

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Glomerulosclerosis segmentaria y focal en el modelo de la rata Zucker Obese. ¿Es un modelo experimental de causa plurimetabólica? Importancia de las células podocitarias.

Tesis presentada por **Sandra Blanco Cano**

Director: Dr. Ramón Romero González

Codirector: Dr. Ricardo Pujol Borrell

Badalona, noviembre de 2001

A ti, Luis

A mis padres y hermana

Agradecimientos

La verdad es que la elaboración de una tesis doctoral en la mayoría de los casos no es una empresa fácil, por lo que no sólo es fruto del esfuerzo del propio tesinando sino que hay un gran número de personas que colaboran para que al final se pueda realizar la misma. Es a todas ellas a las que querría agradecerles su colaboración.

A Dr. Romero, por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral. Durante todo este tiempo ha tenido una perseverancia, intuición y optimismo fuera de lo común. Tiene todo mi reconocimiento y agradecimiento.

A Luis, mi marido, sin el cual no habría sido posible la realización de esta tesis, él me ha ofrecido un apoyo técnico y moral inmenso durante todos estos años.

A mis padres y a Esther que se han ilusionado y han vivido el día a día conmigo, en especial a mi padre que me alentó en el inicio de esta tesis.

A Carmen Plasencia por su apoyo en la resolución de los resultados con las PCRs y en la elaboración de la discusión. Gracias a David por su ayuda en la corrección del manuscrito de la tesis.

A Marian por su valía personal y su apoyo.

A Marta Alvarez por compartir los caminos en coche a Can Ruti. En ellos hemos forjado una buena amistad.

A Eva, Miquel y Carme por los ratos compartidos en el laboratorio.

A Marco, por su ayuda en los estudios de morfometría. Al Servicio de Inmunología, que siempre ha estado ahí, para celebrar las alegrías, compartir los turnos de nitrógeno y vivir todos los problemas del día a día. Quiero hacer mención especial a Cesca que realizó conmigo las primeras PCR, Orlando que me asesoró en los diseños de los primers, Kolko, Roxana, Pepi y Manel que me introdujo y guió en el campo de las PCR-competitivas. Por supuesto, gracias a la Dra Dolores Jaraquemada por su apoyo a los biólogos y al Dr Ricardo Pujol por su asesoramiento científico. A todos los técnicos de Inmunología Gemma, Marisa y Carmen. Con ellas hemos compartido muy buenos momentos. Un recuerdo especial a Trini.

A todo el equipo de Anatomía Patológica, por la paciencia demostrada en el estudio de las lesiones histológicas. En especial, a la Dra Rosa Penin que realizó las fotografías al microscopio óptico, al Dr. Manuel Vaquero, Dra Dolores López, Dr Ariza, a Geli y a todos los biólogos moleculares Xavi Roca, Anna, Elena y Josep M^a por su colaboración.

Al departamento de bioquímica, al Dr. Galimany que agilizó enormemente el análisis bioquímico de los sueros, a José M^a por su apoyo en los análisis de las proteinurias, a la Dra Marisa Granada por su apoyo en la realización de los RIAs de los sueros hiperlipémicos.

Gracias al Servicio de Nefrología, por su apoyo en general.

A Josep M^o Sol y Cristina Diaz, por la ayuda en el análisis estadístico e interpretación de los resultados.

Al Centro de Experimentación Animal y en especial al animal de laboratorio sin el cual no hubiera sido posible la realización de la presente tesis.

