



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

UTILIZACION DEL BETAGLICANO
SOLUBLE RECOMBINANTE PARA EL
ESTUDIO Y TRATAMIENTO DE LA
NEFROPATIA DIABETICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

PATRICIA JUAREZ CAMACHO



Tutor: DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS.

MÉXICO, D. F.

Octubre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Yo crecí entre boleros y sones, de mi padre heredé la añoranza y la bondad. Mi tío me enseñó la disciplina y el trabajo, y mi tía a apreciar las cosas bellas de la vida: la alegría, la amistad, el amor. De mi madre recibí el mejor ejemplo de vida, me enseñó que la vida no es fácil y que hay que luchar y esforzarse cada día para alcanzar tus sueños.

Bondad, alegría, constancia, trabajo, amor y esfuerzo son los mejores regalos que pudieron darme y que han hecho de mi vida una experiencia única y hermosa. Y en muestra de mi agradecimiento dedico esta tesis con todo mi cariño a:

Mis angeles (que aunque ya no estén viven en mi corazón):

Mi padre Keriberto Juárez Hernández.

Mi Tío Ing. Joaquín Robles Linares.

Mi Tía Graciela Juárez Hernández.

Mi mamita: Guadalupe Camacho Perdomo.

UTILIZACION DEL BETAGLICANO SOLUBLE RECOMBINANTE PARA EL ESTUDIO Y TRATAMIENTO DE LA NEFROPATIA DIABETICA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando López Casillas en el laboratorio 202 oriente en el Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Dr. José Pedraza	Facultad de Química, UNAM
Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la invaluable ayuda del Dr. Rogelio Hernández Pando, por su asesoría en los análisis histológicos. La asesoría de la Dra. Norma Bobadilla para la realización de las pruebas funcionales. La asesoría técnica de la M en C. Ma. de los Remedios Ramirez Rangel en las inmunohistoquímicas. La asesoría y ayuda de Guadalupe Hiriart Valencia y de Erika L. Monterrubio Flores en la histología glomerular. Y a los doctores Claudia Rivera y Héctor malagón su asistencia en el cuidado de los ratones diabéticos.

El proyecto fue realizado con el financiamiento a proyectos auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología y el Howard Hughes Medical Institute. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 6 de octubre del 2006.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri.
Vocal	Dr. Gerardo Gamba Ayala.
Vocal	Dr. Rogelio Hernández Pando.
Vocal	Dra. Marta Menjivar Iraheta.
Secretario	Dra. Norma Bobadilla Sandoval.
Suplente	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio.
Suplente	Dra. Marina Macías Silva.

Agradecimientos

A mi familia: Mi hermanito José de Jesús Flores Camacho, mi tía Nena, mi tía Licha, Betito y Karen, mi tía Mary, mis primos Dulce, Miguel, Jaime, Luis, mis sobrinitos.....lo logre!

Quiero agradecer al Dr. Fernando López Casillas por estos años, por su asesoría, por las charlas, por enseñarme a ver la ciencia de una manera diferente. Por el apoyo siempre recibido, por dejarme volar con mis propias alas.

Agradezco al Dr. Rogelio Hernández Pando y al Dr. José Pedraza por mostrarme la constancia y disciplina de un buen científico, por sus pláticas de la vida, por sus anécdotas.

A la Dra. Norma Bobadilla, por ser un ejemplo para mí, una mujer muy inteligente y dulce, que supo encontrar el equilibrio entre el placer de hacer ciencia y tener una familia. Gracias Norma, por tu amistad, por tus consejos de vida y por elevar mi ánimo cada vez que discutimos mi proyecto.

A mi papa académico Dr. Alejandro Alagón Cano, por tu amistad eterna, por tus sabios consejos porque a pesar de y estar de ya no estar en tu lab, siempre estuviste aquí.

Al LIBB. José Ponce Coria por ser mis otras dos manos y ayudarme con los gorditos, por tomar mi proyecto como tuyo, por tu cariño, por cada uno de los momentos compartidos, muchas gracias por no soltar mi mano, te quiero mucho.

Al MC. Valentin Mendoza por tu amistad, por tu cariño, por hacer de mi estancia en el laboratorio inolvidable, gracias Vale por todas las horas de plática filosófica, por todas las risas, por el betaglicano soluble y los últimos experimentos.

A mis amigos del lab 202 oriente, donde pase momentos inolvidables y me llevo de cada uno un pedacito de lo que son: gracias a Gaby, Dulce, Male, Nancy, Mariana, Vale, Adver, Pepe, Yoshi. Y a los que ya no estaban a la superwoman Vero, Gerardo, Alberto y a José E. A las excursiones a Tolantongo, a los babies, al club de la comida, a las fiestas de fin de año.

A mis queridas amigas y hermanas Naty y Silvia, por quererme tanto.

A mis amiguitas Gaby Soid, Tere Jara, Erendira Avendaño, Lidia Umbarila, Gaby Flores.

A la M en C. Remedios por tu noble corazón, gracias Remy por tu amistad y por tenderme la mano cuando más lo necesitaba.

A Lety García y su fiel compañera Ade, gracias lety por siempre tener una sonrisa cuando llegaba a molestarte con los múltiples trámites del doc, y gracias también por tus consejos y sincera amistad.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellos que han contribuido en mi formación científica y especialmente a la UNAM por ser mi segunda casa y permitirme realizar mis estudios de posgrado en Institutos del más alto nivel académico del país. México Pumas Universidad Goya!

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	I
ABREVIATURAS	V
RESUMEN, ABSTRACT.....	1
INTRODUCCION	2
El TGF- β y su superfamilia	2
Isoformas del TGF- β	4
Activación del TGF- β latente	5
Los receptores y el mecanismo de señalización del TGF- β	7
Receptores accesorio	9
Endoglina	9
Betaglicano	11
El betaglicano soluble	13
Las proteínas Smads	15
Señalización independiente de Smads	17
Funciones del TGF- β	19
Control de la proliferación celular	19
TGF- β y cancer	19
Efectos en el sistema inmune	20
Modulación de la matriz extracelular y reparación de heridas	20
Fibrosis de tejidos	22
Mediadores de la respuesta fibrotica	24
Fibrosis Renal	26
La nefropatía diabética	28
El TGF- β y la nefropatía diabética	31
Estrategias terapéuticas anti-TGF- β en la nefropatía diabética	33
Anticuerpos neutralizantes	33
Inhibición de la ACE	34
Inhibición de la PKC	35
Inhibición de los AGE	35
El SBG un agente potencial en el tratamiento de la nefropatía diabética.....	36

La leptina y la enfermedad renal	37
El ratón diabético db/db	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y METODOS	44
Expresión y purificación del SBG	44
Iodinación del SBG	44
Biodistribución del ¹²⁵ I-SBG	45
Animales y diseño experimental	45
Ensayo de albumina urinaria	46
Extracción del ARN	46
PCR en tiempo real	46
Histología glomerular y morfometría	47
Inmunohistoquímica	47
Análisis estadístico	48
RESULTADOS	49
Análisis de la distribución del ¹²⁵ I-SBG	49
Datos de los animales experimentales	50
Pruebas funcionales	55
Análisis de la expansión de la matriz mesangial	55
Análisis de la expresión del TGF-β y proteínas de matriz extracelular	58
El SBG disminuye la acumulación de la colagena IV y fibronectina	62
La inhibición de los efectos del TGF-β por el SBG es a través de la vía Sma.....	64
DISCUSION	67
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Activación del TGF- β latente.
- Figura 2. Estructura representativa del TGF- β .
- Figura 3. Receptores de señalización del TGF- β .
- Figura 4. Mecanismo de señalización del TGF- β .
- Figura 5. Receptores de señalización del TGF- β .
- Figura 6. El betaglicano es un modulador dual del TGF- β .
- Figura 7. El SBG.
- Figura 8. La familia de las proteínas Smad.
- Figura 9. Dominios de las proteínas Smad.
- Figura 10. Señalización del TGF- β a través de vías independientes de Smad.
- Figura 11. El TGF- β en la reparación de heridas.
- Figura 12. El TGF- β medía la EMT.
- Figura 13. Isoformas del receptor de la leptina y vía de señalización.
- Figura 14. El ratón diabético db/db.
- Figura 15. Distribución del ^{125}I -SBG en suero.
- Figura 16. Distribución del ^{125}I -SBG en tejidos.
- Figura 17. Distribución del ^{125}I -SBG en tejidos.
- Figura 18. Eliminación del ^{125}I -SBG.
- Figura 19. El tratamiento con SBG mejora la función renal de los ratones db/db.
- Figura 20. El tratamiento con SBG disminuye la albuminuria.
- Figura 21. El tratamiento con SBG disminuye la expansión de la matriz mesangial.
- Figura 22. Efecto del SBG sobre la expresión de isoformas del TGF- β .
- Figura 23. El betaglicano soluble regula la expresión de genes de MEC y SGK.
- Figura 24. El tratamiento con SBG disminuye el nivel de colagena IV en el ratón db/db.
- Figura 25. El tratamiento con SBG disminuye el nivel de fibronectina en el ratón db/db.
- Figura 26. Los efectos del SBG son a través de la vía de señalización de las Smads.
- Figura 27. El SBG apaga la señalización de la vía de las Smads.

TABLAS

Tabla 1. Superfamilia del TGF- β .

Tabla 2. Enfermedades fibróticas.

Tabla 3. Patogénesis de la fibrosis.

Tabla 4. Oligos utilizados en la PCR en tiempo real.

Tabla 5. Datos de los animales experimentales.

ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
AGE	Productos de glicosilación terminal
ARP	Acidic Ribosomal Protein
BG	Betaglicano
BMP	Proteína morfogénica del hueso
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
EMT	Transdiferenciación epitelio-mesenquimal
GDF	factor de crecimiento y diferenciación
GFR	Velocidad de filtración glomerular
IFN- γ	Interferon γ
JAK	Cinasa Janus
LAP	Péptido asociado a la latencia
LLC	Complejo grande latente
LTBP	Proteína de union al TGF- β latente
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEC	Componentes de la matriz extracelular
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PKC	Proteína cinasa C
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
SBG	Betaglicano soluble recombinante
SGK	Serum and glucocorticoide kinase
SLC	Complejo latente pequeño
TGF- β	Factor de crecimiento y transformación tipo Beta
TIMP	Inhibidor de metaloproteasas de tejidos
TNF- α	Factor de crecimiento tumoral α
VPF	Factor de permeabilidad vascular
α -SMA	α -actina de músculo liso

RESUMEN

El factor transformante beta (TGF- β) es un mediador clave de las enfermedades renales. El betaglicano, también conocido como receptor III del TGF- β , regula las acciones del TGF- β modulando su acceso a los receptores tipo I y tipo II. La modulación se da de dos maneras: cuando el betaglicano se encuentra unido a la membrana potencia los efectos del TGF- β y cuando se encuentra en forma soluble es un antagonista de las acciones del TGF- β .

En este trabajo se describen los efectos de la administración del betaglicano soluble recombinante (SBG) para el tratamiento de la nefropatía diabética del ratón diabético db/db, un modelo de diabetes tipo II. Ratones diabéticos db/db y sus controles, ratones heterocigotos no diabéticos db/m recibieron 50 μ g de SBG ó vehículo (PBS) por vía intraperitoneal tres veces por semana durante ocho semanas a partir de las ocho semanas. Al final del tratamiento, los ratones db/db tratados con PBS presentaron albuminuria, un aumento en su creatinina sérica y expansión de la matriz mesangial glomerular. Los ratones diabéticos tratados con SBG presentaron una disminución en la creatinina sérica, la albuminuria y el daño renal estructural. Estos efectos fueron asociados con la disminución de los niveles de ARNm de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, colágena IV, colágena I, fibronectina y SGK. También el SBG redujo la acumulación de colágena IV y fibronectina en el glomérulo de los ratones db/db. Todos estos efectos parecen ser mediados a través de la vía de señalización canónica del TGF- β como lo muestra la disminución de la proteína Smad2 fosforilada en las células glomerulares y tubulares de los ratones diabéticos tratados con SBG. Nuestros resultados muestran que el SBG es una molécula con un gran potencial terapéutico comparable a otros agentes neutralizantes del TGF- β . Debido a que el SBG tiene alta afinidad por todas las isoformas del TGF- β , puede ser encontrado de manera natural en el suero y tejidos, y su corte puede ser regulado, podría ser utilizado con éxito en el tratamiento a largo plazo de enfermedades renales y otras patologías en donde el TGF- β juega un papel patofisiológico.

ABSTRACT

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a key mediator of renal diseases. Betaglycan, also known as the type III TGF- β receptor, regulates TGF- β action by modulating its access to the type I and II receptors. This modulation is two fold: as a membrane bound receptor, betaglycan enhances TGF- β actions, and as a soluble receptor is an antagonist of TGF- β actions.

This work describes the effects of the administration of recombinant soluble betaglycan (SBG) for the treatment of the diabetic nephropathy of the db/db mouse, a model of type 2 diabetes. Eight-week-old db/db mice and heterozygotes non diabetic db/m littermates were injected intraperitoneally with 50 μ g of SBG or vehicle (PBS), three times per week during 8 weeks. At the end of the treatment, the PBS-treated db/db mice developed albuminuria, an increase in its serum creatinine, and glomerular mesangial matrix expansion. The db/db mice treated with SBG exhibited reduction in serum creatinine, albuminuria and structural renal damage. These effects were associated with lower kidney levels of mRNAs encoding TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, collagen IV, collagen I, fibronectin and SGK. SBG treatment also decreased the accumulation of collagen IV and fibronectin in the glomerulus of the db/db mice. All these effects appear to be mediated through the canonical TGF- β signaling pathway as evidenced by the decrease of phospho-Smad2 in glomerular and tubular cells of the db/db mice treated with SBG. Our results show that SBG is a molecule with a big potential therapeutic similar to others anti-TGF- β agents.

Because SBG has high affinities for all TGF- β isoforms, it is found naturally in serum and tissues and its shedding can be regulated, we believe that it could be utilized for the long-term treatment of kidney diseases and other pathologies in which TGF- β plays a physiopathological role.

INTRODUCCION

EL TGF- β y su superfamilia

El factor transformante tipo beta, mejor conocido por sus siglas en ingles TGF- β ("Transforming Growth Factor β ") fue purificado por primera vez como una proteína homodimérica de 25 kDa a partir de placenta humana, plaquetas y de riñón bovino [Roberts *et al*, 1981]. Se le dio el nombre de factor transformante debido a su habilidad para inducir la transformación de las células normales en células aparentemente tumorales. Posteriormente, fue demostrado que el TGF- β inhibe el crecimiento de las células epiteliales y regula un gran número de funciones celulares relacionadas no solo con la transformación celular. Desde su descubrimiento hasta la fecha, se ha encontrado que el TGF- β participa en un gran número de procesos esenciales para la homeostasis de todos los tejidos del organismo, incluyendo proliferación celular, embriogénesis, regulación inmune, reparación de tejidos y muerte celular. La importancia del TGF- β para la medicina humana radica en que la desregulación de sus acciones propicia enfermedades neoplásicas, inflamatorias crónicas, autoinmunes y fibróticas [Border y Rouslahti, 1992].

El TGF- β es miembro de una gran familia de más de 42 miembros de factores de crecimiento polipeptídicos, identificados en vertebrados e invertebrados [Yigong y Massagué, 2003]. La superfamilia incluye a las isoformas del TGF- β , activinas e inhibinas, los factores de crecimiento y diferenciación (GDF) y proteínas morfogenéticas del hueso (BMP). Miembros más distantes incluyen a la proteína nodal y lefty, las cuales están involucradas en el desarrollo embrionario. La proteína Dpp ("decapentaplegic protein") ha sido encontrada en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y Daf-7 ha sido identificada en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Tabla 1). Muchas de las funciones y propiedades de la superfamilia del TGF- β estan conservadas desde los gusanos hasta los humanos indicando la importancia de esta familia [Yigong y Massagué, 2003].

Tabla 1. La familia del TGF- β y sus actividades representativas.

Nombre (Homologo)	%	Actividades representativas
Subfamilia BMP2		
BMP2 (Dpp ^D)	100	Gastrulación, neurogénesis, condroigénesis, apoptosis interdigital
BMP4	92	
Subfamilia BMP5		
BMP5 (60 A ^D)	61	Junto con BMP2 y BMP4 participa en el desarrollo de órganos y neurogénesis
BMP6/Vgr1	61	
BMP7/OP1	60	
BMP8/OP2	55	
Subfamilia GDF5		
GDF5/CDMP1	57	Condrogénesis en el desarrollo de extremidades
GDF6/CDM2	54	
GDF7	57	
Subfamilia VG1		
GDF1 (Vg1 ^x)	42	Inducción mesodérmica axial en ranas y peces
GDF3/VGr2	53	
Subfamilia BMP		
BMP3/osteogenina	48	Diferenciación osteogénica, formación de huesos y quimiotaxis de monocitos
GDF10	46	
Miembros Intermedios		
Nodal (Xnr 1 a 3 ^x)	42	Inducción del mesodermo axial, regulación de la diferenciación celular en el tubo neural, Inhibición del crecimiento del músculo esquelético.
Dorsalina	40	
GDF8	41	
GDF9	34	
Subfamilia activina		
Activina β A	42	Producción de la hormona folículo estimulante (FSH), diferenciación celular eritroide
Activina β B	42	
Activina β C	37	
Activina β E	40	
Subfamilia TGF-β		
TGF- β 1	35	Control de la proliferación y diferenciación celular, reparación de heridas producción de matriz extracelular, inmunosupresión
TGF- β 2	34	
TGF- β 3	36	
Parientes distantes		
MIS/AMH	27	Regresión del tubo Mülleriano,
Inhibina α	22	Inhibición de la activina,
GDNF	23	Desarrollo del riñón

Los miembros listados han sido identificados en Humano y/o ratón. Entre paréntesis se muestran los homólogos en *Drosophila* (^D) y *Xenopus* (^x). %, se refiere a la identidad de amino ácidos con respecto a BMP2. GDF, factor de diferenciación y crecimiento. CDMP, proteína morfogenética derivada del cartílago. MIS/AMH, Sustancia inhibidora

de la hormona Mülleriana. GDNF, factor neurotrófico derivado de la célula glial. [Tabla modificada de Massagué J, 1998].

