nov 11;329(20):1456-62.
98. Viberti G, Mogensen CE, Groop LC, Pauls JF. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. European Microalbuminuria Captopril Study Group. *JAMA*. 1994 Jan 26;271(4):275-9.
99. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med*. 1996 Apr 11;334(15):939-45.
100. Ravid M, Savin H, Jutrin I, Bental T, Katz B, Lishner M. Long-term stabilizing effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma creatinine and on proteinuria in normotensive type II diabetic patients. *Ann Intern Med*. 1993 Apr 15;118(8):577-81.

101. Hirst JA, Taylor KS, Stevens RJ, Blacklock CL, Roberts NW, Pugh CW, et al. The impact of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on Type 1 and Type 2 diabetic patients with and without early diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2012 Apr;81(7):674-83.
102. MacKinnon M, Shurraw S, Akbari A, Knoll GA, Jaffey J, Clark HD. Combination therapy with an angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: a systematic review of the efficacy and safety data. *Am J Kidney Dis.* 2006 Jul;48(1):8-20.
103. Mann JF, Anderson C, Gao P, Gerstein HC, Boehm M, Ryden L, et al. Dual inhibition of the renin-angiotensin system in high-risk diabetes and risk for stroke and other outcomes: results of the ONTARGET trial. *J Hypertens.* 2012 Dec 15.
104. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Baseline characteristics in the Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012 Sep;13(3):387-93.
105. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33238-43.
106. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
107. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Koziaradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002 Jun 20;417(6891):822-8.
108. Herath CB, Warner FJ, Lubel JS, Dean RG, Jia Z, Lew RA, et al. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *J Hepatol.* 2007 Sep;47(3):387-95.
109. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Apr;300(4):R804-17.
110. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batlle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):3067-75.
111. Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Feb;288(2):F353-62.
112. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):14838-43.
113. Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 2006 Jun;168(6):1808-20.
114. Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J, et al. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2010 Feb;59(2):529-38.
115. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 2003 Mar;41(3):392-7.
116. Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Batlle D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension.* 2004 May;43(5):1120-5.
117. Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, et al. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes.* 2006 Jul;55(7):2132-9.
118. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* 2007 Aug;171(2):438-51.

119. Tikellis C, Bialkowski K, Pete J, Sheehy K, Su Q, Johnston C, et al. ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):1018-25.
120. Shiota A, Yamamoto K, Ohishi M, Tatara Y, Ohnishi M, Maekawa Y, et al. Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hypertens Res*. 2010 Apr;33(4):298-307.
121. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, et al. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2218-25.
122. Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Batlle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int*. 2007 Sep;72(5):614-23.
123. Lo CS, Liu F, Shi Y, Maachi H, Chenier I, Godin N, et al. Dual RAS blockade normalizes angiotensin-converting enzyme-2 expression and prevents hypertension and tubular apoptosis in Akita angiotensinogen-transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Apr 1;302(7):F840-52.
124. Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci*. 2012 Feb 13;90(7-8):289-300.
125. Giani JF, Burghi V, Veiras LC, Tomat A, Munoz MC, Cao G, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jun 15;302(12):F1606-15.
126. Moon JY, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, Ohara I, et al. Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-A(y)/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jun;300(6):F1271-82.
127. Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Am J Nephrol*. 2008;28(1):25-33.
128. Singh T, Singh K, Sharma PL. Ameliorative potential of angiotensin1-7/Mas receptor axis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2010 Jan-Feb;32(1):19-25.
129. Shao Y, He M, Zhou L, Yao T, Huang Y, Lu LM. Chronic angiotensin (1-7) injection accelerates STZ-induced diabetic renal injury. *Acta Pharmacol Sin*. 2008 Jul;29(7):829-37.
130. Lely AT, Hamming I, van Goor H, Navis GJ. Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol*. 2004 Dec;204(5):587-93.
131. Metzger R, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, et al. Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int*. 1999 Oct;56(4):1442-54.
132. Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, et al. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2006 Apr;29(4):848-52.
133. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, et al. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis*. 2008 Apr;51(4):613-23.
134. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2001 Sep 20;345(12):851-60.
135. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, Panagiotopoulos S, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Jul;17(7):1327-32.

136. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia*. 2001 Jul;44(7):874-7.
137. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Mar;11(3):477-89.
138. Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, et al. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):894-900.
139. Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen UL, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia*. 2001 Jul;44(7):878-82.
140. Dai HY, Zheng M, Tang RN, Ma KL, Ni J, Liu BC. Inhibition of integrin-linked kinase by angiotensin II receptor antagonist, irbesartan attenuates podocyte injury in diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Mar;125(5):888-93.
141. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui P, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia*. 2002 Nov;45(11):1572-6.
142. Durvasula RV, Shankland SJ. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F830-9.
143. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell*. 2004 May;6(5):719-28.
144. Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, Jung DS, Kwak SJ, Ryu DR, et al. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney Int*. 2007 May;71(10):1019-27.
145. Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*. 2002 Dec 4;532(1-2):107-10.
146. Gemhardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, et al. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides*. 2005 Jul;26(7):1270-7.
147. Velez JC, Ierardi JL, Bland AM, Morinelli TA, Arthur JM, Raymond JR, et al. Enzymatic processing of angiotensin peptides by human glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jun 15;302(12):F1583-94.
148. Sharma M, Sharma R, Greene AS, McCarthy ET, Savin VJ. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):F623-7.
149. Wang L, Flannery PJ, Spurney RF. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. *J Lab Clin Med*. 2003 Nov;142(5):313-21.
150. Re R. The nature of intracrine peptide hormone action. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):534-8.
151. Tschope C, Seidl U, Reinecke A, Riester U, Graf K, Schultheiss HP, et al. Kinins are involved in the antiproteinuric effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Int Immunopharmacol*. 2003 Mar;3(3):335-44.
152. Fredersdorf S, Weil J, Ulucan C, Birner C, Buttner R, Schubert T, et al. Vasopeptidase inhibition attenuates proteinuria and podocyte injury in Zucker diabetic fatty rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007 Apr;375(2):95-103.
153. Nadarajah R, Milagres R, Dilauro M, Gutsol A, Xiao F, Zimpelmann J, et al. Podocyte-specific overexpression of human angiotensin-converting enzyme 2 attenuates diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int*. 2012 Aug;82(3):292-303.
154. Xu ZG, Yoo TH, Ryu DR, Cheon Park H, Ha SK, Han DS, et al. Angiotensin II receptor blocker inhibits p27Kip1 expression in glucose-stimulated podocytes and in diabetic glomeruli. *Kidney Int*. 2005 Mar;67(3):944-52.

155. Chouinard RF, Meek RL, Cooney SK, Tuttle KR. Effects of amino acids and glucose on mesangial cell aminopeptidase a and angiotensin receptors. *Kidney Int.* 2002 Jan;61(1 Suppl):S106-9.
156. Mentzel S, Dijkman HB, van Son JP, Wetzels JF, Assmann KJ. In vivo antibody-mediated modulation of aminopeptidase A in mouse proximal tubular epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1999 Jul;47(7):871-80.
157. Assmann KJ, van Son JP, Dijkman HB, Mentzel S, Wetzels JF. Antibody-induced albuminuria and accelerated focal glomerulosclerosis in the Thy-1.1 transgenic mouse. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):116-26.
158. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2008 Feb;4(1):39-45.
159. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006 Jun;69(12):2131-47.
160. Welsh GI, Saleem MA. The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* Jan;8(1):14-21.
161. Hsu HH, Hoffmann S, Endlich N, Velic A, Schwab A, Weide T, et al. Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes. *J Mol Med (Berl).* 2008 Dec;86(12):1379-94.
162. Macconi D, Abbate M, Morigi M, Angioletti S, Mister M, Buelli S, et al. Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol.* 2006 Apr;168(4):1073-85.
163. Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, et al. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Oct;295(4):F959-70.
164. Eekhoff A, Bonakdar N, Alonso JL, Hoffmann B, Goldmann WH. Glomerular podocytes: a study of mechanical properties and mechano-chemical signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Mar 11;406(2):229-33.
165. Suzuki K, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Nakatsue T, Fujioka Y, et al. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors play opposite roles in regulating the barrier function of kidney glomerular capillary wall. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1841-53.
166. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Franki N, Gibbons N, Kasinath BS, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Jul;283(1):F173-80.
167. Zhang H, Ding J, Fan Q, Liu S. TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009 Sep;234(9):1029-36.
168. Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Sanchez-Lopez E, Ruiz-Ortega M, Benito-Martin A, Saleem MA, et al. HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab Invest.* 2012 Jan;92(1):32-45.
169. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF-ss overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):129-40.
170. Brinkkoetter PT, Holtgreffe S, van der Woude FJ, Yard BA. Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan;15(1):33-40.
171. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* 1997 Dec;7(6):727-38.
172. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):601-4.
173. Leiter EH. The NOD mice: A model for insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease Current Protocols in Immunology.* 1997;15.9.