INDICE

1	<u>ANTECEDENTES. ENFERMEDAD RENAL PROGRESIVA.</u>	1
1.1	<u>EL GLOMÉRULO RENAL.</u>	1
1.1.1	<u>Las células epiteliales</u>	5
1.1.2	<u>La célula endotelial.</u>	9
1.1.3	<u>El mesangio glomerular.</u>	11
1.2	<u>ENFERMEDAD RENAL PROGRESIVA.</u>	18
1.2.1	<u>Glomerulosclerosis primaria focal y segmentaria</u>	21
1.2.2	<u>Nefropatía diabética</u>	28
1.2.3	<u>Hiperlipidemia y la progresión de la ERP.</u>	31
1.2.3.1	<u>Hiperlipidemia en el síndrome nefrótico.</u>	31
1.2.3.2	<u>Lípidos y diabetes mellitus.</u>	32
1.3	<u>MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD RENAL PROGRESIVA</u>	35
1.3.1	<u>Modelos animales asociados a diabetes tipo II.</u>	35
1.3.1.1	<u>Ratón Kuo Kondo (KK)</u>	35
1.3.1.2	<u>Ratón KKAY.</u>	36
1.3.1.3	<u>Ratón obeso New Zealand (NZO).</u>	36
1.3.1.4	<u>Ratón ob/ob</u>	36
1.3.1.5	<u>Ratón diabético db/db.</u>	36
1.3.1.6	<u>Rata diabética Cohen.</u>	37
1.3.1.7	<u>Rata hipertensa diabética Cohen-Rosenthal.</u>	37
1.3.1.8	<u>Rata Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLEFT)</u>	37
1.3.1.9	<u>Rata hipertensa espontáneamente hipertensa (SHR).</u>	37
1.3.1.10	<u>Rata corpulenta-NIH/ espontáneamente hipertensa</u>	38
1.3.1.11	<u>Rata fatty Zucker diabética</u>	38
1.3.1.12	<u>Rata Wistar fatty (fa/fa).</u>	38
1.3.1.13	<u>Rata Goto-Kakizaki (GK)</u>	39
1.3.2	<u>Rata Zucker Obese: Modelo de obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemia</u>	40
1.3.2.1	<u>Obesidad.</u>	40
1.3.2.2	<u>Características metabólicas y hormonales.</u>	41
1.3.2.3	<u>Hipertensión</u>	42
1.3.2.4	<u>Hiperlipemia.</u>	42
1.3.2.5	<u>Lesión Renal.</u>	43
1.4	<u>MECANISMOS DE PROGRESIÓN DE LA LESIÓN RENAL.</u>	44
1.4.1	<u>Cambios hemodinámicos.</u>	44
1.4.1.1	<u>Hipertensión glomerular.</u>	44
1.4.1.2	<u>Hipertensión sistémica</u>	46
1.4.1.3	<u>Hipertrofia glomerular.</u>	47
1.4.2	<u>Cambios no hemodinámicos.</u>	48

1.4.2.1	<u>Factores de crecimiento</u>	48
1.4.2.1.1	<u>Características generales de los factores de crecimiento</u>	48
1.4.2.1.2	<u>Rutas intracelulares activadas por los factores de crecimiento</u>	50
1.4.2.1.3	<u>Participación de los factores de crecimiento en la esclerosis glomerular</u>	54
1.4.2.2	<u>Angiotensina II</u>	65
1.4.2.2.1	<u>Expresión del Sistema renina-angiotensina sistémica</u>	65
1.4.2.2.2	<u>Papel central de la Angiotensina II en la patogénesis en la Enfermedad Renal Progresiva</u>	67
1.4.2.2.3	<u>Importancia de los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina II (IECAs)</u>	72
1.4.2.3	<u>Papel de los lípidos</u>	73
1.4.2.3.1	<u>Clasificación de las lipoproteínas y del metabolismo y papel en la arteriosclerosis</u>	73
1.4.2.3.2	<u>Efectos nefrotóxicos de los lípidos</u>	77
1.4.2.3.3	<u>Inhibidores del HMG-CoA Reductasa</u>	82
1.4.2.4	<u>Quimocinas</u>	86
1.4.2.4.1	<u>Quimocinas: clasificación y mecanismos de acción</u>	86
1.4.2.4.2	<u>Modelo de actuación de las quimocinas en las Enfermedades Renales</u>	89
1.4.2.4.3	<u>Factor de transcripción NF- B</u>	91
2	<u>OBJETIVOS</u>	93
3	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	95
3.1	<u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VIVO</u>	95
3.1.1	<u>Modelo de Diabetes Mellitus tipo II: Rata Zucker Obese</u>	95
3.1.1.1	<u>Diseño experimental</u>	95
3.1.1.2	<u>Metodología</u>	96
3.1.1.2.1	<u>Análisis Histológico</u>	97
3.2	<u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VITRO</u>	98
3.2.1	<u>Técnica del aislamiento glomerular</u>	98
3.2.2	<u>Análisis morfométrico</u>	99
3.2.2.1	<u>Ambito de estudio</u>	99
3.2.2.2	<u>Metodología</u>	99
3.2.3	<u>Microscopía electrónica</u>	99
3.2.4	<u>Estudio inmunohistoquímico</u>	100
3.2.4.1	<u>Ámbito de estudio</u>	101
3.2.4.2	<u>Metodología</u>	101
3.2.5	<u>Análisis de la expresión de ARN de factores de crecimiento</u>	102
3.2.5.1	<u>Hibridación <i>in situ</i> del TGF-β_1</u>	102
3.2.5.1.1	<u>Ámbito de estudio</u>	102
3.2.5.1.2	<u>Metodología</u>	103
3.2.5.2	<u>Cuantificación del TGF-β_1 y PDGF-B mediante la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	104
3.2.5.2.1	<u>Ámbito de estudio</u>	104
3.2.5.3	<u>Metodología</u>	104