Isoformas del TGF- β

Se conocen 5 isoformas del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 se encuentran presentes en mamíferos; TGF- β 4 ha sido encontrada solo en aves y es homóloga al TGF- β 1; y TGF- β 5 se encuentra en anfibios. Las isoformas del TGF- β en mamífero, son ampliamente expresadas y actúan prácticamente en cualquier tipo celular. En el humano se localizan en 3 cromosomas diferentes (19, 1 y 14) y se encuentran bajo el control de diferentes promotores [Fujii *et al*, 1986; Barton *et al*, 1988]. Los tres genes tienen una estructura similar y exhiben un alto grado de conservación en su secuencia, sugiriendo que derivan de un ancestro común [Sporn y Roberts, 1990].

En estudios *in vitro*, las tres isoformas del TGF- β tienen efectos biológicos similares, sin embargo en sistemas *in vivo* se cree que tienen acciones biológicas específicas. Esto se infiere de los fenotipos no redundantes de los ratones knock-out para cada una de las isoformas del TGF- β .

El 50% de los ratones knock-out para TGF- β 1 (TGF- β 1^{-/-}), mueren intrauterinamente, y el resto que llega a término parecen ratones normales durante las 2 primeras semanas de vida pero desarrollan inflamación generalizada y mueren entre las 3 y 4 semanas de edad. Los ratones presentan inflamación multifocal en muchos tejidos. El corazón y el pulmón se ven severamente afectados. Se observa un incremento en la adhesión de leucocitos al endotelio de las venas pulmonares e infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar. El corazón se ve afectado por endocarditis que progresa a miocarditis. Los ratones mueren de daño cardiopulmonar [Kulkarni *et al*, 1995]. Los ratones TGF- β 2^{-/-} presentan mortalidad perinatal y una amplia variedad de defectos en el desarrollo que incluyen defectos cardiacos, pulmonares, craneofaciales, de los miembros, oído interno y defectos urogenitales. Los procesos de desarrollo involucrados comúnmente en los tejidos afectados incluyen interacciones epitelio-mesenquimales, crecimiento celular, producción de matriz extracelular y remodelación de tejidos [Sanford *et al*, 1997]. Los ratones TGF- β 3^{-/-} mueren a las horas de nacidos con un fenotipo único consistente en defectos en el desarrollo pulmonar y en la formación del paladar. Lo que demuestra la participación de esta isoforma en la morfogénesis

normal del paladar y pulmón y su implicación directa en los mecanismos epitelio-mesenquimales en estos órganos [Kaartinen *et al*, 1995].

Síntesis y activación del TGF- β

Las tres isoformas del TGF- β son sintetizadas y secretadas como complejos inactivos [Derynck *et al*, 1985]. Estos complejos latentes no se pueden unir a sus receptores en la superficie de las células y por lo tanto son biológicamente inactivos. De este modo la activación del TGF- β latente es un punto posible de control para la regulación de su actividad *in vivo* [Brown *et al*, 1990].

La forma biológicamente activa de las isoformas del TGF- β es un dímero de 25 KDa. Sin embargo, el TGF- β es secretado en su forma inactiva como un precursor latente de 100 KDa. El precursor dimérico, proTGF- β consta de 390 aminoácidos. Los 112 residuos localizados en el carboxilo terminal constituyen la forma activa y madura del TGF- β , mientras que los residuos restantes corresponden al péptido asociado a la latencia LAP ("latency associated peptide"). El precursor dimérico tiene un péptido señal en el amino terminal que lo dirige a la vía de secreción y un prodominio que es necesario para el plegamiento y dimerización del factor [Massagué, 1998]. Antes de ser secretado el precursor dimérico sufre un corte proteolítico que separa al TGF- β maduro del LAP. Este corte proteolítico es realizado por endopeptidasas como la furina [Dubois, 1995]. El TGF- β procesado se secreta como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y el TGF- β maduro, este complejo es denominado complejo latente pequeño o SLC ("small latent complex"). El SLC es liberado de la célula en forma constitutiva. El SLC se unen a la matriz extracelular a través de una proteína llamada proteína de unión al TGF- β latente LTBP ("latent TGF- β binding protein") formando un complejo inactivo de mayor tamaño, conocido como complejo latente mayor o LLC ("large latent complex") (figura 1) [Miyazono *et al*, 1988].

Para que el TGF- β se active, es necesario que se libere del LAP. La liberación del TGF- β del LAP se puede realizar *in vitro* con procesos físicos como cambios de temperatura, pH ó plasmina [Miyazono *et al*, 1993, Lawrence

et al, 1985; Lyons *et al*, 1988]. La activación del TGF- β *in vivo* aún no es bien entendida, sin embargo, se ha propuesto la participación de la trombospondina-1. La trombospondina-1 se une a través de su secuencia KRFK a la secuencia LSKL en el amino terminal del LAP. Esta interacción produce un cambio conformacional del LAP que permite la activación del TGF- β [Crawford, 1998; Murphy-Ullrich, 2000].

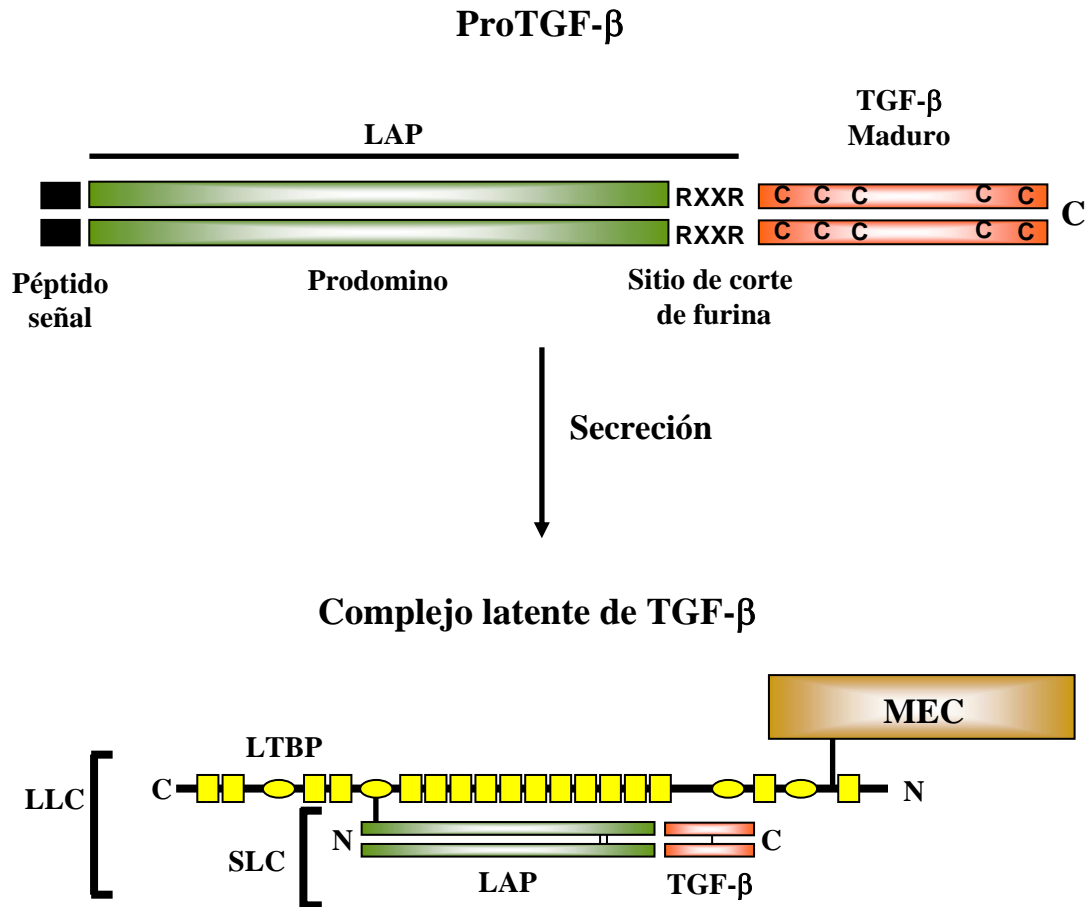


Figura 1. Activación del TGF- β latente. El TGF- β se sintetiza como un precursor dimérico que se secreta al medio extracelular en su forma inactiva como proTGF- β . Después de secretarse el TGF- β queda asociado a un complejo grande de latencia (LLC) compuesto por LTBP (“latent TGF- β binding protein”) y por el LAP (“latency associated peptide”) correspondiente a la región amino del precursor del TGF- β . El LAP y la LTBP se mantienen asociados a la matriz extracelular (MEC) mediante puentes disulfuro. [Modificado de Massagué, 1998]

El TGF- β , liberado puede encontrarse unido a proteínas séricas ó a componentes de matriz extracelular, como son la α -macroglobulina [O'Connor-McCourt, 1987] y la decorina [Yamaguchi, 1990], o bien a proteínas

acarreadoras que preservan su actividad como la albúmina y las IgG [Clark, 1998]. Recientemente se identificó a la proteína Emilin 1, una glicoproteína rica en cisteínas expresada en la vasculatura. Emilin 1 modula la disponibilidad del TGF- β al unirse al precursor del TGF- β y prevenir su maduración [Zacchigna *et al*, 2006]. La forma activa del TGF- β es un dímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas fortalecidas por un puente disulfuro interno (figura 2). Cada monómero comprende varias cadenas beta extendidas entrelazadas por tres cadenas disulfuro conservadas que forman una estructura conocida como “nudo de cisteínas” [McDonald y Hendrickson, 1993]. La región madura contiene 7 residuos de cisteína los cuales son característicos en las proteínas de la familia del TGF- β . Los residuos de cisteína participan en la unión intermolecular e intramolecular de los puentes disulfuro. El arreglo dimérico de los ligandos sugiere la formación de un complejo con dos receptores tipo I y dos receptores tipo II [Yigong y Massagué, 2003].

Los receptores y el mecanismo de señalización del TGF- β

El TGF- β señala a través de dos glicoproteínas transmembranales con actividad de cinasas de serina/treonina, el receptor tipo I, también llamado ALK-5 de “activin receptor-like kinase 5” y el receptor tipo II (figura 3). Estos receptores de aproximadamente 55 kDa y 70 kDa, respectivamente, están constituidos por un dominio extracelular amino terminal que une al ligando, una región transmembranal y un dominio de cinasa de residuos de serina/treonina en el carboxilo terminal [Shi *et al*, 2003].

**TGF- β 3
(homodímero)**

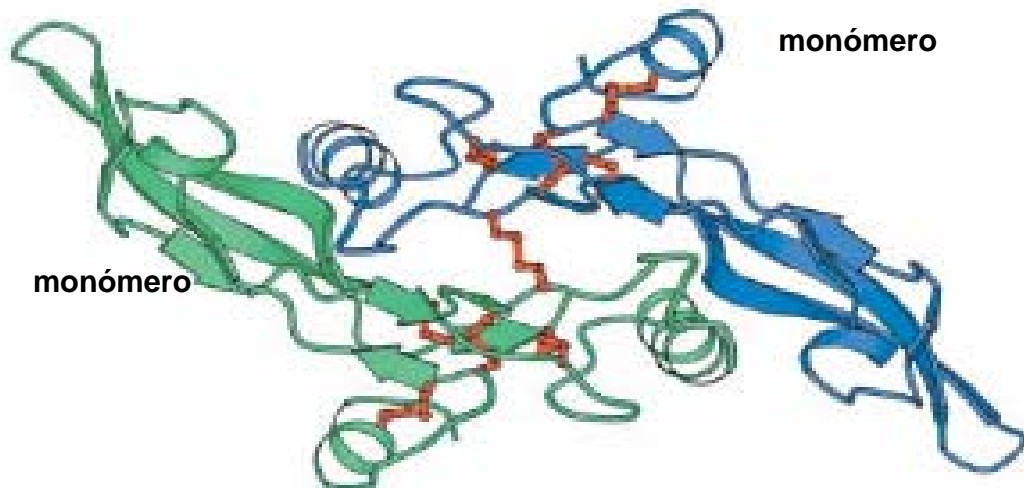


Figura 2. Estructura representativa del TGF- β . La figura muestra la estructura del TGF- β 3 (Mittl et al, 1996). Los monómeros están coloreados en azul y verde respectivamente. Las cadenas de cisteínas se muestran en rojo. Los dimeros están unidos por un puente disulfuro formado en la Cis77. [Modificado de Yigong y Massagué, 2003]

La señalización del TGF- β se inicia cuando el ligando se une al receptor II en la superficie celular. La unión del ligando a sus receptores induce la formación de un complejo en donde la proximidad de los dominios cinasa de los receptores provoca un cambio conformacional que facilita la fosforilación y la consecuente activación del receptor tipo I. El receptor tipo II es constitutivamente activo aunque su regulación no es completamente entendida. El receptor tipo II fosforila a las serinas y treoninas múltiples en la secuencia TTSGSGSG de la región GS ubicada en el amino terminal del dominio de cinasa del receptor tipo I, permitiendo su activación y subsecuente unión y fosforilación de sus sustratos, las proteínas R-Smad. Las R-Smad fosforiladas se unen a la Co-Smad (Smad4) formando un complejo que se transloca al núcleo y en concierto con cofactores nucleares regulan la transcripción de genes blanco (figura 4) [Massagué, 1998].

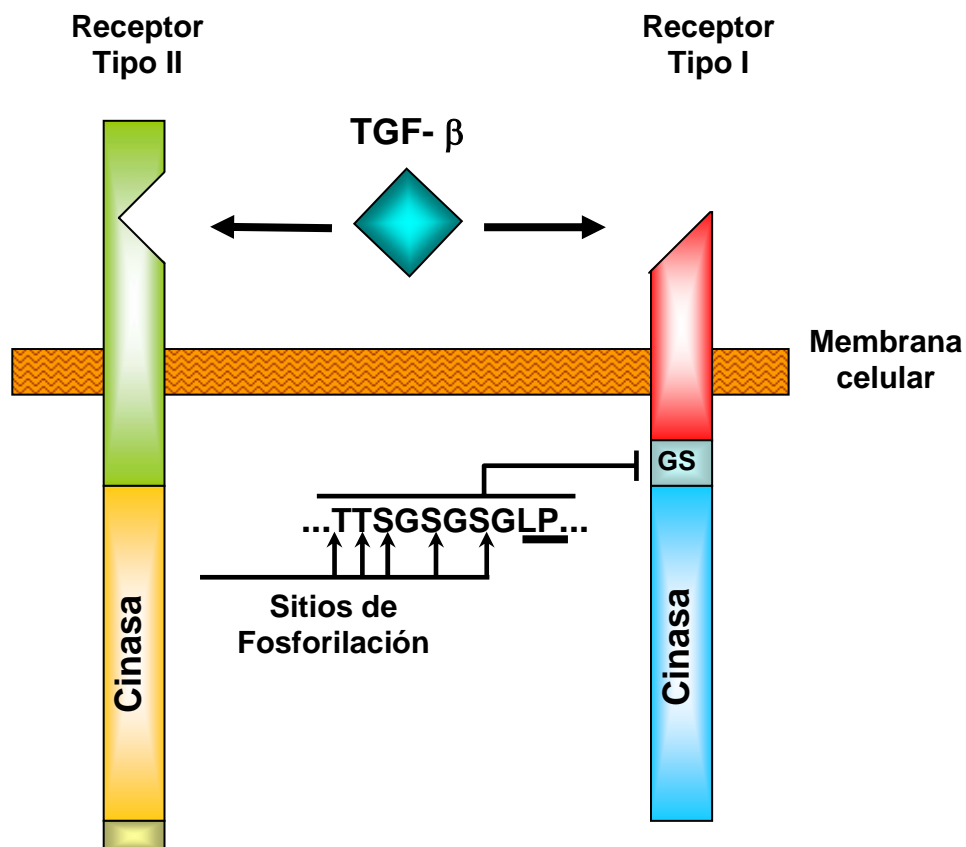


Figura 3. Receptores de señalización del TGF- β . Los receptores tipo I y II son glicoproteínas transmembranales con un péptido señal en el amino terminal. Estructuralmente ambos consisten en una pequeña región extracelular rica en cisteínas y una porción intracelular que contiene al dominio de cinasa. El receptor II es activo constitutivamente mientras el receptor tipo I requiere de la actividad del receptor II para activarse. Después de la unión del TGF- β al receptor II se forma un complejo entre los dos receptores donde el receptor II fosforila en la región GS al receptor I activándolo. [Modificado de Massagué, 1998].