174. Sturgeon C, Sam AD, 2nd, Law WR. Rapid determination of glomerular filtration rate by single-bolus inulin: a comparison of estimation analyses. *J Appl Physiol*. 1998 Jun;84(6):2154-62.
175. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, et al. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Mar;286(3):F590-6.
176. Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, et al. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 15;88(12):5096-100.
177. Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int*. 2007 Jul;72(1):26-36.
178. Epelman S, Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Aug 26;52(9):750-4.
179. Lehuen A, Diana J, Zaccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):501-13.
180. Yang CW, Hattori M, Vlassara H, He CJ, Carome MA, Yamato E, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice. *J Am Soc Nephrol*. 1995 Feb;5(8):1610-7.
181. Watanabe S, Tomino Y, Inoue W, Yagame M, Kaneshige H, Nomoto Y, et al. Detection of immunoglobulins and/or complement in kidney tissues from non-obese diabetic (NOD) mice. *Tokai J Exp Clin Med*. 1987 Sep;12(3):201-8.
182. Watanabe S. Histopathological and immunopathological studies on renal involvement in non-obese diabetic (NOD) mice. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1989 Oct;31(10):1011-9.
183. Maeda M, Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. *Vet Pathol*. 2003 Mar;40(2):187-95.
184. Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Nov 13;82 Suppl 1:S75-9.
185. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep;297(3):E568-77.
186. Baron AD. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol*. 1994 Aug;267(2 Pt 1):E187-202.
187. Mogensen CE, Andersen MJ. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes*. 1973 Sep;22(9):706-12.
188. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976 Dec;51(6):551-5.
189. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1999 Aug;56(2):393-405.
190. Stackhouse S, Miller PL, Park SK, Meyer TW. Reversal of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes*. 1990 Aug;39(8):989-95.
191. Tuttle KR, Bruton JL, Perusek MC, Lancaster JL, Kopp DT, DeFronzo RA. Effect of strict glycemic control on renal hemodynamic response to amino acids and renal enlargement in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1991 Jun 6;324(23):1626-32.
192. Raz I, Wexler I, Weiss O, Flyvbjerg A, Segev Y, Rauchwerger A, et al. Role of insulin and the IGF system in renal hypertrophy in diabetic *Psammomys obesus* (sand rat). *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Jul;18(7):1293-8.

193. Yamaleyeva LM, Gilliam-Davis S, Almeida I, Brosnihan KB, Lindsey SH, Chappell MC. Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):F1374-84.
194. Soro-Paavonen A, Gordin D, Forsblom C, Rosengard-Barlund M, Waden J, Thorn L, et al. Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications. *J Hypertens*. 2012 Feb;30(2):375-83.
195. Soler MJ, Riera M, Crespo M, Mir M, Marquez E, Pascual MJ, et al. Circulating Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity in Kidney Transplantation: A Longitudinal Pilot Study. *Nephron Clin Pract*. 2012 Dec 19;121(3-4):c144-c50.
196. Mizuiri S, Aoki T, Hemmi H, Arita M, Sakai K, Aikawa A. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in patients with CKD. *Nephrology (Carlton)*. 2011 Aug;16(6):567-72.
197. Xiao F, Hiremath S, Knoll G, Zimpelmann J, Srivaratharajah K, Jadhav D, et al. Increased urinary angiotensin-converting enzyme 2 in renal transplant patients with diabetes. *PLoS One*. 2012;7(5):e37649.
198. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan CH, Li KT, et al. Urinary mRNA expression of ACE and ACE2 in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2008 Jun;51(6):1062-7.
199. Park SE, Kim WJ, Park SW, Park JW, Lee N, Park CY, et al. High urinary ACE2 concentrations are associated with severity of glucose intolerance and microalbuminuria. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(2):203-10.
200. Leehey DJ, Singh AK, Bast JP, Sethupathi P, Singh R. Glomerular renin angiotensin system in streptozotocin diabetic and Zucker diabetic fatty rats. *Transl Res*. 2008 Apr;151(4):208-16.
201. Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Sep;123(6):333-46.
202. Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ. Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Jan;67(1):89-98.
203. Singer D, Camargo SM. Collectrin and ACE2 in renal and intestinal amino acid transport. *Channels (Austin)*. 2011 Sep-Oct;5(5):410-23.
204. Clarke NE, Fisher MJ, Porter KE, Lambert DW, Turner AJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) and ACE2 bind integrins and ACE2 regulates integrin signalling. *PLoS One*. 2012;7(4):e34747.
205. Coward RJ, Welsh GI, Yang J, Tasman C, Lennon R, Koziell A, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3095-102.
206. Kim EY, Dryer SE. Effects of insulin and high glucose on mobilization of slo1 BKCa channels in podocytes. *J Cell Physiol*. 2011 Sep;226(9):2307-15.
207. Menzel S, Moeller MJ. Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatr Nephrol*. 2011 Oct;26(10):1775-80.
208. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, et al. Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):2179-93.
209. Morigi M, Buelli S, Angioletti S, Zanchi C, Longaretti L, Zoja C, et al. In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol*. 2005 May;166(5):1309-20.
210. Chen S, He FF, Wang H, Fang Z, Shao N, Tian XJ, et al. Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium*. 2011 Dec;50(6):523-9.
211. Inagi R, Nangaku M, Onogi H, Ueyama H, Kitao Y, Nakazato K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int*. 2005 Dec;68(6):2639-50.