3.2.5.3.1	Extracción del ARN total según una modificación del Método de Chomezynski ...	105
3.2.5.3.2	Cuantificación del ARN	106
3.2.5.3.3	Retrotranscripción	106
3.2.5.3.4	Cebadores	106
3.2.5.3.5	Generación del fragmento competidor	107
3.2.5.3.6	PCR competitiva	109
3.2.6	Análisis por Southwestern in situ del factor de transcripción N-kB	112
3.2.6.1	Ámbito de aplicación	112
3.2.6.2	Metodología	112
3.3	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	113
4	RESULTADOS	115
4.1	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VIVO	115
4.1.1	Evaluación ponderal	115
4.1.2	Presión arterial sistólica	116
4.1.3	Creatinina, albúmina y proteínas en suero	117
4.1.4	Glucosa e Insulina en suero	119
4.1.5	Lípidos en suero	120
4.1.6	Proteinuria	122
4.1.7	Análisis histológico	122
4.2	EXPERIMENTAL IN VITRO	126
4.2.1	Análisis morfométrico	126
4.2.2	Estudio inmunohistoquímico	127
4.2.2.1	Marcadores de proliferación celular: Ki-67	127
4.2.2.2	Marcadores de actividad quimiotáctica: IL-8 e IP-10	127
4.2.2.3	Marcadores de las células monocitos/macrófagos: ED⁺ 1	130
4.2.2.4	Marcadores de lesión podocitaria: Desmina	130
4.2.2.5	Marcadores de proliferación de matriz extracelular: TGF-β₁	132
4.2.3	Microscopía electrónica	132
4.2.4	Análisis de la expresión de ARN de factores de crecimiento	134
4.2.4.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	134
4.2.4.2	Hibridación in situ del TGF-β₁	138
4.2.5	Análisis por Southwestern del factor de transcripción NF-κB	138
4.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	140
4.3.1	Análisis de Regresión lineal multivariante	140
5	DISCUSIÓN	141
6	CONCLUSIONES	157

7 BIBLIOGRAFIA 159

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la nefrona	1
Figura 2. a) Esquema microscópico de un glomérulo; b) porción de tres capilares glomerulares; c) estructura de la membrana basal glomerular, pedicelos y células mesangiales	2
Figura 3. Representación esquemática del patrón interdigitado de las prolongaciones secundarias (pedicelos) de los podocitos, en la superficie externa de un asa capilar glomerular	3
Figura 4. Representación esquemática de la barrera de filtración glomerular	4
Figura 5. Organización molecular del diafragma de la hendidura	6
Figura 6. Esquema del mesangio glomerular	11
Figura 7: Fases del ciclo celular	15
Figura 8. Regulación del ciclo celular	17
Figura 9. Esquema general de los mecanismos de progresión de la Enfermedad Renal Progresiva (ERP)	20
Figura 10. Dibujo esquemático de la lesión podocitaria. A) Podocito sano. B) Podocito dañado con fusión podocitaria, atenuación del cuerpo celular y formación de seudocistos, y desunión de la membrana basal glomerular	23
Figura 11. Papel de los podocitos en la degeneración del glomérulo renal	25
Figura 12. Esquema del desarrollo de la adhesión del capilar glomerular a la cápsula de Bowman	26
Figura 13. Degeneración de una nefrona. Filtración incorrecta del glomérulo y expansión del filtrado glomerular	27
Figura 14. Papel central del p27^{kip1} en la inducción de la hipertrofia en las células renales	47
Figura 15. Componentes de la ruta de señalización	52
Figura 16. TGF-β. Mecanismos de activación y transducción de la señal	60
Figura 17. Papel central del TGF-β en la patogénesis de la nefropatía diabética	61

Figura 18. Receptor del PDGF.....	63
Figura 19. Vía de transducción de señal del PDGF	64
Figura 20. Efecto de la angiotensina II en las células vasculares de la secreción de aldosterona.....	66
Figura 21. Papel central de la angiotensina II en la patogénesis de la ERP: efectos hemodinámicos y no hemodinámicos.....	68
Figura 22. Posibles mecanismos de acumulación de matriz inducida por la glucosa.....	71
Figura 23. Fórmula química del quinapril.....	72
Figura 24. Esquema de los factores patogénicos en una nefropatía inducida por lípidos.....	79
Figura 25. Estructura química de la atorvastatina.....	82
Figura 26. Vía metabólica de los productos de la HMG-CoA Reductasa.....	83
Figura 27. Modelo hipotético del papel de algunas quimiocinas durante la E.R.P. (A) Tejido normal, (B) Fase de iniciación, (C) Fase de amplificación, (D) Fase de progresión.....	90
Figura 28. Esquema de activación del NF- B	91
Figura 29. Generación del fragmento competidor	110
Figura 30. Protocolo de cuantificación de citocinas mediante PCR-competitiva.....	111