Los pasos que permiten la activación de los receptores son regulados fuertemente. El acceso del TGF- β a sus receptores está controlado por dos clases de moléculas con funciones opuestas. Una clase comprende un diverso grupo de proteínas solubles que actúan como atrapadoras del ligando, secuestrándolo e impidiendo su acceso a los receptores de membrana. Estas proteínas incluyen la pro-región del precursor del TGF- β LAP, el proteoglicano decorina y la proteína circulante α 2-macroglobulina que se une al TGF- β libre [Massagué y Chen 2000].

Otra clase de moléculas que controlan el acceso del TGF- β a sus receptores incluye proteínas ancladas a la membrana que actúan como receptores accesorios ó co-receptores promoviendo la unión del ligando a sus

receptores pero sin participar directamente en la señalización como la endoglina y el Betaglicano (figura 5).

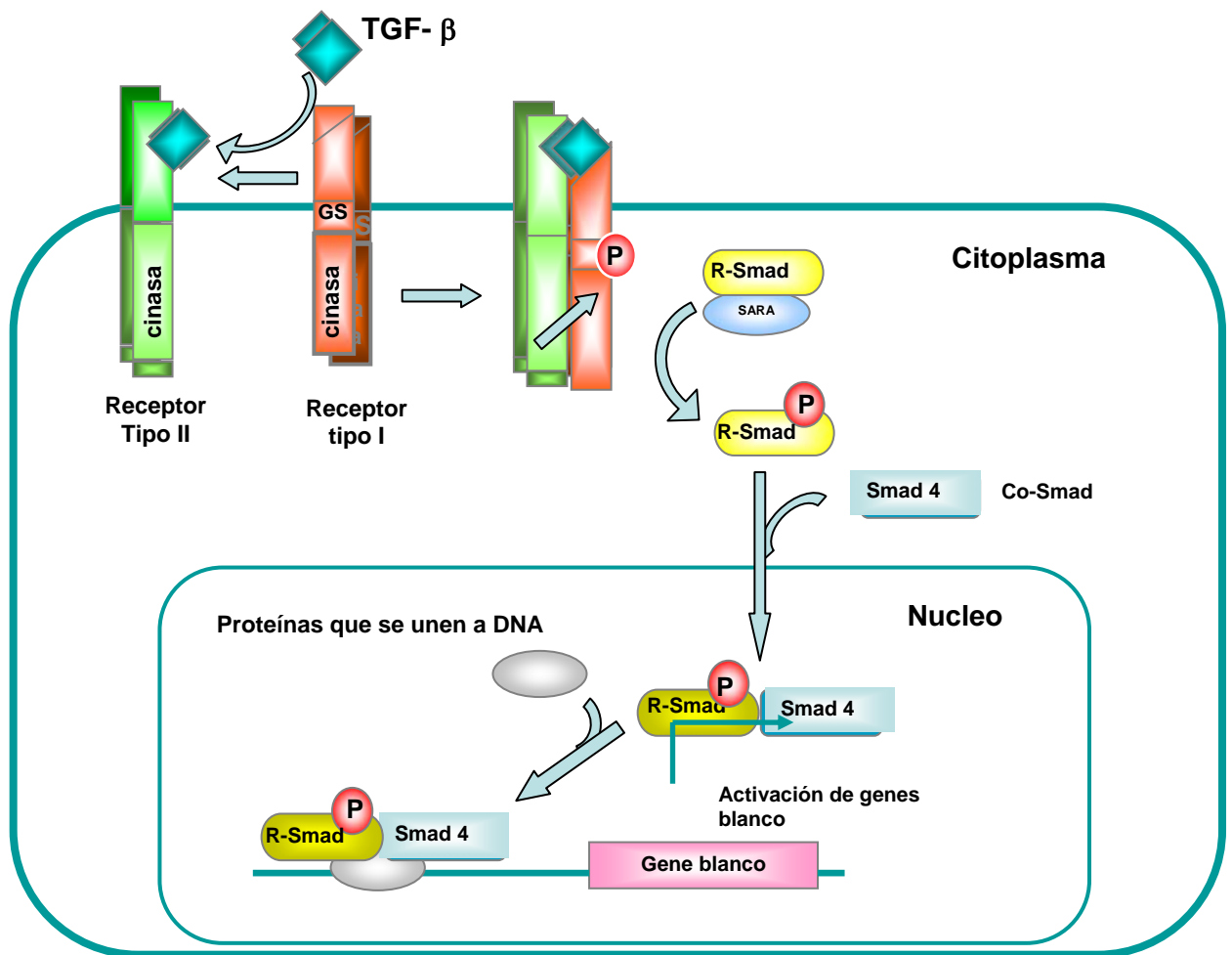


Figura 4. Mecanismo de señalización del TGF-β. En la superficie celular el TGF-β se une al receptor II e induce la formación de un complejo donde el receptor II transfosforila el dominio GS del receptor I. El receptor I activado fosforila a la proteína R-Smad que al activarse es capaz de unirse con la proteína Smad4 formando un complejo que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco a través de la interacción con factores transcripcionales y coactivadores. [Modificado de Massagué, 1998].

Receptores accesorios

Endoglina

La endoglina es una glicoproteína homodimérica de 180 kDa que se expresa abundantemente en las células endoteliales y en bajos niveles en monocitos, precursores eritroides y otros tipos celulares [Lastres *et al*, 1996]. El gen que codifica para la endoglina, ha sido identificado como el blanco de la telangectasia hemorrágica tipo I [McAllister, 1995]. Una enfermedad hereditaria

autosómica dominante que consiste en displasia vascular, sangrado gastrointestinal y malformaciones arteriovenosas en el cerebro, pulmón e hígado [Shovlin, 1997].

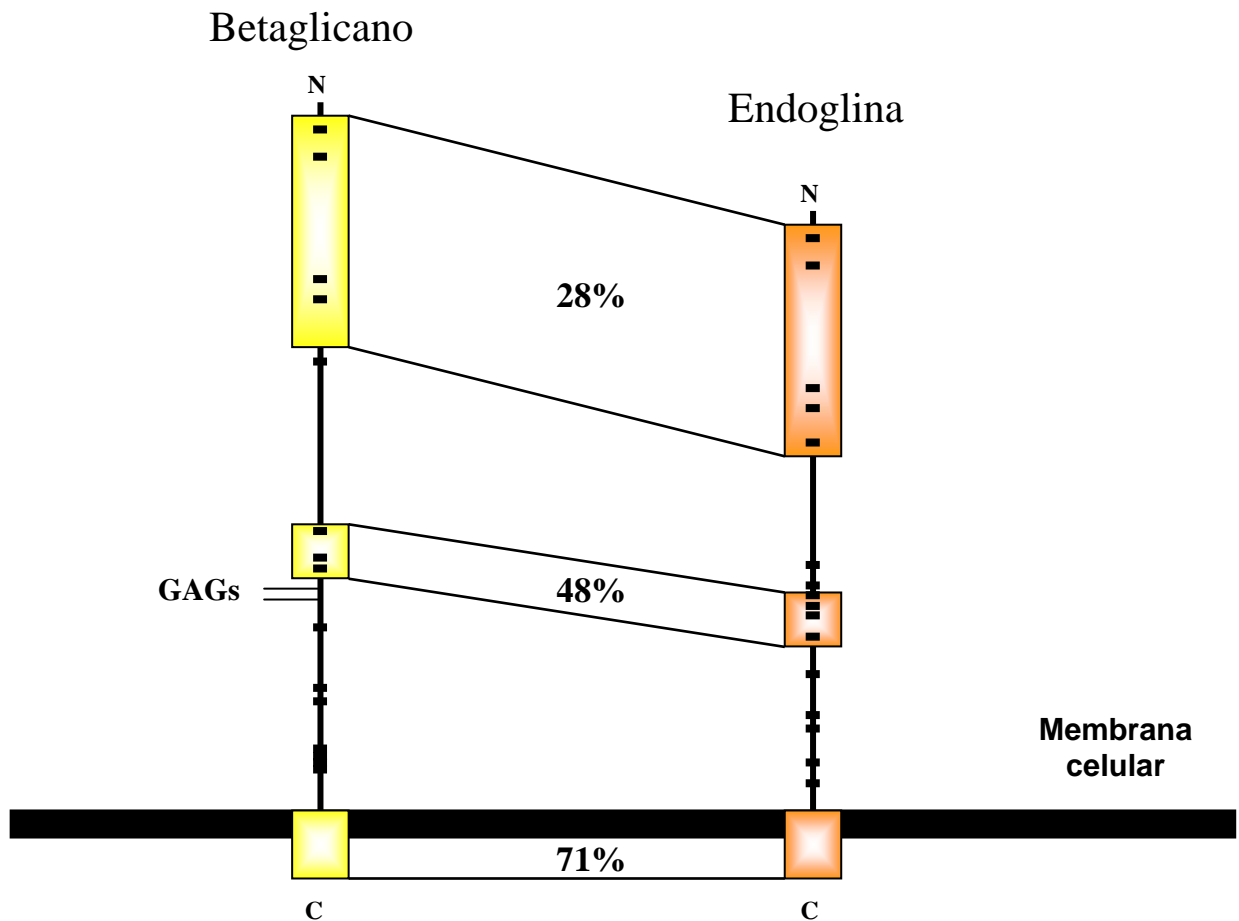


Figura 5. Receptores accesorios del TGF- β . El betaglicano y la endoglina se consideran receptores accesorios porque no participan directamente en la señalización del TGF- β pero regulan su acceso a los receptores de señalización. El betaglicano de 853 aminoácidos y la endoglina de 633 aminoácidos tienen grandes dominios extracelulares, una región transmembranal y una pequeña región citoplásmica. En su ectodominio tienen 28% y 48% de similitud en dos regiones, en su región transmembranal y citosólica presentan un 73% de identidad. [Modificado de Cheifetz]

La endoglina se expresa en forma dimérica unida por puentes disulfuro [Bellón *et al*, 1993], une con mayor afinidad a las isoformas TGF β 1 y TGF β 3 y a diferencia del betaglicano no une a la isoforma TGF- β 2 [Cheifetz y Bellón *et al*, 1992]. Como en el caso del betaglicano, la endoglina forma complejos con los receptores del TGF- β [Yamashita H *et al*, 1994]. Sin embargo el papel de la endoglina en la señalización del TGF- β no es muy claro. La endoglina también puede interactuar con la activina A y BMP-7, sin embargo requiere de la

coexpresión del receptor tipo II correspondiente de cada factor para interactuar con el ligando. También une a BMP-2, pero en este caso requiere la presencia del receptor tipo I ALK3 o ALK6 [Barbara, 1999].

Betaglicano

El Betaglicano (BG), también conocido como receptor III del TGF- β , es un proteoglicano transmembranal de 250-350 KDa, modificado postraduccionalmente en su porción extracelular por la adición de cadenas de glicosaminoglicanos del tipo heparan y condroitin sulfato [Cheifetz *et al*, 1988]. En las células el betaglicano se encuentra como homodímero ampliamente distribuido, se expresa en tejido fetal y adulto, incluyendo células mesenquimales, epiteliales, neuronales y otros tipos celulares. Sin embargo, no está presente en cierto tipo de células como mioblastos, endoteliales y células hematopoyéticas. De los receptores del TGF- β , el BG es el más abundante y el de mayor afinidad por el TGF- β . [Massague, 1990].

El BG une las tres isoformas de TGF- β , la unión se da a través de la región proteica extracelular y no depende de la presencia de los glicosaminoglicanos [López-Casillas *et al*, 1991]. El cDNA del BG codifica para 853 aminoácidos, la región transmembranal y citoplásmica muestra el 71% de identidad a nivel de aminoácidos con la endogлина [Cheifetz *et al*, 1992]. El resto de la porción extracelular tiene un 28% de homología con los receptores espermáticos ZP2 y ZP3, uromodulina y la proteína de membrana presente en los gránulos pancreáticos GP-2 [Bork y Sander, 1992]. El significado de esta homología es desconocida [López-Casillas *et al*, 1994].

El betaglicano une al TGF- β a través de sus dominios N-terminal y C-terminal [López-Casillas, *et al* 1994; Esparza-López *et al*, 2001] y se une a las tres isoformas del TGF- β con alta afinidad [Segarini *et al*, 1989; Cheifetz y Massagué, 1991]. El BG facilita la unión del TGF- β al receptor II mediante la formación de un complejo betaglicano/TGF- β /receptor II [López-Casillas, 1993]. El betaglicano puede actuar como reservorio para la presentación del ligando a sus receptores y para aumentar la unión de sus ligandos al receptor II, particularmente para la isoforma TGF- β 2. En ausencia del BG, solo el 10% de los receptores tipo II pueden interactuar con la isoforma TGF- β 1 [López-

Casillas *et al*, 1993]. Cuando el BG se encuentra cerca del receptor tipo II, existe un estado de alta afinidad para las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2. Este cambio en la afinidad de unión se cree que es el resultado de la interacción directa del BG con un complejo formado por el ligando y el receptor II. La formación de este complejo ternario es dependiente de la presencia del ligando e independiente del receptor tipo I del TGF- β , experimentos con mutantes del receptor III apoyan este hecho, ya que son incapaces de unir TGF- β y no aumentan la unión del ligando al receptor II [López-Casillas *et al*, 1993]. De esta forma cuando el betaglicano está presente compensa la baja afinidad que tienen los receptores de señalamiento por el ligando, permitiendo con ello una equipotenciación de la unión de las diversas isoformas [Cheifetz y Massagué 1991, López-Casillas *et al*, 1993].

El betaglicano modula las acciones de otros miembros de la familia del TGF- β : la activina y las BMPs. El betaglicano es coreceptor de la inhibina, proteína antagonista de la activina, y al unirse a ésta inhibe indirectamente las acciones de la activina. Cuando la inhibina se une al betaglicano recluta al receptor tipo II de la activina en un complejo que impide que este se una con el receptor II de la activina [Lewis *et al*, 2000]. La capacidad del betaglicano de unir a la inhibina reside en la región extracelular similar a la uromodulina sobrelapandose con el sitio de unión al TGF- β [Esparza-López *et al*, 2001; Vale *et al*, 2006]. La proteína BMP también puede utilizar al receptor tipo II de la activina para señalizar, por lo tanto la unión del betaglicano y la inhibina no solo bloquea las acciones de la activina sino también las de BMP. El betaglicano confiere además al receptor tipo II de las BMPs la habilidad de unir a la inhibina con lo cual compite con las BMPs por la unión a su receptor y de esta manera antagoniza las respuestas de las BMPs [Wiater, 2003]. Por lo tanto, el betaglicano es un coreceptor muy versátil que puede modular la acción de varios miembros de la superfamilia del TGF- β .

Adicionando un nivel más de complejidad a las funciones del betaglicano, pareciera que dependiendo del contexto celular, el betaglicano puede tener diferentes funciones, como lo muestra un estudio en células del epitelio renal LLC-PK donde el betaglicano inhibe la señalización por TGF- β

bloqueando la formación del complejo T β RI/T β RII, esta inhibición es mediada por las cadenas GAGs presentes en el betaglicano [Eickelberg, 2002].

Otra función importante del betaglicano es su participación en la transformación de las células endoteliales en el corazón de pollo [Brown *et al*, 1999]. Las células endoteliales cardiacas que sufren transformación epitelio mesenquimal expresan betaglicano y si se utiliza un anticuerpo anti-betaglicano en este modelo, se inhibe la formación del mesenquima y la migración de las células endoteliales del atrioventrículo. Durante la morfogénesis, el TGF- β 2 se expresa específicamente en el atrioventricular y se encuentra aumentado en el atrioventricular del corazón de pollo y de ratón (Dickson, *et al* 1995). Dentro del fenotipo que muestran los ratones que carecen del gen TGF- β 2 [Sanford *et al*, 1997] se incluyen defectos en el desarrollo del corazón. Por lo que se cree que el efecto del betaglicano en la formación del atrioventricular en pollo esta mediado por su unión a TGF- β 2 modulando la actividad de los receptores tipo I y II del TGF- β [Brown *et al*, 1999].

Por último, en los ratones knock-out del betaglicano (T β RIII^{-/-}), se observó que al día 13.5 del desarrollo embrionario, los ratones desarrollan defectos proliferativos letales en el corazón y apoptosis en el hígado, indicando que el betaglicano es requerido durante el desarrollo embrionario del ratón. Los ratones deficientes en betaglicano se ven afectados en las funciones del TGF- β , particularmente se reduce la sensibilidad al TGF- β 2 [Stenvers *et al*, 2003].

El betaglicano soluble

Además de la forma membranal, el betaglicano puede encontrarse como una forma soluble, la cual se genera a partir del corte proteolítico de la región extracelular del betaglicano membranal. El betaglicano soluble se puede encontrar de forma natural en el suero y matrices extracelulares [Andres, 1989]. En estudios *in vitro* utilizando células transfectadas con el cDNA que codifica para el betaglicano, se encontró que el SBG puede ser liberado al medio [López-Casillas, 1991]. En ciertos tipos celulares, el pervanadato, un inhibidor de tirosin-fosfatasa, induce la liberación de un fragmento de 120 kDa correspondiente al tamaño reportado para el dominio extracelular del betaglicano membranal, además produce un fragmento más pequeño de 90

kDa que es generado por la metaloproteasa de matriz MT1-MMP [Velasco-Loyden, 2004].