212. Deb DK, Chen Y, Zhang Z, Zhang Y, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 May;296(5):F1212-8.
213. Tuncdemir M, Ozturk M. The effects of angiotensin-II receptor blockers on podocyte damage and glomerular apoptosis in a rat model of experimental streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Acta Histochem*. 2011 Dec;113(8):826-32.
214. Muniyappa R, Yavuz S. Metabolic actions of angiotensin II and insulin: A microvascular endothelial balancing act. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jun 7.
215. Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Mar-Apr;22(2):98-107.
216. Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, et al. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):871-8.
217. Ziyadeh FN. Different roles for TGF-beta and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Nov 13;82 Suppl 1:S38-41.
218. Lee HS. Pathogenic role of TGF-beta in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol*. 2011 Jan;26(1):107-16.
219. Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-beta: a model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1779-88.
220. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):807-16.
221. Foidart JM, Foidart JB, Mahieu PR. Synthesis of collagen and fibronectin by glomerular cells in culture. *Ren Physiol*. 1980;3(1-6):183-92.
222. Ding G, van Goor H, Ricardo SD, Orlowski JM, Diamond JR. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):147-54.
223. Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 1998 Jan-Feb;12(1):43-60.
224. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int*. 1992 May;41(5):1213-21.
225. van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, et al. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. *Diabetes*. 1997 May;46(5):834-40.
226. Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2012 Nov;82(9):1010-7.
227. Hiromura K, Monkawa T, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ. Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3-kinase/Akt pathway. *Kidney Int*. 2002 Apr;61(4):1312-21.
228. Meier M, Nitschke M, Hocke C, Kramer J, Jabs W, Steinhoff J, et al. Insulin inhibits caspase-3 activity in human renal tubular epithelial cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(4):279-86.
229. Bussolati B, Deregibus MC, Fonsato V, Doublier S, Spatola T, Procida S, et al. Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-signaling pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):1936-47.
230. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int*. 2005 Apr;67(4):1308-14.

231. He F, Chen S, Wang H, Shao N, Tian X, Jiang H, et al. Regulation of CD2-associated protein influences podocyte endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by albumin overload. *Gene*. 2011 Sep 15;484(1-2):18-25.
232. Eyre J, Ioannou K, Grubb BD, Saleem MA, Mathieson PW, Brunskill NJ, et al. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F674-81.
233. Yoshida S, Nagase M, Shibata S, Fujita T. Podocyte injury induced by albumin overload in vivo and in vitro: involvement of TGF-beta and p38 MAPK. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;108(3):e57-68.
234. He FF, Zhang C, Chen S, Deng BQ, Wang H, Shao N, et al. Role of CD2-associated protein in albumin overload-induced apoptosis in podocytes. *Cell Biol Int*. 2011 Aug;35(8):827-34.