INDICE DE TABLAS

[Tabla 1. Moléculas de la matriz extracelular, sintetizadas por las células mesangiales in vivo e in vitro](#) 12

[Tabla 2. Funciones del PDGF](#) 62

[Tabla 3. Apolipoproteínas](#) 74

[Tabla 4. Receptores de quimocina CC, distribución tisular y sus ligandos](#) 88

[Tabla 5. Receptores de las quimocinas DARC, CXC, CX3C y C, distribución tisular y sus ligandos](#) 88

[Tabla 6. Composición de la dieta de alimentación A04](#)..... 95

[Tabla 7. Diseño experimental](#)..... 96

[Tabla 8. Secuencias de los cebadores](#)..... 107

[Tabla 9. Evaluación ponderal a las 16 semanas de edad](#)..... 115

[Tabla 10. Evaluación ponderal a las 24 semanas de edad](#)..... 115

[Tabla 11. Evaluación ponderal a las 32 semanas de edad](#)..... 116

[Tabla 12. Presión arterial sistólica](#) 116

[Tabla 13. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 16semanas de edad](#) 117

[Tabla 14. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 24semanas de edad](#) 117

[Tabla 15. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 32semanas de edad](#) 117

[Tabla 16. Glucosa e Insulina a las 16 semanas de edad](#)..... 119

[Tabla 17. Glucosa e Insulina a las 24 semanas de edad](#)..... 119

[Tabla 18. Glucosa e Insulina a las 32 semanas de edad](#)..... 119

[Tabla 19. Colesterol y triglicéridos séricos a las 16 semanas de edad](#)..... 121

[Tabla 20. Colesterol y triglicéridos séricos a las 24 semanas de edad](#)..... 121

INDICE

Tabla 21. Colesterol y triglicéridos séricos a las 32 semanas de edad	121
Tabla 22. Proteinuria (mg/24horas)	122
Tabla 23. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales	124
Tabla 24. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales	124
Tabla 25. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales	124
Tabla 26. Área glomerular séricos a las 16 semanas de edad	126
Tabla 27. Área glomerular a las 24 semanas de edad	126
Tabla 28. Área glomerular a las 32 semanas de edad	126
Tabla 29. Tinción de IL-8. Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción	127
Tabla 30. Tinción de IP-10. Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción	128
Tabla 31. Media del número de células-ED1 positivas en 50 glomérulos por animal en los grupos de 32-semanas de edad	130
Tabla 32. Porcentaje de área positiva para la desmina respecto al área del ovillo glomerular	130
Tabla 33. Inmunohistoquímica del TGF- β1. Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción	132
Tabla 34. Expresión de ARN en el glomérulo del Factor de crecimiento transformante (TGF- β1) y Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B)	134
Tabla 35. Hibridación in situ del TGF- β1	138
Tabla 36. Inmunohistoquímica del NF- κB	138
Tabla 37. Análisis de Regresión lineal multivariante	140

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Tinción hematoxilina-eosina 40X. Presencia de histiocitos espumosos en el glomérulo con inicio de lesión segmentaria..... 125

Foto 2. Tinción hematoxilina-eosina 20X. Foco de inflamación crónica en intersticio. 125

Foto 3. Inmunohistoquímica del IL-8. A la izquierda, foto de RZL, la cual presenta tinción negativa. A la derecha, RZO la cual presenta tinción en los túbulos, cápsula de Bowman y en los podocitos..... 129

Foto 4. Inmunohistoquímica del IP10. A la izquierda RZL. A la derecha, RZO con tinción intersticial..... 129

Foto 5. Inmunohistoquímica de ED1. A la izquierda RZL. A la derecha RZO con presencia de filtrado inflamatorio intersticial rodeando un vaso..... 131

Foto 6. Tinción desmina. Izquierda RZL. Derecha RZO con tinción positiva en podocitos..... 131

Foto 7. Fotografías al microscopio electrónico..... 133

Foto 8. RT-PCR competitiva para PDGF-B 135

Foto 9. RT-PCR competitiva para TGF- 135

Foto 10. Ejemplo del análisis numerico para el TGF- (Foto 9), realizado para el cálculo de la concentración de cada una de las citocinas presentes en cada muestra de ARN. Se realizaron análisis similares para la determinación del PDGF..... 136