El betaglicano soluble une a las isoformas del TGF- β con alta afinidad, pero en contraste con el betaglicano membranal, secuestra al TGF- β y le impide su unión con sus receptores de señalización [López-Casillas, 1994]. De modo que el betaglicano puede ser considerado como un modular dual de los efectos del TGF- β , cuando se encuentra unido a membrana potencia sus efectos y cuando se encuentra como proteína soluble los antagoniza (figura 6) [López-Casillas, 1994].

En nuestro laboratorio se ha preparado y caracterizado la forma soluble del betaglicano como proteína recombinante (SBG) usando el sistema de expresión del baculovirus en células de insecto (figura 7). El cDNA silvestre del betaglicano de rata se modificó para producir una proteína secretoria que contuviese el dominio extracelular de receptor [Vilchis-landeros *et al*, 2001]. El SBG se expresa como una proteína homodimérica formada por monómeros de 110 KDa unidos no covalentemente, carece de glicosaminoglicanos y tiene una menor carga de otros oligosacáridos, lo que podría favorecer su distribución sistémica. El SBG se une a las isoformas del TGF- β con alta afinidad, la afinidad del SBG por el TGF- β 1 (Kd 3.5 nM) es comparable a la del betaglicano soluble que se encuentra en fuentes naturales [Andres *et al*, 1989]. La afinidad por el TGF- β 2 es por lo menos 5 veces mayor que la del TGF- β 1 y es similar a la del betaglicano unido a membrana [Vilchis-landeros *et al*, 2001].

La inhibición de la respuesta a TGF- β por el SBG fue analizada en células Mv1Lu transfectadas con el reportero p3TP-lux que responde a TGF- β . Se encontró que el SBG bloquea la respuesta a las isoformas del TGF- β en el siguiente orden: TGF- β 2>TGF- β 3>TGF- β 1 [Vilchis-landeros *et al*, 2001]. La potencia inhibidora del SBG sobre el TGF- β es diez veces mas alta para el TGF- β 2 que para el TGF- β 1 y comparada con la potencia neutralizante anti-TGF- β de un anticuerpo comercial (AB-100-NA R&D Systems) es mucho más potente para la isoforma TGF- β 2 y similar para el TGF- β 1 [Vilchis-Landeros *et al*, 2001]. Un dato muy importante es que la inhibición del SBG por las isoformas del TGF- β es específica ya que no inhibe a ningún otro miembro de la familia del TGF- β [Vilchis-landeros manuscrito en preparación].

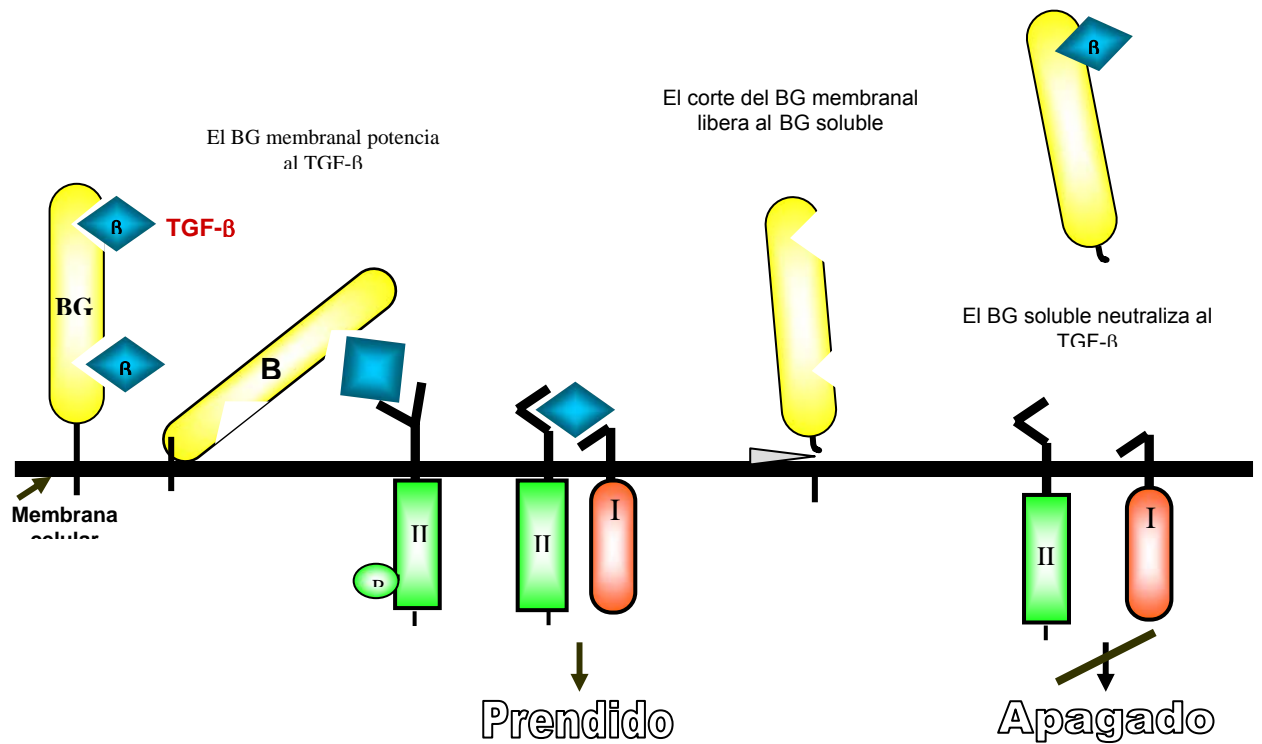


Figura 6. El betaglicano es un modular dual del TGF- β . El betaglicano es un proteoglicano de membrana que incrementa la afinidad del TGF- β al receptor tipo II aumentando su responsividad al TGF- β , la forma soluble del betaglicano es generada a partir del corte proteolítico del betaglicano membranal, el betaglicano soluble secuestra al TGF- β impidiendo su unión con sus receptores. [Modificado de Juárez et al, en prensa]

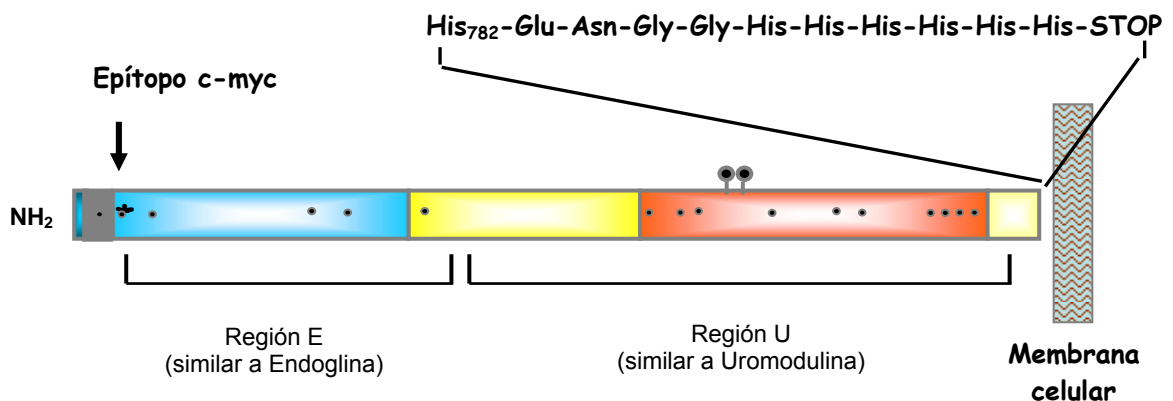


Figura 7. El betaglicano soluble recombinante. El cDNA del betaglicano de rata fué modificado insertando un codon de terminación antes de la region transmembranal. Para facilitar la purificación de la proteína se incluyó una secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal y la secuencia c-myc en el amino terminal. El cDNA se subclonó en el vector pBluBac4 para la creación del baculovirus que al infectar células de insecto produce SBG.

Las proteínas Smad

Las proteínas Smad son los efectores nucleares de los miembros de la familia del TGF- β . Fueron descubiertas a través de estudios genéticos en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*, el nombre de Smad se originó de la fusión de los nombres dados en estas especies Mad (Mothers against dpp) y Sma respectivamente [Attisano y Wrana, 2000]. La familia Smad puede ser dividida dentro de tres subfamilias: Smads reguladas por receptor (R-Smads), Smad común (Co-Smad) y Smads inhibitorias (I-Smads), (figura 8). En ausencia del ligando, las R y Co-smads se encuentran en el citoplasma. Cuando el receptor I es activado interactúa específicamente con la R-Smad y la fosforila. La R-Smad activada recluta a las Co-Smad formando un complejo heteromérico que se transloca al núcleo, donde regula la transcripción de genes blanco [Massagué y Wotton, 2000].

La subfamilia de las R-Smads se divide en dos grupos: BMP-Smads y TGF- β /activina Smads. Smad1, Smad5 y Smad8 son fosforiladas por los receptores tipo I de BMP. Smad2 y Smad3 son activadas por los receptores tipo I del TGF- β y la activina [Massagué *et al*, 1998]. Las Co-Smads pueden formar complejos heteroméricos con todas las Smads fosforiladas formando parte de la transducción de señales del TGF- β , activinas y BMPs. En mamífero ha sido aislada una sola Co-Smad, llamada Smad 4, mientras que en *Xenopus* se conocen 2 Co-Smad, Smad4 α y Smad4 β [Howell *et al*, 1999]. Las I-Smads previenen la activación de las R y Co-Smads. La Smad6 y la Smad7, han sido identificadas como proteínas Smad inhibitorias.

La Smad6 previene la asociación de Smad1 con Smad4 y la Smad7 se une al receptor I previniendo la fosforilación del carboxilo terminal de las Smad2 y Smad3, inhibiendo la transducción de la señal [Hata A *et al*, 1998; Hayashi *et al*, 1997]. La Smad7 se une a los receptores activados compitiendo por su unión con las R-Smads, la interacción de Smad7 permite la ubiquitinación y degradación de los receptores con la ayuda de las ligasas E3 de ubiquitina, los factores reguladores de la ubiquitinación de Smad conocidos como "Smurfs". El complejo entre Smad7 y los receptores del TGF- β es dirigido hacia estructuras membranales ricas en caveolina e internalizado en vesículas ricas en caveolina que se dirigen hacia el proteosoma para su degradación [Suzuki *et al*, 2002; Di Guglielmo, *et al*, 2003].

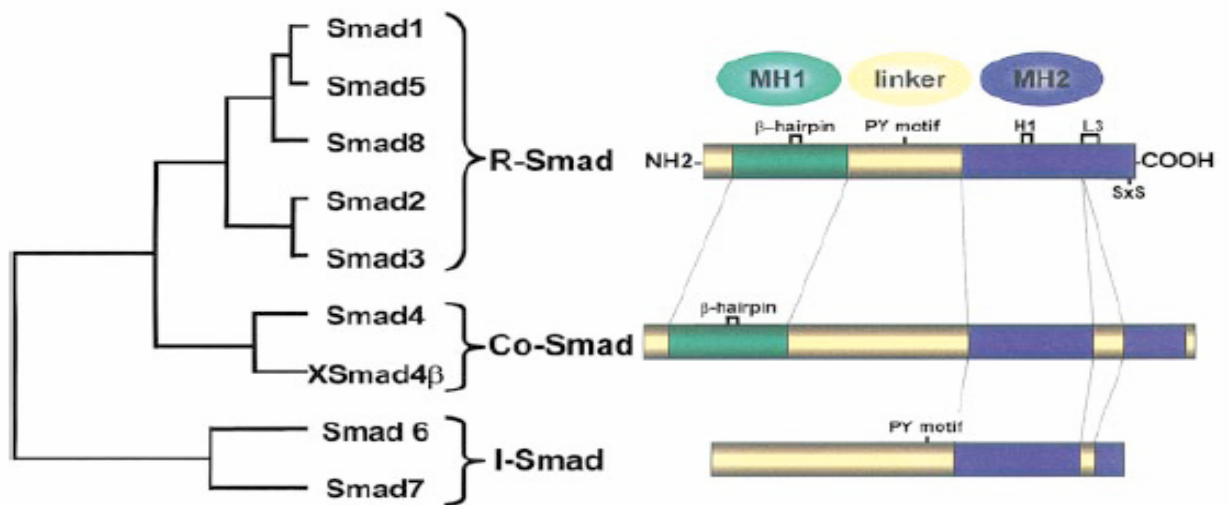


Figura 8. La familia de las proteínas Smad. La familia de las proteínas Smad puede ser dividida en tres subfamilias: Smads reguladas por receptor (R-Smad), Smad común (Co-Smad) y Smads inhibitorias (I-Smad). Todas las Smads se encuentran en humanos excepto las XSmad4 β que se encuentra en *Xenopus*. Los dominios MH1 y MH2 tienen un alto grado de similitud. Los motivos (hairpin, PY, helix1 y loop3) son importantes para la interacción con el DNA. Los residuos de serina en el motivo SxS en el carboxilo terminal de las R-Smads son fosforiladas por el receptor I activado. [Modificado de Itoh S, 2000]

Las R-Smads y las Co-Smads tienen una alta similitud de secuencia en dos dominios llamados “Mad homology” (MH)1 y MH2 (figura 9). [Attisano y Wrana, 2000]. Ambos dominios están separados por una región de unión rica en prolina de longitud variable. El dominio MH1 de las R-Smads y las Co-Smads, excepto el de la Smad2, puede unirse a secuencias específicas de DNA. El dominio MH2 de las R- y Co-Smads es indispensable para la formación del complejo homomérico y heteromérico [Wu R *et al*, 1997]. El “Loop” L3 en el dominio MH2 de las R-Smads determina la especificidad de la interacción con el receptor tipo I [Lo RS *et al*, 1998]. Las I-Smads contienen un dominio conservado MH2 que interactúa con el receptor tipo I, impidiéndole al receptor unirse con las R-Smads [Souchelnytskyi *et al*, 1998]. La región N-terminal de las I-Smads muestra una débil similitud con el dominio MH1 de las R- y Co-Smads y podría tener un papel en la determinación de la especificidad de la señal [Souchelnytskyi *et al*, 1998].

Las proteínas Smad fosforiladas se translocan al núcleo donde actúan como factores transcripcionales ó cofactores. Las Smads pueden unirse directamente a elementos regulatorios en el DNA de los genes blanco ó

pueden unirse a otros factores estimuladores o represores de la transcripción incluyendo proteínas de la familia Fast (FAST1, FAST2) [Liu *et al*, 1999], la proteína activadora 1 (AP-1), coactivadores como la proteína de unión a CREB (CBP) /p300 [Shen, *et al*, 1998], y corepresores como los proto-oncogenes c-Ski y SnoN [Seoane *et al*, 2001], entre otros.

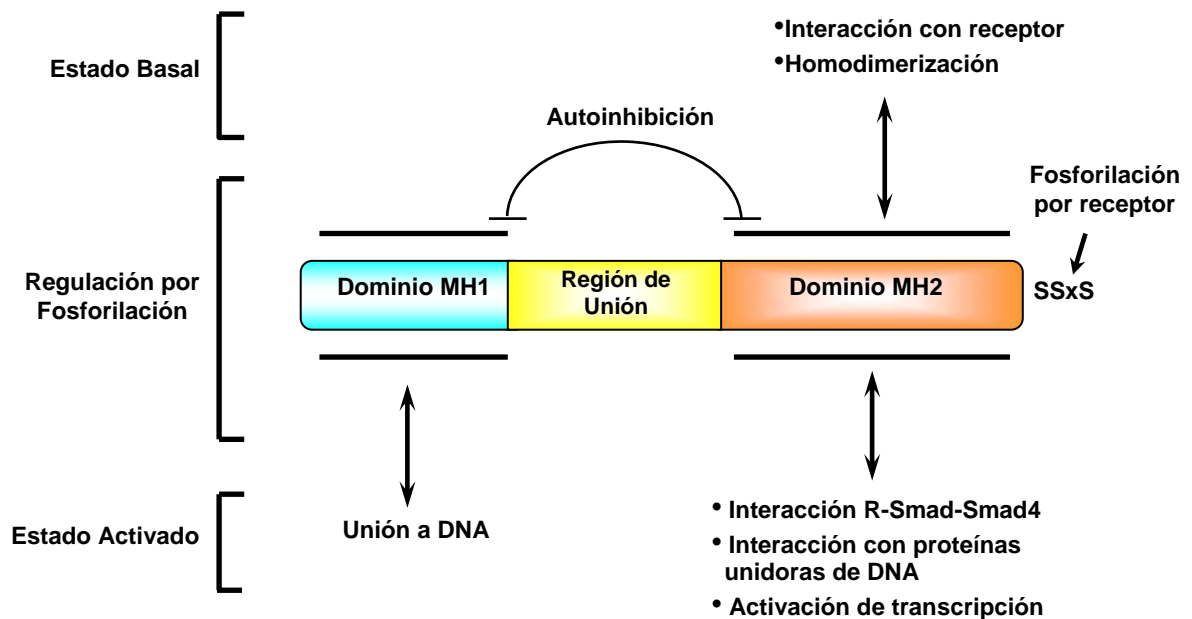


Figura 9. Dominios de las proteínas Smad. En su estado basal las Smads forman homooligómeros y permanecen en estado inactivo. Las R-Smads interactúan con el receptor I activado mediante el dominio MH2. En su estado activo las Smads se asocian con la Smad4 y con proteínas que se unen a DNA mediante el dominio MH2. El dominio MH1 de las Smads participa también en la unión del DNA y el dominio MH2 participa en la activación transcripcional. [Modificado de Massagué 1998].