Foto 11. Foto NF-kB1 139

INDICE DE GRAFICOS

[Gráfico 1. Valores de Creatinina, Albúmina y Proteinuria en suero](#)..... 118

[Gráfico 2. Valores de Insulina y Glucosa en suero](#)..... 118

[Gráfico 3. Valores de Triglicéridos y colesterol en suero](#)..... 120

[Gráfico 4. Valores de Proteinuria](#)..... 123

[Gráfico 5. Valores de Lesiones segmentarias focales](#)..... 123

[Gráfico 6. Valores semicuantitativos de IL-8](#)..... 127

[Gráfico 7. Valores semicuantitativos de IP-10](#)..... 128

[Gráfico 8. Valores de RNA para TGF \$\beta\$ ₁ y PDGF-B](#)..... 137

ABREVIATURAS

AGL: Ácidos Grasos Libres
AII: Angiotensina II
CDK: Quinasa dependiente de ciclinas
CDKi: Proteína inhibidora de las quinasas dependiente de ciclinas
CETP: Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol
CSF: Factor Estimulante de Colonias
CSF: Factores Estimulante de Colonias
DAG: Diacilglicerol
DMID: Diabetes Mellitus insulino dependiente
DMNID: Diabetes Mellitus no insulino dependiente
ECA: Enzima de Conversión de la Angiotensina
ECM: Matriz extracelular
EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
ERP: Enfermedad Renal Progresiva
EUA: Excreción Urinaria de Albúmina
Fc: Cadena constante de las inmunoglobulinas
FC: factor de crecimiento
FG: Filtrado Glomerular
FSGS: Glomerulosclerosis Focal y Segmentaria
GAP: Proteína de activación GTPasa
GK: Rata Goto-Kakizaki
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HGF: Factor de Crecimiento de los Hepatocitos
HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-metil-glutaril coenzima A reductasa
ICAM-1: Molécula de Adhesión intracelular
IDL: Lipoproteína de densidad intermedia
IECA: Inhibidores del Enzima de Conversión de la Angiotensina
iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico inducible
IP₃: Inositoltrifosfato 3
IRCT: Insuficiencia Renal Crónica Terminal
LAP: Proteína Asociada de Latencia
LCAT: Enzima Colesterol Acil Transferasa
LIF: Factor inhibidor de leucemia

INDICE

LPL: Lipoproteín Lipasa
LTBP: Proteína de Unión del TGF- Latente
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases
MBG: Membrana Basal Glomerular
MBT: Membrana Basal Tubular
MCP-1: Proteína Quimoactante de Monocitos
MVA: Mevalonato
NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
NO: Óxido Nítrico
NZO: Ratón obeso New Zealand
OLEFT: Rata Otsuka Long-Evans Tokushima fatty
PA: Aminonucleósido Puromicina
PAF: Factor Activante Plaquetario
PAI-1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno
PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PGE: Prostaglandina E
PI-3'-K: Quinasa 3'-fosfatidilinositol
PKA: Protein quinasa A
PKC: Proteína quinasa C
PKC: Proteína quinasa C
PLA2: Fosfolipasa A2
PLC- : Fosfolipasa C-
PS: Policación Protamina Sulfato
PTPs: Inhibidor de las Tirosinas Fosfatasas
PUFA: Ácido Graso poli insaturado
RAS: Sistema Renina-Angiotensina
Rb: Retinoblastoma
RZL: Rata Zucker Lean
RZO: Rata Zucker Obese
SF: Factor de diseminación
SHR: Rata hipertensa espontáneamente hipertensa
SNC: Sistema Nervioso Central
TGF- : Factor Transformante de Crecimiento
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
VCAM-1: Molécula de Adhesión Vascular
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

ZO-1: Proteína Zonula Occludens

ZL1: Zucker lean, 16 semanas de edad

ZO1: Zucker obese, 16 semanas de edad

ZL2: Zucker lean, 24 semanas de edad

ZO2: Zucker obese , 24 semanas de edad

ZOQ2: Zucker obese con tratamiento con quinapril, 24 semanas de edad

ZOA2: Zucker obese con tratamiento con atorvastatina, 24 semanas de edad

ZL3: Zucker lean, 32 semanas de edad

ZO3: Zucker obese, 32 semanas de edad

ZOQ3: Zucker obese con tratamiento con quinapril, 32 semanas de edad

ZOA3: Zucker obese con tratamiento con atorvastatina, 32 semanas de edad

RT: Retrotranscripción (molécula de ADN procedente de un ARN)

amol: attomoles (1attomol equivale a 10^{-18} moles)