Señalización independiente de Smads

Además de la transcripción de genes mediada por las proteínas Smad, el TGF- β activa otras vías de señalización (figura 10). Algunas de estas vías regulan la activación de las Smads, pero otras pueden inducir respuestas independientes.

El TGF- β puede activar la vía de señalización de Erk, JNK y la MAPK p38. Estudios en los que se han utilizado células deficientes en Smad4 ó un dominante negativo de Smad, sustentan la posibilidad de que la activación de la vía MAPK es independiente de Smads [Engel *et al*, 1999].

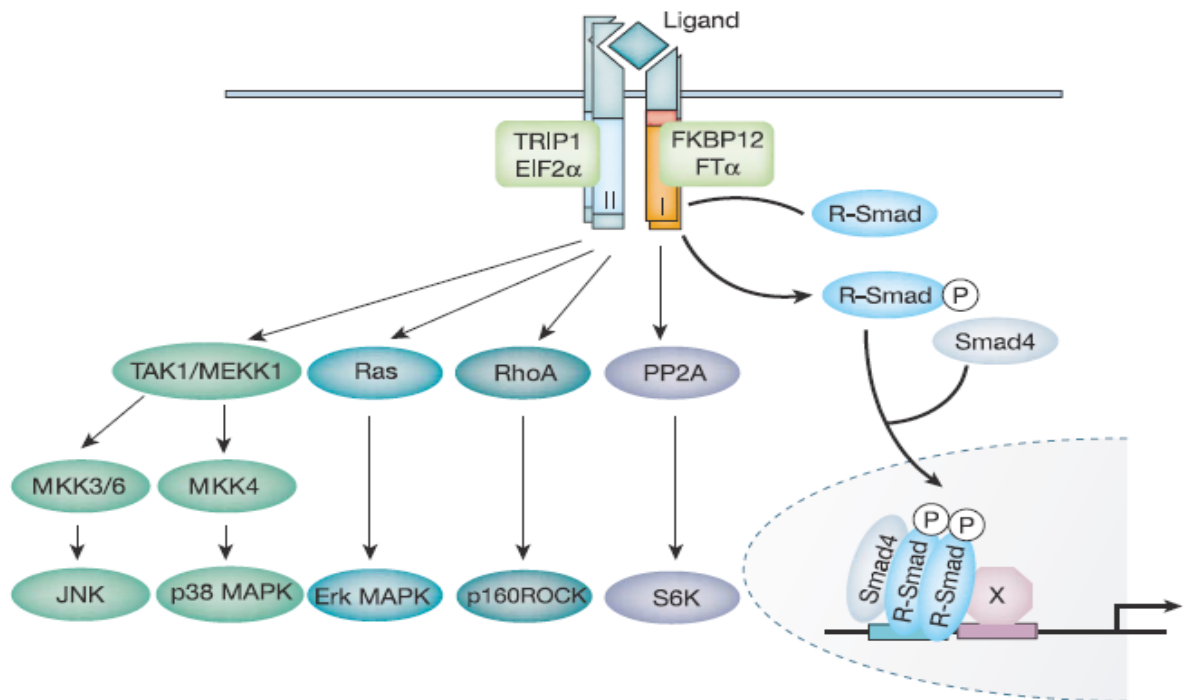


Figura 10. Señalización del TGF- β a través de vías independientes de Smad. Aparte de las proteínas que interactúan con las proteínas Smad y sus receptores, otras proteínas pueden asociarse con los receptores tipo I y tipo II y regular la señalización del TGF- β sin requerir la activación de las Smad. Se muestran las vías mejor caracterizadas tales como MAPK, PP2A, RhoA y TAK1/MEKK1. [Modificado de Derynck y Zhang, 2003]

Además mutantes en el receptor I del TGF- β , que tienen defectos en la activación de Smads, activan la señalización de la MAPK p38 en respuesta al TGF- β [Yu *et al*, 2002]. La administración del compuesto SMP-34, un inhibidor del TGF- β vía MAPK p38, a ratones diabéticos db/db disminuye la progresión de la glomeruloesclerosis y la albuminuria [Sugaru *et al*, 2006]. El mecanismo de la activación de Erk, JNK ó MAPK p38 por TGF- β y sus consecuencias biológicas están poco caracterizadas. Se ha implicado a la proteína Ras en la inducción de la señalización de Erk y MAPK en respuesta al TGF- β en células epiteliales [Yue *et al*, 2000]. La habilidad dual del TGF- β para activar Smads y la señalización de MAPK tiene un papel en la inducción de la transformación epitelio-mesenquimal inducida por TGF- β , la cual depende en parte de la vía Erk y MAPK p38 [Yue *et al*, 2000, Zavadil, 2001].

Dependiendo del tipo celular, el TGF- β puede activar a proteínas G monoméricas como RhoA y B, Rac y Cdc42 [Bhowmick NA, 2001, Edlund *et al*, 2002]. Regulando con su activación la expresión de genes, cambios en la organización del citoesqueleto y la transdiferenciación epitelio mesenquimal. La

activación de Rac1, RhoA y p38 MAPK en respuesta a TGF- β es requerida para el rearreglo de la membrana y la formación de lamelipodios [Edlund *et al*, 2002].

El TGF- β puede señalizar también a través de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la cual consiste de una subunidad catalítica C y una subunidad regulatoria A, con la cuál interactúa una subunidad B regulatoria. Después de la unión del TGF- β , la subunidad B α de PP2A se asocia con el receptor I activado [Griswold-Prenner *et al*, 1998]. Debido a que la subunidad B α inhibe la actividad del dímero A/C, la unión con el receptor I aumenta la actividad de PP2A. Después de la estimulación con TGF- β , la subunidades A, C y B α interactúan con p70^{S6K}, una cinasa con un papel clave en el control traduccional y la progresión del ciclo celular [Petritsch, *et al*, 2000]. El resultado de la desfosforilación y la actividad disminuída de p70^{S6K} se piensa que contribuye al arresto en el crecimiento inducido por TGF- β independiente de las proteínas Smads [Petritsch, *et al*, 2000], sugiriendo un papel de PP2A en respuesta a TGF- β .

Funciones del TGF- β

Control de la proliferación celular

La inhibición de la proliferación celular es el papel central del TGF- β en las células epiteliales, endoteliales, hematopoiéticas, neurales y ciertos tipos mesenquimales. El TGF- β puede inducir genes antiproliferativos en cualquier punto de la división celular, sin embargo esta respuesta es efectiva en la inhibición de la progresión del ciclo celular solo durante la fase G1. En algunos casos esta inhibición es irreversible, en otros es asociado con la muerte celular programa. El TGF- β media dos clases de respuesta génica antiproliferativa en la inhibición del crecimiento: induce a los genes inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y reprime al factor transcripcional mitogénico c-myc [Massagué *et al*, 2000].

TGF- β y Cancer

Aunque el TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento en tejidos epiteliales, puede actuar como supresor ó estimulador de la tumorigénesis. El

TGF- β tiene una función de supresor de tumores que se pierde en muchas líneas celulares que derivan de tumores [Gold, 1999]. Ha sido estimado que casi todos los cánceres pancreáticos y cánceres de colon tienen mutaciones en los componentes de la vía Smad. Algunas de estas mutaciones ocurren en los receptores de TGF- β , Smad4 ó Smad2 [Villanueva *et al*, 1998; Grady *et al*, 1999]. En sistemas experimentales y en el cáncer humano, el TGF- β exagera el fenotipo maligno de las células tumorales. En pacientes con cáncer, se observa una correlación entre niveles de expresión altos de TGF- β y el estado de avance clínico del tumor [Gold, 1999]. El TGF- β derivado del tumor puede contribuir al crecimiento del tumor indirectamente por supresión del sistema inmune ó estimular la producción de factores angiogénicos. Sin embargo, el TGF- β también puede actuar directamente participando en el desarrollo de la tumorigénesis [Gold, 1999].

Efectos en el Sistema Inmune

El TGF- β es un potente modulador del sistema inmune y la respuesta inflamatoria, generalmente funciona como inmunosupresor. El TGF- β puede inhibir la proliferación de los timocitos, los linfocitos T, las células NK y puede suprimir la proliferación de las células B y la secreción de las inmunoglobulinas IgG e IgM [Wei Cui *et al*, 1996]. Además suprime la producción y actividad de algunas citocinas, como la Interleucina 1 (IL-1), IL-2 e IL-3, el interferon γ y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [Wei cui *et al*, 1996]. Dependiendo de la concentración del TGF- β y del grado de diferenciación de las células blanco, al principio de la respuesta inflamatoria el TGF- β puede estimular la migración de los monocitos y la producción de macrófagos actuando como un potente agente quimioatrayente. Después de la iniciación de la respuesta inflamatoria, el TGF- β presenta efectos antiinflamatorios como la inhibición de la adhesión de los neutrófilos y linfocitos T al endotelio [Gamble y Vadas, 1991]. Por otro lado, el TGF- β suprime la síntesis del óxido nítrico bloqueando la inducción del IL-1 β y regulando a la oxido nítrico sintetasa inducible [Perrella, *et al*, 1994].

Modulación de la matriz extracelular y reparación de heridas.

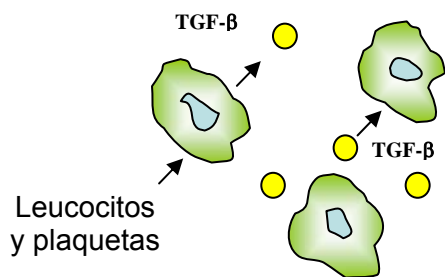
Una de las actividades más importantes del TGF- β es la modulación de la composición y acumulación de la matriz extracelular y su interacción con las células. La matriz extracelular (MEC), no solo es el soporte de la estructura de tejidos sino una estructura dinámica y compleja que puede modificar el fenotipo celular. La matriz extracelular puede afectar la proliferación celular, diferenciación, morfología, adhesión, migración e interacción entre las células [Madri *et al*, 1983]. De esta manera, el TGF- β puede afectar la proliferación celular y diferenciación al modular la matriz extracelular. Y afectar indirectamente los procesos del desarrollo normal y la reparación de heridas.

El TGF- β tiene una habilidad única para estimular la acumulación de proteínas de matriz extracelular por cuatro efectos simultáneos: el TGF- β estimula directamente la síntesis de la mayoría de moléculas de matriz incluyendo fibronectina, colágenas intersticiales, trombospondina, tenascina, laminina y proteoglicanos [Roberts y Sporn, 1990]. Al mismo tiempo, el TGF- β bloquea la degradación de matriz al inhibir la secreción de proteasas e inducir la producción de inhibidores de proteasas, incluyendo al activador de plasminógeno de tejidos, uPA, la colagenasa, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo I (PAI-I), la urocinasa y el inhibidor de metaloproteasas de tejidos (TIMP) [Roberts y Sporn, 1990]. También modula la expresión de los receptores de integrinas, las cuales unen fibronectina, colágena y otras proteínas de matriz a las células, facilitando de esta manera la adhesión matriz-célula y la deposición de matriz [Heino y Massague, 1989]. Además de los efectos descritos, el TGF- β estimula su propia inducción con lo cual amplifica en gran medida sus efectos (figura 11).

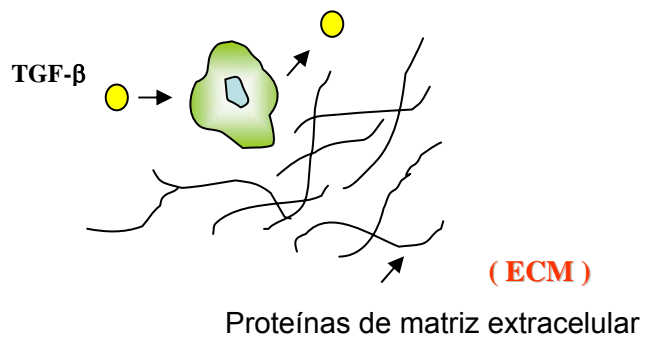
El TGF- β juega un papel muy importante en la reparación de heridas y remodelación del tejido. En respuesta a una herida experimental, el TGF- β se induce en las primeras horas y se vuelve a activar varios días después (Yang *et al*, 1999). El TGF- β mejora la fuerza tensora en la reparación de heridas, efecto que puede ser observado en la administración sistémica ó local del TGF- β [Beck *et al*, 1993]. La aplicación cutánea del TGF- β aplicado a conejos con heridas en la piel resultó en la re-epitelización de la herida en corto tiempo comparado con los conejos controles [Pandit A *et al*, 1999].

El TGF- β aumenta marcadamente la habilidad de los fibroblastos para contraer la colágena y asegurar la reparación provisional de la matriz [Montesano, *et al* 1988]. De manera similar, existe evidencia de que el TGF- β es importante en la reparación de fracturas. Durante la condrogénesis, hay un incremento del TGF- β y se ha observado que el TGF- β tiene un potente efecto quimiotáctico en osteoblastos humanos [Lind M, 1998]. La aplicación directa del TGF- β al sitio de fractura incrementa la formación del hueso y mejora la estabilidad mecánica de la fractura [Rosier *et al*, 1998].

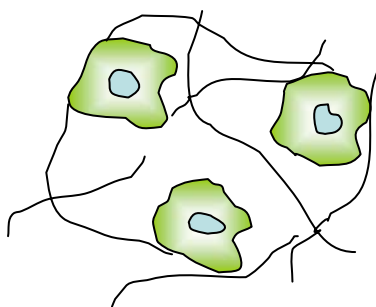
1. Daño



2. Reparación



3. Apagado (Normal)



4. Circulo vicioso (Enfermedad)

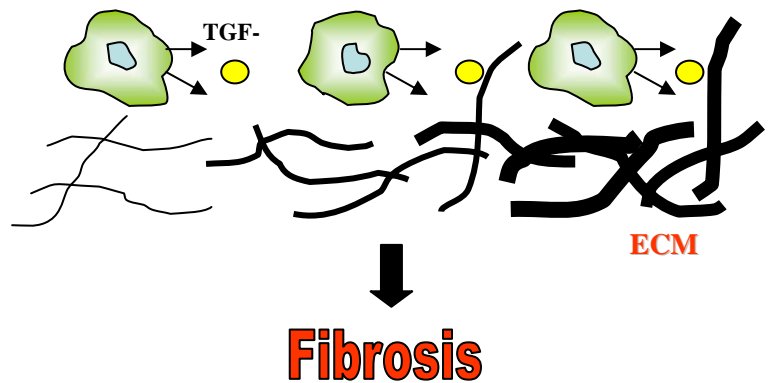


Figura 11. El TGF- β en la reparación de heridas. 1. Cuando el tejido se daña los leucocitos y las plaquetas liberan TGF- β en el tejido dañado. 2. El TGF- β induce a las células sobrevivientes a producir matriz extracelular (ECM) y adicional TGF- β . 3. Cuando la reparación esta terminada la señalización del TGF- β y la producción de

Fibrosis de tejidos

La fibrosis se define como la reparación inapropiada por el tejido conector. Las enfermedades fibróticas que se caracterizan por una cicatrización excesiva debida a la producción excesiva, deposición y contracción de la matriz extracelular. Este proceso ocurre usualmente a lo largo de los años y puede causar la disfunción del órgano o la muerte (Tabla 2) [Varga *et al*, 2005].

La fibrosis puede afectar virtualmente cualquier tejido u órgano. Tradicionalmente, la fibrosis ha sido vista como irreversible, la secuela del estado terminal a una multitud de diversas enfermedades. La cicatrización excesiva seguida a un daño fisiológico, térmico, metabólico, isquémico, infeccioso, inflamatorio ó inmunológico puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo y puede causar varios efectos incluyendo la pérdida de la arquitectura normal, la disminución de las células estromales y el reemplazo de los vasos sanguíneos, y otras estructuras parenquimales y un incremento de la matriz extracelular. La cicatriz esta compuesta por colágenas tipo I, III y IV, proteoglicanos, fibronectina y glicoproteínas, entre otras proteínas de matriz celular. El proceso permite la distorsión progresiva de la arquitectura del tejido con la consecuente disfunción, y finalmente la pérdida del órgano fibrosado [Varga *et al*, 2005].

Tabla 2

Algunas enfermedades en donde la fibrósis es la principal causa de morbilidad ó mortalidad.

Organo-específica

Fibrosis pulmonar (idiopática e inducida por drogas, asma, sarcoidosis)

Fibrosis hepática (cirrosis alcohólica, cirrosis post-hepatitis C, esquistosomiasis, cirrosis biliar)

Fibrosis renal (nefropatía diabética, lupus, glomerulonefritis)

Fibrosis cardiaca (post-infarto al miocardio)

Fibrosis vascular (ateroesclerosis)

Fibrosis dérmica (cicatriz por quemadura, cicatriz hipertrófica, keloide, dermatopatía)

Fibrosis ocular (fibrosis retro-orbital, post-cirugía de cataratas, proliferativa, vitroretinopatía)

Médula ósea (mielofibrósisis idiopática e inducida por drogas)

Sistémica

Esclerósisis sistémica

Rechazo de órganos transplantados

La fibrosis es considerada como el lado oscuro de la reparación de tejidos, se produce debido a que hay una falla en la terminación de la respuesta a la reparación de heridas normal [Gabbiani, 2003]. Después del daño se requiere de la síntesis de nuevo tejido conectivo. Durante este proceso, los fibroblastos mesenquimales se activan proliferando y migrando al sitio de la herida donde sintetizan niveles elevados de proteínas de matriz, incluyendo colágena y fibronectina. Las células mesenquimales activadas durante la reparación de tejidos en el riñón son llamadas células mesangiales y en el hígado células estelares [Bedossa *et al*, 2003; Fogo AB, 1999]. Los fibroblastos presentes en la herida son una forma de fibroblastos especializados llamados miofibroblastos que expresan altos niveles de α -SMA (α -smooth muscle actin) y colágena, en consecuencia facilitan la formación de matriz extracelular, que es indispensable para cerrar la herida [Gabbiani, 2003], sin embargo, en condiciones anormales, los miofibroblastos son muy abundantes dentro de las lesiones fibróticas y aún después de completar la reparación continúan produciendo MEC que da lugar a la deposición excesiva de MEC, observada en las enfermedades fibróticas [Gabbiani, 2003].

Las enfermedades fibroproliferativas independiente de su origen tienen características patogénicas en común. De este modo, a pesar de si la fibrósisis involucra el parénquima pulmonar, el glomerulo renal o el intersticio, el tracto gastrointestinal, el corazón, la dermis ó los tendones, en cada caso se da la secreción y activación de citocinas profibróticas, particularmente el factor de crecimiento y transformación (TGF- β), la expansión y activación de la población celular del mesenquima, y la síntesis de matriz extracelular (Tabla 3) [Varga *et al*, 2005].

Mediadores de la respuesta fibrótica

La reparación normal de heridas es regulada por un grupo muy complejo de interacciones entre una red de citocinas profibroticas y antifibróticas y

proteínas secretadas. Estas proteínas incluyen proteínas profibróticas como el TGF- β y el factor de crecimiento conectivo (CTGF), y proteínas antifibróticas como el factor de crecimiento tumoral (TNF- α) y el interferón- γ (IFN- γ).

El TGF- β ha sido implicado en la patogénesis de la fibrosis de tejidos. En la mayoría de los órganos la desregulación de las acciones del TGF- β promueve la fibrogénesis observándose niveles aumentados de esta citocina. Las células mesenquimales fibróticas sobreexpresan TGF- β en cultivo [Leask *et al*, 2002], además la expresión del TGF- β y sus receptores se encuentra aumentada en fibroblastos humanos provenientes de cicatrices provocadas por quemaduras y queloides [Schmid *et al*, 1998].

En pacientes con escleroderma los niveles del TGF- β se encuentran aumentados [Querfeld *et al*, 1999], en modelos animales la inyección de TGF- β a ratones induce la síntesis y el depósito de MEC [Lin *et al*, 1995] y la administración de anticuerpos anti-TGF- β a ratas con heridas en la piel suprime la síntesis de MEC y la reparación excesiva [Shan *et al*, 1994]. Por último el ratón deficiente en TGF- β 1 entre otras anomalías pierde la capacidad del TGF- β para controlar la reparación de heridas, incluyendo la disminución en la reepitelización y deposición de colágena [Bottinger *et al*, 1997]. El CTGF se descubrió hace una década como una proteína secretada por las células endoteliales humanas [Bradham *et al*, 1991]. En adultos, el CTGF normalmente no es expresado, se expresa únicamente durante el proceso normal de reparación de heridas. Su expresión es inducida por TGF- β y es expresado constitutivamente en lesiones fibróticas tales como escleroderma, del hígado, del riñón, del pulmón y la fibrosis pancreática [Leask, *et al*, 2004].

Tabla 3

Procesos fisiopatológicos comunes a las diferentes enfermedades fibróticas

Susceptibilidad genética

Inflamación

Activación de las células T, polarización Th2, activación de macrófagos, eosinófilos y células quimiotácticas, citocinas y producción de quimiocinas.

Daño vascular, regulación de moléculas de adhesión endotelial.

Activación de células mesenquimales

Incremento en la síntesis de matriz extracelular

Secreción y activación de TGF- β , otras citocinas fibróticas, estimulación y activación autócrina.

Migración

Diferenciación celular

Transdiferenciación de miofibroblastos.

Transdiferenciación epitelio-mesenquimal.

Células madre derivadas de la médula ósea y diferenciación

Formación de cicatrices, persistencia y destrucción de tejidos

Contracción del tejido conectivo

Obliteración de los vasos sanguíneos, vasculogénesis defectuosa e hipoxia de tejidos.

Estabilización de la matriz, entrecruzamiento de la colágena.

Defectos en la remodelación y degradación de la matriz.

El CTGF es un mediador de los efectos fibróticos del TGF- β , promueve la proliferación de fibroblastos, producción de MEC y la formación del tejido nuevo, además promueve la adhesión celular y migración de una amplia variedad de tipos celulares y media algunos de los efectos del TGF- β en la proliferación de fibroblastos, adhesión y producción de matriz [Grotendorst *et al*, 1997]. Por otro lado, el TGF- β induce la expresión de la forma ED-A de la proteína de matriz fibronectina (ED-A FN), una variante de la fibronectina que se genera a partir del procesamiento alternativo del transcrito de la fibronectina, ED-A FN es expresada durante la embriogénesis y vuelve a ser expresada durante la reparación de heridas y fibrosis. La inducción de ED-A FN es requerida para que el TGF- β 1 aumente la expresión de α -SMA y la colágena tipo I [Serrín, *et al* 1998]. Por el contrario, la citocina proinflamatoria TNF- α la cual es expresada por los macrófagos durante la reparación de heridas, es una

citocina antifibrótica supresora de la expresión de genes de matriz y la inducción de colágena y CTGF por TGF- β [Abraham *et al*, 2000]. Ha sido propuesto que TNF- α suprime la señalización del TGF- β al inducir Smad7 ó inhibir la expresión de Smad3 en tipos celulares específicos [Bitzer *et al*, 2000]. El IFN- γ , es una citocina pleitrópica producida por las células T y las NK y juega un papel fundamental en la respuesta inmune innata y la adquirida [Boehm *et al*, 1997]. El IFN- γ suprime la síntesis de matriz extracelular, y a diferencia del TGF- β suprime la síntesis de colágena manteniendo de este modo la homeostasis del tejido conectivo [Boehm *et al*, 1997].

La fibrosis Renal

El riñón controla una variedad de funciones esenciales para nuestra fisiología. Realiza el aclaramiento de los solutos solubles de la sangre, a través de la orina, mantiene la homeostasis hidro y electrolítica. Además, el riñón regula el balance acido-base junto con el pulmón, controla el metabolismo del hueso a través de la regulación de la excreción de calcio y fósforo y la activación del metabolismo de la vitamina D, estimula la función de la médula ósea a través de la producción de eritropoyetina [Guyton y Hall, 2001].

El daño renal es consecuencia de una reducción de las funciones esenciales del riñón, ya sea temporal ó permanentemente. Resultando en una reducción dramática en la función renal excretoria, y la incapacidad para mantener el equilibrio ácido-base, y el control osmótico. Además, pueden ser afectadas funciones hormonales importantes como la formación de eritropoyetina, formación de calcitriol y liberación de renina, produciendo anemia, osteodistrofia renal e hipertensión [Guyton y Hall, 2001]. Todas estas funciones son afectadas cuando se reducen al 40% la función normal del riñón [Robbins *et al*, 1996]. El daño renal puede ser agudo cuando comienza repentinamente y se puede revertir, ó puede ser crónico cuando se da de forma gradual y es irreversible.

El daño en el riñón puede presentarse en diferentes sitios y puede ser el resultado de un rango amplio de procesos patológicos caracterizados por glomeruloesclerosis, fibrosis tubulointersticial, infiltración inflamatoria, pérdida del parénquima que produce atrofia tubular, pérdida de capilares y disminución

de podocitos, los cuales provocan una reducción temporal o permanente en la función excretoria renal expresada como la velocidad de filtración glomerular (GFR). Estos procesos son confinados al riñón o a enfermedades multisistémicas como la diabetes mellitus [Robbins *et al*, 1996].

Los pacientes con daño renal requieren de un tratamiento especial y aquellos con daño renal crónico terminal, requieren de diálisis ó transplante renal para sobrevivir. La sobrevivencia de pacientes con daño renal agudo es mayor del 95% mientras los pacientes con daño renal terminal requieren de diálisis ó transplante renal dependiendo de la edad del paciente, pero la sobrevivencia es del 90% el 1er año y 70% a los 5 años [Winearls, 2001].

En la fibrosis renal, el TGF- β ha sido implicado no solo como mediador de la fibrogénesis, si no también como mediador de la apoptosis de las células epiteliales glomerulares y tubulares y la transdiferenciación epitelio-mesenquimal, eventos celulares importantes en la progresión de las enfermedades renales. La apoptosis en las células epiteliales tubulares provoca atrofia tubular en varios modelos experimentales incluyendo nefropatía obstructiva crónica y diabetes mellitus [Gobe y Axelsen, 1987; Ortiz *et al*, 1997]. En estos estudios, la expresión del TGF- β 1 fue asociada con la apoptosis de las células tubulares. La inhibición del TGF- β ya sea por bloqueo con Angiotensina II ó utilizando anticuerpos anti-TGF- β reduce la apoptosis de las células epiteliales tubulares reduciendo la atrofia tubular [kelly *et al*, 2002; Miyajima, *et al*, 2000]. Estudios en el ratón transgénico para TGF- β 1, un modelo que desarrolla glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial [Sanderson *et al*, 1995], mostraron que la apoptosis de las células tubulares precede a las manifestaciones de la atrofia tubular, dilatación tubular e inflamación perivascular sugiriendo que las células epiteliales tubulares pueden transdiferenciarse para adquirir el fenotipo de miofibroblastos asociado a la fibrosis intersticial [Bottinger y Bitzer, 2002].

La glomeruloesclerosis en modelos animales y humanos se caracteriza por la disminución de podocitos ocasionada por el aumento en el estrés mecánico ó la pérdida de adhesión de las células [kriz *et al*, 1998]. Se ha propuesto que el TGF- β en sinergismo con la Smad7 inducen la apoptosis de los podocitos *in vitro*, la apoptosis máxima de los podocitos coincide con la

expresión del TGF- β y Smad7 y con el comienzo de la albuminuria, sugiriendo que la apoptosis de los podocitos precede a la expansión mesangial [Schiffer *et al*, 2001]. La pérdida de la microvasculatura glomerular y peritubular es otra de las características de la enfermedad renal progresiva. La pérdida de los capilares glomerulares es asociada con un incremento en el apoptosis de las células endoteliales glomerulares [Kang *et al*, 2002]. El TGF- β y la trombospondina 1 han sido implicados en la inducción de la apoptosis de las células endoteliales glomerulares [Guo *et al*, 1997; Choi y Ballermann, 1995].

La transdiferenciación epitelio a mesenquima (EMT) es un proceso en el cual las células tubulares renales pierden su fenotipo epitelial y adquieren características nuevas del mesénquima. La mayoría de los tubulos renales en el riñón adulto excepto el tubo colector, derivan del mesénquima metanéfrico a través de la transdiferenciación mesénquima a epitelio. La EMT es el proceso inverso, un proceso de embriogénesis reversa [Horster *et al*, 1999]. Una gran proporción de los fibroblastos intersticiales son originados a partir de las células epiteliales tubulares vía EMT en el riñón fibrótico. La EMT tubular es un proceso altamente regulado que consiste de cuatro pasos: 1) La pérdida de la adhesión de las células epiteliales, 2) la expresión de nuevo de la α -actina de músculo liso y la reorganización de actina, 3) la disrupción de las membranas tubulares basales y 4) el aumento en la migración e invasión celular [Youhua, 2004]. Uno de los factores que regulan la EMT es el TGF- β que inicia y regula el proceso [Fan *et al*, 1999], mientras que el factor de crecimiento hepático y la proteína morfogenética del hueso 7 inhiben la EMT *in vitro* e *in vivo* (figura 12) [Youhua, 2004].

La nefropatía diabética

La nefropatía diabética es una de las complicaciones crónicas más frecuentes en pacientes con diabetes mellitus tipo I y tipo II [Roggenenti y remuzzi, 1997]. Los pacientes con esta enfermedad, presentan un grupo característico de alteraciones estructurales y funcionales del riñón. Las anomalías estructurales incluyen hipertrofia en el riñón, un aumento en el grosor de las membranas basales de los glomérulos, acumulación de los componentes de matriz en el glomérulo (glomeruloesclerosis difusa y nodular),

atrofia tubular, fibrosis intersticial y pérdida de podocitos (células epiteliales glomerulares esenciales para la estructura y función del glomérulo las cuales rodean a los capilares contribuyendo a la barrera de filtración y la estabilización de las estructural. Las alteraciones funcionales incluyen un incremento de la filtración glomerular en las etapas tempranas de la enfermedad que disminuye significativamente con el progreso de la enfermedad, hipertensión glomerular y sistémica, micro y macro proteinuria que eventualmente llevan a la pérdida de la función renal [Ueno *et al*, 1997]. La nefropatía diabética esta influenciada por el fondo genético ya que únicamente entre el 25 y 40% de los pacientes con diabetes tipo I y tipo II desarrollan nefropatía diabética [Friedman *et al*, 1993]. El fondo étnico genético juega un papel importante debido a que algunas razas son más susceptibles a la nefropatía diabética que otras, por ejemplo la enfermedad es más frecuente en algunos grupos étnicos como los Indios Pima y en negros más que en blancos [Friedman *et al*, 1993].

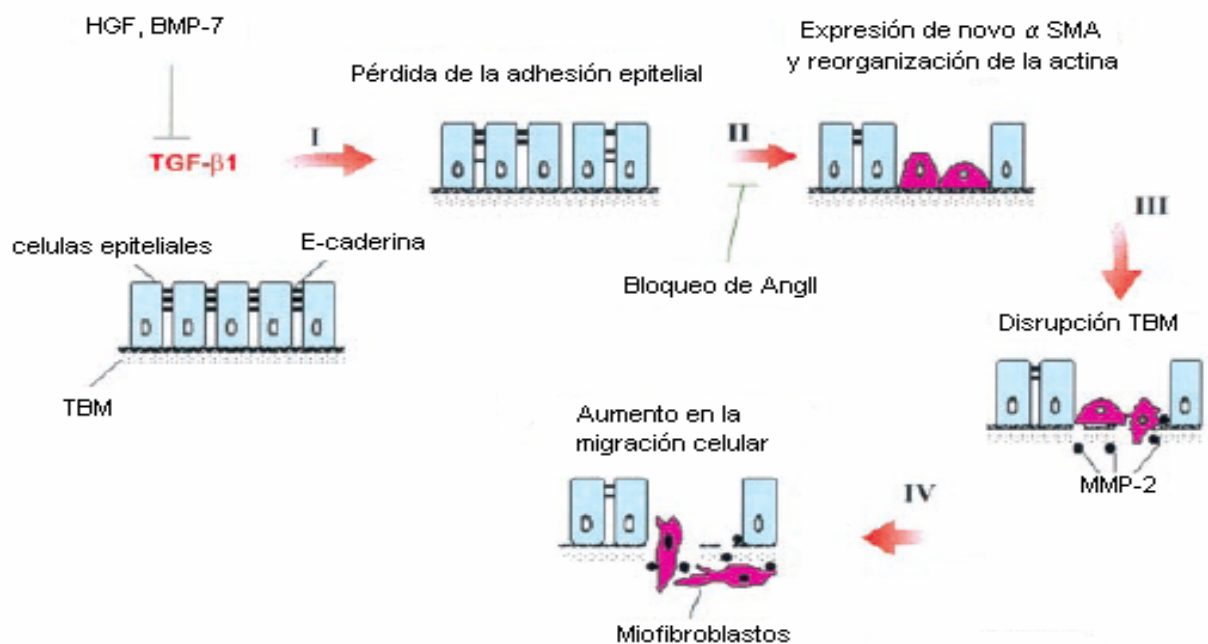


Figura 12. El TGF- β media la EMT. La figura muestra los eventos que se llevan a cabo durante la TEM (I-IV). El TGF- β induce a las células epiteliales tubulares a pasar por los cuatro pasos de la TEM. La angiotensina (AngII) promueve la EMT potenciando la expresión de α -SMA iniciada por TGF- β . HGF y BMP-7 antagonizan al TGF- β y pueden inhibir la iniciación de la EMT. El bloqueo de la angiotensina II con losartan bloquea su actividad para promover la EMT y atenúa la fibrosis renal. TBM (Membrana tubular basal). Modificado de Youhua 2004.

Estudios clinicopatológicos de la nefropatía diabética han establecido que la extensa acumulación de proteínas en el glomérulo y el intersticio, correlaciona fuertemente con el grado de insuficiencia renal. Por ello los factores responsables de la deposición y acumulación de proteínas en matriz extracelular en el riñón han adquirido considerable interés. La hiperglicemia, las proteínas glicosiladas, polioles intracelulares, hormonas vasoactivas, hipertensión glomerular y sistémica, proteinuria, factores de crecimiento y citocinas han sido implicadas en la nefropatía diabética [Wolf y Ziyadeh, 1999]. A continuación se describirá brevemente la participación de cada uno de estos factores.

La hiperglicemia es un factor de riesgo muy importante en el desarrollo de la nefropatía diabética. Las células del riñón son estimuladas por la hiperglicemia para producir mediadores humorales, citocinas y factores de crecimiento que son responsables de las alteraciones estructurales y funcionales observadas en la nefropatía diabética. En las células renales, el receptor de superficie GLUT-1 regula la entrada de glucosa en las células renales [Heilig *et al*, 1997]. En estudios *in vitro*, el TGF- β endógeno, producido por las células mesangiales en cultivo en presencia de una concentración alta de glucosa (23 a 30 nM), induce el transporte de glucosa al inducir la sobreexpresión del ARNm y la proteína GLUT-1, de este modo acelera las anomalías metabólicas inducidas por la glucosa en las células mesangiales, el TGF- β 1 modula la expresión de GLUT-1 en una manera dosis dependiente [Inoki *et al*, 1999].

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- β), ha sido involucrado en las alteraciones estructurales a nivel glomerular. Cuando las células mesangiales se encuentran en presencia de una concentración alta de glucosa se induce un incremento en la expresión del gene PDGF- β en las primeras 6 horas declinando su expresión a las 24 horas, por el contrario la expresión del TGF- β es detectada después de las 24 horas y 48 horas después de la incubación de las células. Por lo tanto, una concentración alta de glucosa, induce la activación del gene PDGF- β que a su vez induce un incremento en la expresión del TGF- β modulando de este modo la proliferación de las células mesangiales y la producción de matriz mesangial [Di Paolo, *et al*, 1996].

Otro factor, que juega un papel importante en las alteraciones glomerulares en la esclerosis diabética, es el factor de crecimiento del tejido conectivo CTGF, debido a que induce el desensamble del citoesqueleto de actina en las células mesangiales, la sobreproducción de fibronectina, colágena tipo I y IV y la hipertrofia de las células mesangiales. El CTGF, ha sido considerado como un blanco terapéutico en la nefropatía diabética [Wahab *et al*, 2001]. Por otro lado, la angiotensina II es una de las hormonas que estimula a las células del riñón a producir TGF- β . La angiotensina II es generada en hipertensión, un desorden que se presenta frecuentemente en los pacientes diabéticos y que acelera la progresión de la nefropatía diabética [Wolf G y Ziyadeh, 1997]. En estudios *in vitro* ha sido demostrado que la angiotensina II incrementa la acumulación de los componentes de la matriz extracelular en las células mesangiales al estimular la expresión del TGF- β [Gesualdo L *et al*, 1999].

La hiperglicemia induce la activación anormal de la proteína cinasa C (PKC), la cual esta involucrada en el desarrollo de la nefropatía diabética. La PKC estimula la sobreexpresión del TGF- β 1, fibronectina y colágena tipo IV en los riñones de las ratas con nefropatía diabética [Koya, *et al*, 1997]. Cuando las ratas diabéticas fueron tratadas con un inhibidor de la PKC (LY 333531), disminuyó la sobreexpresión del TGF- β y de las proteínas de matriz extracelular, previniendo la hiperfiltración y la albuminuria [Ishii *et al*, 1996].

La hiperglicemia es la responsable de la presencia de niveles altos de productos terminales de glicosilación avanzada (AGE) en pacientes con diabetes. Estos productos se forman por la reacción no enzimática entre la glucosa y las proteínas, la reacción comienza cuando los grupos carbonilo del azúcar reaccionan con los grupos amino de las proteínas formando bases de Schiff que al rearrreglarse y volverse más estables dan lugar a los productos de Amadori [DeGroot, 2004]. Estos productos normalmente son reciclados dentro del cuerpo durante meses o años, sin embargo, si los productos de Amadori son deshidratados, se pueden rearrreglar formando los AGE que se unen a las células y tejidos ocasionando progresivamente la disfunción del órgano [DeGroot, 2004]. Los AGE están involucrados en los cambios estructurales de las nefropatías progresivas como son glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y

atrofia tubular. Sus efectos son más prominentes en la nefropatía diabética pero también contribuyen a la patofisiología renal en otras enfermedades renales no diabéticas [Jorgen *et al*, 2004]. Los AGE estimulan a las células glomerulares a producir TGF- β 1, el cual contribuye a la esclerosis glomerular y al daño tubulointersticial al estimular la sobreproducción de los componentes de matriz extracelular [Vlassara y Palace 2002]. Al administrar un inhibidor de los productos de glicosilación terminal (ALT 711) a las ratas diabéticas, se reduce la glomeruloesclerosis, la fibrosis tubulointersticial y la albuminuria [Forbes *et al*, 2003].

La hipertensión arterial glomerular y sistémica, y la hiperfiltración representan las disfunciones hemodinámicas en los pacientes diabéticos. La aplicación de un estrés mecánico para simular el daño hemodinámico en las células mesangiales, induce *in vitro* la sobreexpresión de GLUT-1 y la producción de TGF- β 1. Si estas células son tratadas con un anticuerpo anti-TGF- β 1 se reduce la expresión de GLUT-1 y el transporte intracelular de la glucosa [Gnudi, *et al*, 2003]. El estrés mecánico es también responsable de un aumento en la permeabilidad del glomérulo que provoca la presencia anormal de proteínas en la orina de pacientes con diabetes. Además, induce un aumento en la expresión del factor de permeabilidad vascular (VPF) que promueve este efecto [Gruden *et al*, 1997]. La utilización de inhibidores de la PKC inhibe la expresión del VPF en respuesta al estrés mecánico y la producción de TGF- β y fibronectina en células mesangiales humanas [Gruden *et al*, 1997].

El TGF- β y la nefropatía diabética

La función del TGF- β como mediador de la hipertrofia y cambios escleróticos en el riñón diabético ha sido estudiado extensamente. Casi todos los mediadores moleculares y vías de señalización involucradas en el daño del riñón diabético, convergen en la estimulación del TGF- β como intermediario [Reeves y andreoli, 2000]. Las células mesangiales y epiteliales del glomérulo y del tubulo proximal, en respuesta al TGF- β en presencia de altas concentraciones de glucosa incrementan la síntesis de las proteínas de matriz extracelular incluyendo los proteoglicanos, fibronectina, colágena IV y los

niveles del ARNm del TGF- β 1 se encuentran aumentados [Ziyadeh *et al*, 1992; Ziyadeh *et al*, 1990]. Modelos animales tanto de diabetes tipo I como de diabetes tipo II, han implicado al TGF- β como mediador de la enfermedad del riñón diabético. En un estudio utilizando ratas con diabetes provocada con estreptozotocina, se observó un aumento en el ARNm del TGF- β 1 en el glomérulo a las 24 horas después del inicio de la hiperglicemia, y este aumento fue sostenido durante las dos semanas que duró el estudio [Shankland y Scholey, 1994]. Si estos animales son tratados con insulina para normalizar sus niveles de glucosa en la sangre, la síntesis del TGF- β disminuye en el glomérulo [Shankland y Scholey, 1994]. Los niveles del ARNm del TGF- β 1 se han visto incrementados en el curso temprano de la hipertrofia renal asociada a diabetes en el ratón NOD y en la rata diabética BB, ambos modelos de diabetes mellitus tipo I [Sharma y Ziyadeh, 1994]. En el ratón NOD la sobreexpresión del ARNm del TGF- β 1 fue asociada con la estimulación de la expresión de los genes de las proteínas de matriz extracelular tenascina y laminina en el glomérulo [Yang *et al*, 1995]. En ratas con diabetes inducida por estreptozotocina se observó un aumento en la expresión del TGF- β 1 y de la colágena tipo IV en el tubulointersticio renal, que fue revertida al administrarles un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensinógeno (ACE) [Gilbert *et al*, 1998].

En cuanto a la participación de las diferentes isoformas del TGF- β en el riñón diabético, los estudios se enfocan principalmente en el TGF- β 1 considerado por lo general la isoforma predominante en la fibrosis renal, sin embargo el papel del TGF- β 2 y TGF- β 3 ha sido poco estudiado. En un estudio utilizando células mesangiales de rata, fibroblastos renales y células epiteliales tubulares en cultivo, se compararon las acciones de las isoformas del TGF- β en la producción y degradación de proteínas de matriz extracelular, la producción endógena de cada isoforma y el efecto de la combinación de isoformas y la inhibición de éstas con anticuerpos específicos. Los resultados mostraron que las tres isoformas tienen efectos fibrogénicos en las células renales incrementando la síntesis de proteínas de matriz extracelular. La combinación de las isoformas tiene efectos aditivos. Los anticuerpos específicos de las isoformas bloquean el efecto del TGF- β y los efectos de las isoformas TGF- β 2 y

TGF- β 3 pueden ser mediados parcialmente por el TGF- β 1 [Ling Yu, *et al* 2003]. En otro estudio, utilizando dos modelos animales, ratas diabéticas por estreptozotocina y la rata BB, se caracterizó la expresión de las isoformas del TGF- β en el riñón en un estudio de diabetes a corto y largo plazo utilizando técnicas de inmunohistoquímica y western blot. En ambos modelos, se encontró que la expresión de las tres isoformas aumenta en el riñón de los animales diabéticos, principalmente durante la fase aguda cuando la fibrogénesis aumenta. Las tres isoformas fueron localizadas en el citoplasma y el núcleo de las células glomerulares. Los niveles del TGF- β 1 se incrementan en la fase aguda, disminuyen ligeramente a los 14 días y regresan al nivel de los controles entre los 30 y 180 días en la fase crónica de la enfermedad. El TGF- β 2 se incrementa en la fase aguda entre los 3 y 14 días de la enfermedad y disminuye a niveles controles a los 90 días [Hill *et al*, 2000].

El incremento en la expresión del TGF- β también es una característica de humanos diabéticos. En pacientes diabéticos se ha descrito un incremento del TGF- β en el glomérulo utilizando la técnica de inmunohistoquímica [Yamamoto *et al*, 1993]. Esta observación fue confirmada por un estudio en riñones de pacientes con nefropatía diabética donde se encontró un incremento en los niveles de las isoformas del TGF- β en el glomérulo y en el tubulointersticio [Yamamoto *et al*, 1993]. En otro estudio, los niveles de ARNm del TGF- β 1 se encontraron elevados en el glomérulo de los pacientes diabéticos con nefropatía diabética correlacionando con el control metabólico de la enfermedad [Sharma *et al*, 1997].

Estrategias terapéuticas anti-TGF- β en la nefropatía diabética

Varias metodologías han sido utilizadas para prevenir el daño renal a través de la inhibición del TGF- β . Estos incluyen anticuerpos anti-TGF- β , inhibidores naturales, oligonucleótidos antisentido y moléculas regulatorias como Smad 7 [Vilchis-landeros *et al*, 2003]. En esta sección me referiré especialmente a las estrategias terapéuticas anti-TGF- β que han sido utilizadas en el tratamiento de la nefropatía diabética.

Anticuerpos neutralizantes

En base a los estudios que demuestran que la glucosa estimula la producción del TGF- β en el riñón y el TGF- β es el mediador de los cambios estructurales y funcionales observados en el riñón diabético. Se han utilizado anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β para inhibir sus efectos. En estudios *in vitro* el incremento en la síntesis del TGF- β 1 y de la colágena IV en células mesangiales en presencia de glucosa, es abatido al utilizar anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β [Ziyadeh, *et al*, 1994]. Por otro lado, en estudios realizados con ratones con diabetes inducida con estreptozotocina, la utilización de un anticuerpo anti-TGF- β disminuye los niveles de ARNm del TGF- β 1 y del receptor II del TGF- β en el riñón, reduciendo la hipertrofia glomerular y la expresión de los genes de colágena IV y fibronectina [Sharma *et al*, 1996]. El tratamiento a corto plazo de ratones diabéticos por estreptozotocina con un anticuerpo monoclonal contra las tres isoformas del TGF- β previno la hipertrofia glomerular y el aumento en el nivel de los mensajeros de TGF- β 1, colágena IV y fibronectina [Sharma *et al*, 1996]. De igual manera, el tratamiento de ratones diabéticos db/db, un modelo espontáneo de diabetes tipo II, con un anticuerpo monoclonal contra las tres isoformas del TGF- β previno el incremento en el ARNm del TGF- β 1 y genes de matriz regulados por TGF- β , y redujo la expansión de matriz mesangial, sin embargo no tuvo efectos sobre la proteinuria [Ziyadeh *et al*, 2000].

Inhibición de la ACE

Los inhibidores de la ACE ó inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina, son un grupo de fármacos que son usados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, hipertensión y prevención de la diabetes mellitus. Trabajan modulando el sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Al inhibir a la ACE bloquean significativamente la conversión de angiotensina I a angiotensina II. Cuando los niveles de la angiotensina II disminuyen, se produce una reducción en la vasoconstricción y la secreción de la aldosterona. Los inhibidores de los ACE incluyen al Captopril, Enapril, ramipril, entre otros [Lahera, *et al*, 2006]. Por otro lado, en la diabetes además

del efecto directo de la hiperglicemia en la activación del TGF- β renal, el sistema renina-angiotensina también estimula al TGF- β en el riñón. En estudios *in vitro*, la exposición de células mesangiales a la Angiotensina II estimula la síntesis del TGF- β y proteínas de matriz extracelular [Kagami *et al*, 1994]. En células LLC-PK₁ crecidas en presencia de altas concentraciones de glucosa, una línea celular análoga a las células del túbulo proximal, la adición de captopril, un inhibidor de la ACE, disminuye el incremento del ARNm del TGF- β 1 y de sus receptores tipo I y tipo II, así como la síntesis de proteínas de matriz en una manera dependiente de la dosis [Guh *et al*, 1996]. En estudios *in vivo*, utilizando ratas con diabetes inducida con estreptozotocina se observó el efecto del ramipril, un inhibidor de la ACE. El tratamiento con ramipril previno el incremento en la expresión del TGF- β 1 y la acumulación de proteínas de matriz extracelular a nivel tubular y glomerular [Gilbert *et al*, 1998]. El desarrollo de agentes farmacológicos que inhiben directamente al receptor de la angiotensina ARB de “angiotensin receptor blocker” es una alternativa para regular el sistema renina-angiotensina. El tratamiento de pacientes diabéticos con una combinación de un inhibidor de la ACE y un inhibidor del receptor II de angiotensina II, disminuyó la excreción de albúmina urinaria y la elevada presión sanguínea mostrando efectos benéficos y sinérgicos en el tratamiento de la nefropatía diabética [Jacobsen *et al*, 2004].

Inhibición de la Proteína cinasa C (PKC- β)

La proteína cinasa C (PKC), se expresa de manera ubicua y esta involucrada en la transducción de señales asociada a la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Se conocen once isoenzimas relacionadas a la PKC clasificadas como (α , β 1, β 2, γ , δ , ϵ , η , θ , μ , ζ , λ). Las isoenzimas difieren en su estructura, propiedades bioquímicas, distribución en tejidos, localización celular y especificidad de sustrato. Entre los genes que han sido implicados en la nefropatía diabética se encuentra el gene PKC- β 1 que codifica para las isoformas β 1 y β 2 [Koya y King, 1998].

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que una concentración alta en glucosa induce la activación de la proteína cinasa C en las células glomerulares seguida por un incremento en la actividad del TGF- β . La adición de un

antioxidante (α -tocoferol) a células mesangiales que han sido crecidas en concentraciones elevadas de glucosa bloquea el incremento en la PKC y en los niveles de TGF- β y proteínas de matriz [Studer *et al*, 1997]. La administración de un inhibidor específico de la isoforma PKC β (LY333531) en un modelo *in vivo* de ratas diabéticas por estreptozotocina durante tres meses, disminuye el incremento en el ARNm del TGF- β 1 y la acumulación de matriz en el glomérulo, sugiriendo que la PKC β inducida por la hiperglicemia medía la sobreproducción del TGF- β y las proteínas de matriz en el riñón diabético [Koya *et al*, 1997]. La administración a largo termino de un inhibidor de la PKC β en el ratón diabético db/db, reduce la excreción de albúmina urinaria y la expansión de la matriz mesangial a través de la atenuación de la expresión del TGF- β y proteínas de matriz como colágena IV y fibronectina [Koya *et al*, 2000].

Inhibición de los AGE

La mayoría de los agentes inhibidores de los AGE han sido probados en modelos diabéticos debido a que la acumulación de los AGE en diabetes es más rápida y esta mejor caracterizada su patología. Las estrategias empleadas se basan en inhibir la formación de los AGE, su remoción ó interferir con los efectos celulares de los AGE. Un método que interfiere con la formación de los AGE es la deglicosilación enzimática de las proteínas. La fructuosa lisina oxidasa y la fructuosa lisina-3-fosfocinasa catalizan la remoción de azúcares de las proteínas previniendo la formación de los AGE [Wu y Monnier, 2003]. La piridoxamina es un compuesto que inhibe la formación de los AGE *in vitro* y sus efectos han sido probados *in vivo* en un modelo de ratas obesas zucker donde previno la patología renal y vascular asociada a la diabetes [Alderson *et al*, 2003]. Los compuestos que destruyen químicamente a las estructuras de los AGE, tales como N-phenacylthiazolium, N-phenacyl-4,5-dimethylthiazolium y ALT-711 han sido propuestos como agentes terapéuticos para revertir los efectos causados por la acumulación de los AGE [Vasan *et al*, 1996]. En estudios *in vitro* utilizando células mesangiales de rata se observó que los AGE incrementan la generación de especies reactivas de oxígeno y estimulan la producción de Angiotensina II en una manera dosis dependiente que fue prevenida totalmente por la adición del antioxidante N-acetylcysteine (NAC).

Los AGE también inducen la sobreproducción del TGF- β , hipertrofia de las células mesangiales y la síntesis de fibronectina, efectos que son bloqueados al utilizar candersan un antagonista del receptor tipo 1 de la angiotensina [Fukami *et al*, 2004]. En estudios *in vivo*, el uso de un anticuerpo monoclonal específico (A717) contra la albúmina glicosilada en ratones diabéticos db/db previene la albuminuria y el aumento en las proteínas de matriz [Cohen *et al*, 1995].

El betaglicano soluble un agente potencial en el tratamiento de la nefropatía diabética

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el betaglicano soluble recombinante producido en células de insecto se une al TGF- β con alta afinidad y especificidad de isoforma, neutralizando sus efectos con una potencia superior a la de otros agentes anti-TGF- β utilizados [López-Casillas *et al* 1994; Vilchis-Landeros *et al*, 2001].

El SBG ha sido utilizado como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer, donde antagoniza al TGF- β bloqueando sus efectos en las células tumorales (Bandyopadhyay *et al*, 1999, Bandyopadhyay *et al*, 2002]. En estudios *in vivo*, la expresión ectópica del SBG suprime las propiedades malignas en las células de carcinoma humano al antagonizar la actividad tumoral del TGF- β que promueve el desarrollo del tumor [Bandyopadhyay *et al*, 1999]. La inyección del SBG por vía intraperitoneal ó peritumoral en ratones desnudos con tumores desarrollados a partir del carcinoma de seno humano MDA-MB-231, disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento del tumor, la metástasis espontánea y la vascularización del tumor [Bandyopadhyay *et al*, 2002].

El SBG en combinación con un inhibidor de las prostaglandinas (PG) ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de la fibrosis pulmonar murina [Hernández-Pando *et al*, 2006]. EL TGF- β y las prostaglandinas regulan la respuesta inmune celular en la progresión de la fibrosis pulmonar [Hernández-Pando *et al*, 1997; Rangel-Moreno *et al*, 2002]. La administración de SBG y ácido niflúmico, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, durante la fase crónica de la tuberculosis experimental murina disminuyó la inflamación

pulmonar, la fibrosis y la carga bacilar acelerando la eliminación de los bacilos de el pulmón.

En un modelo de glomerulonefritis experimental, ratas con glomerulonefritis inducida por la inyección de suero anti-timocito [Sharma y Ziyadeh, 1994]. La administración diaria de SBG a las ratas enfermas por vía intraperitoneal resultó en la disminución de la expansión mesangial, los niveles de ARNm del TGF- β 1 y la acumulación y expresión de la fibronectina, colágena I y IV en el glomérulo [Vilchis-Landeros *et al*, en preparación].

La leptina y la enfermedad renal

La leptina es una hormona peptídica derivada del tejido adiposo que actúa como el principal regulador de la ingesta de alimentos y la homeostasis de la energía [Ahima y Flier, 2000]. La leptina es liberada a la sangre en proporción a la cantidad de grasa corporal y ejerce un efecto inhibitorio en la ingesta de alimentos mientras incrementa el gasto energético. La leptina fue identificada a través de la clonación del gene de la obesidad (*ob*), el cual se encuentra mutado en el ratón obeso *ob/ob* [Zhang *et al*, 1994]. El gene del receptor de la leptina fue identificado en el locus del cromosoma 4 del ratón *db* [Tartaglia *et al* 1995]. Existen seis isoformas (Ob-Ra a Ob-RF) del receptor de la leptina, las cuales resultan de un procesamiento alternativo del ARNm (figura 13). Los receptores muestran una región amino terminal idéntica, la cual une a la leptina, pero difieren en su región carboxilo terminal. Cinco de estas formas contienen dominios transmembranales. La forma larga del receptor (Ob-Rb) se encuentra principalmente en el hipotálamo y ha sido asociado con la transducción de la señal. La forma corta del receptor (Ob-Ra), se expresa en tejidos periféricos y en el riñón. La forma Ob-Re que carece del dominio transmembranal y del intracelular, se encuentra en circulación pero sus efectos son desconocidos [Wolf G, 2002]. La leptina se une al receptor largo Ob-Rb en el hipotálamo, induce su dimerización y la activación del transductor de la señal la cinasa janus (JAK) y la activación de su vía de transcripción (STAT pathway) resultando en la fosforilación de STAT, la STAT fosforilada se transloca dentro del núcleo y se une al DNA donde activa la transcripción de genes regulados por la leptina (figura 13) [Baumann *et al*, 1996]. Otras vías que también ha sido implicadas en la respuesta a la leptina son la vía de las proteínas cinasas

activas por mitógenos (MAPK) y la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3K) que son importantes para modular los efectos de la leptina en respuesta a la insulina [Berti *et al*, 1997].

La leptina ejerce varios efectos en el tejido periférico incluyendo la modificación de las acciones de la insulina, inducción de la angiogénesis y la modulación del sistema inmune. Como un péptido pequeño, la leptina es eliminada principalmente por el riñón y en pacientes con daño renal crónico y aquellos que requieren de diálisis las concentraciones de la leptina en suero se encuentran aumentadas [Sharma *et al*, 1997].

La leptina tiene efectos directos en la patofisiología renal, estimula la proliferación celular, la síntesis del TGF- β 1 y la producción de colágena en las células endoteliales glomerulares [Wolf *et al*, 1999]. En las células mesangiales, la leptina estimula la síntesis del receptor II del TGF- β , pero no la síntesis del TGF- β , sin embargo estimula el transporte de glucosa y la producción de la colágena tipo I. Estos datos sugieren que la leptina promueve una interacción paracrina entre las células endoteliales y mesangiales, en la cual las células endoteliales glomerulares secretan TGF- β , al cual las células mesangiales sensibilizadas pueden responder [Han *et al*, 2001]. Ambos tipos celulares en respuesta a la leptina incrementan la expresión de proteínas de matriz [Han *et al*, 2001]. La inyección de leptina a ratas normales por más de tres semanas, acelera el desarrollo de la glomeruloesclerosis focal y la proteinuria [Wolf *et al*, 1999]. Otros efectos adicionales directos o indirectos de la leptina en el riñón, incluyen natriuresis, un incremento en la actividad del sistema nervioso y la estimulación de las especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere que el riñón no solo es un sitio donde se metaboliza la leptina sino también un órgano blanco para las acciones de la leptina [Wolf, 2000].

El ratón diabético db/db

Los ratones diabéticos db/db tienen una mutación recesiva autosomal del gene que codifica para el receptor de la leptina (figura 14) [Chen *et*, 1996]. El receptor largo de la leptina Ob-Rb en estos ratones es anormal ya que contiene una mutación puntual G por T que produce un codon de terminación en la región donde el receptor largo y el receptor corto divergen conduciendo a

la síntesis de un receptor truncado que reemplaza a la isoforma Ob-Rb normal con la isoforma Ob-Ra [Chen et, 1996].

Debido a que el ratón db/db es resistente a las acciones de la leptina, se ha asumido que únicamente el receptor Ob-Rb lleva a cabo la señalización [Murakami *et al*, 1997]. La carencia de señalización de la leptina en el hipotálamo conduce a una hiperfagia persistente, obesidad, altos niveles de leptina y de insulina que dan lugar a la aparición de severos síndromes diabéticos y a la degeneración de las células β [Sharma K *et al*, 2003].

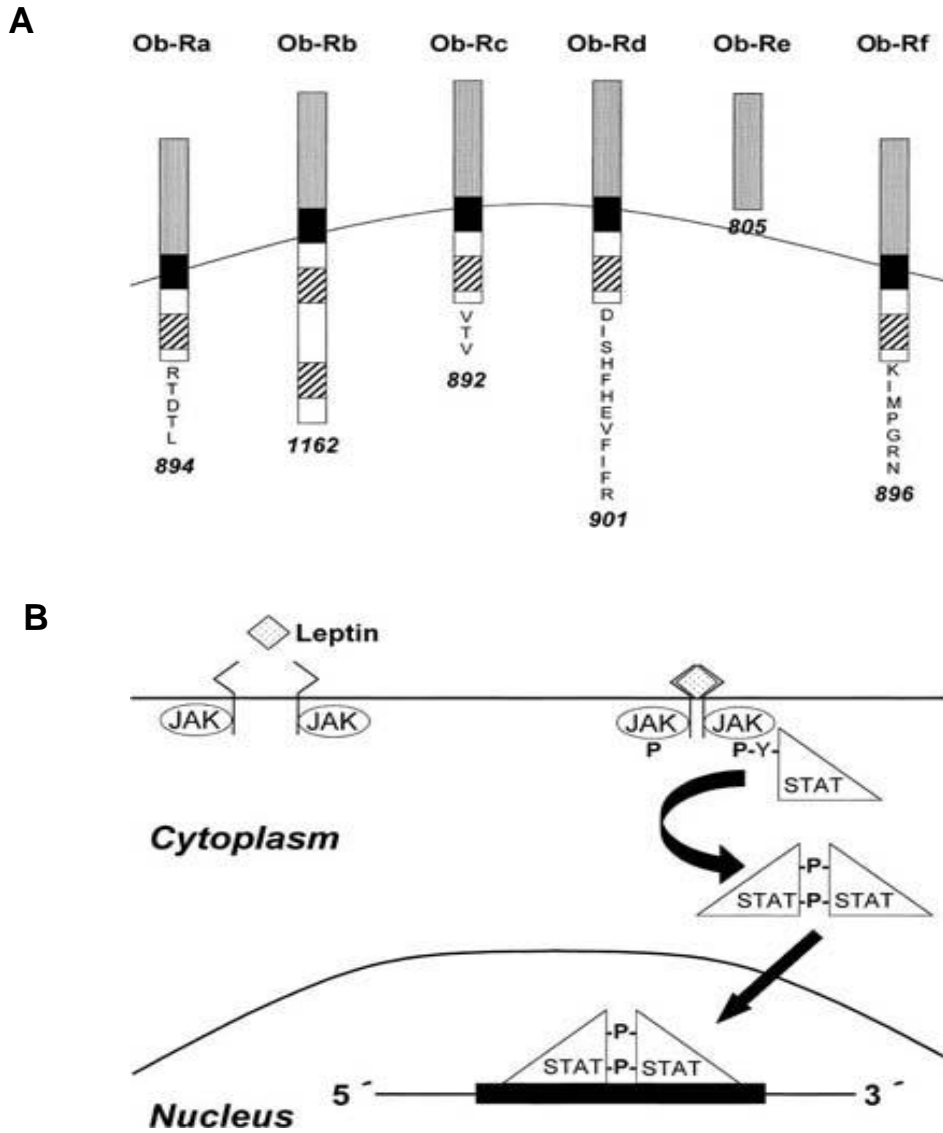


Figura 13. A) Isoformas del receptor de la leptina y vía de señalización. Se conocen seis isoformas (Ob-Ra a Ob-RF) del receptor de la leptina generadas por procesamiento alternativo. Los receptores muestran regiones amino terminal idénticas, las cuales unen leptina pero difieren en sus regiones carboxilo terminal. (■) Región transmembrana, (▨) dominio intracelular. **B) Señalización de la leptina a través del receptor Ob-Rb.** El receptor dimeriza después de que se une la leptina y causa la autofosforilación de las proteínas JAK. Las proteínas STATs fosforiladas se translocan dentro del núcleo y se unen a elementos de respuesta específicos que regulan la transcripción de los genes blanco. [Modificado de Wolf et al, 2002]

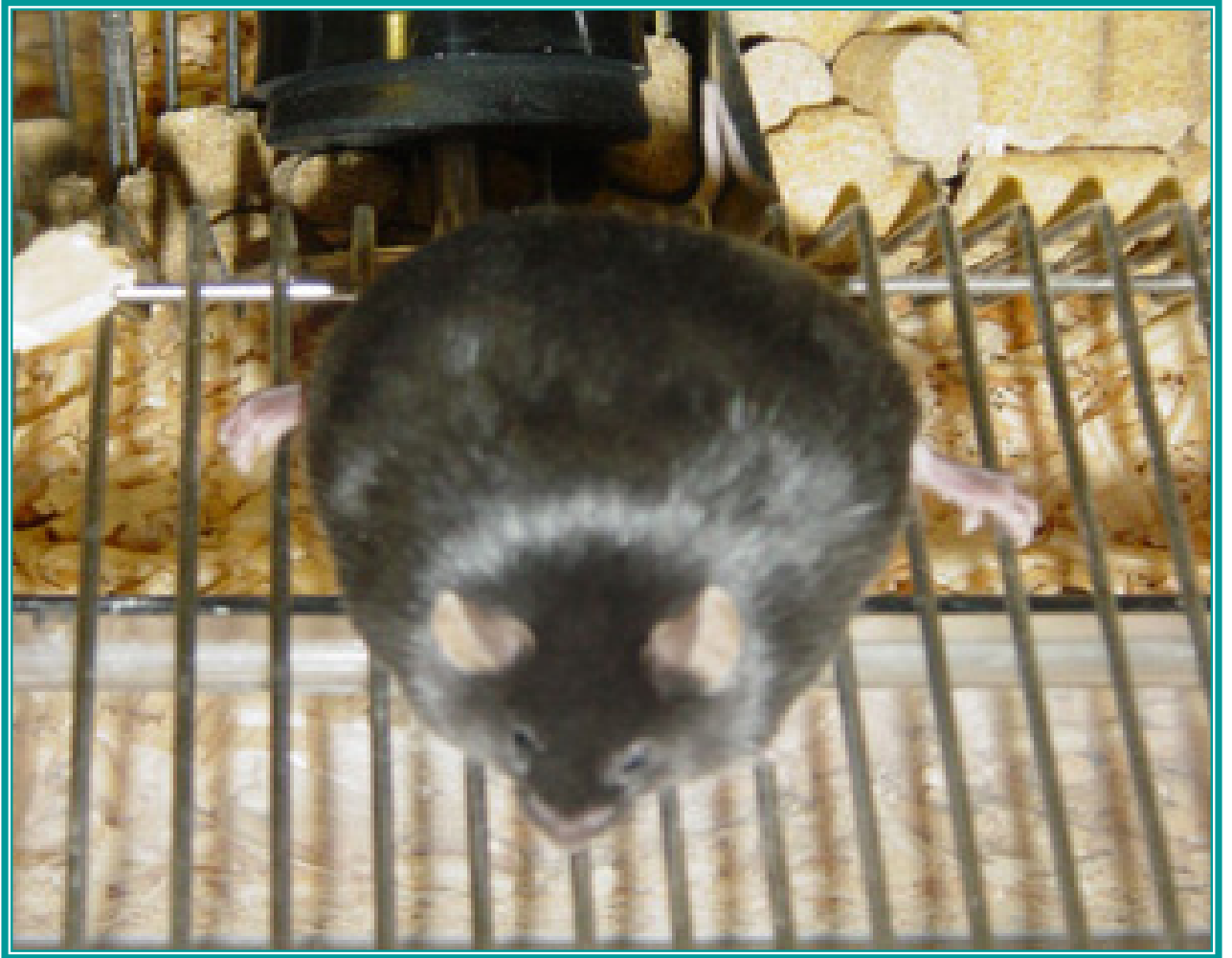


Figura 14. El ratón diabético db/db. Es un modelo de diabetes mellitus tipo II. Los ratones db/db carecen del receptor de la leptina por una mutación recesiva autosomal en el cromosoma 4. Se caracterizan por su obesidad, hiperfagia, hiperglicemia, hiperinsulinemia y el desarrollo de nefropatía diabética. El incremento de peso no solo es el resultado de la hiperfagia sino también de una disminución en la utilización del alimento y la actividad física.

Al nacer, los ratones son clínicamente sanos, presentan hiperinsulinemia temprana detectada a los 10 días de edad, seguida de hiperglicemia, los niveles de glucosa en sangre son elevados al mes de edad (7.2 ± 2.3 mM) y su diabetes comienza a desarrollarse a partir de la 8a. semana de vida. En la 16^a semana de vida, la patología se manifiesta plenamente, presentando manifestaciones clínicas de diabetes y problemas de insuficiencia renal, los niveles de glucosa en sangre son de 28.6 ± 13.2 mM. Los cambios tempranos de la función renal se caracterizan por un incremento en la velocidad de filtración glomerular seguida por la aparición de proteinuria. El rango de albuminuria es entre 68 y 600 μ g en 24 horas en el ratón db/db, mientras que en los ratones control es de 4 a 21 μ g en 24 horas [Cohen *et al*, 2001]. Al

progresar la enfermedad renal en ratones maduros se observa una disminución de la velocidad de filtración glomerular, engrosamiento difuso y nodular de la matriz mesangial, aumento en el número de células mesangiales, lesiones exudativas, cambios vasculares y depósito de colágena que produce engrosamiento de la membrana basal glomerular. Después de los 5 ó 6 meses de edad, el peso corporal y los niveles de insulina comienzan a caer asociados con la degeneración de las células de las isletas pancreáticas [Lee SM *et al*, 1981]. Las manifestaciones de daño renal pueden ser prevenidas con el tratamiento temprano usando anticuerpos contra TGF- β , impidiendo así el incremento en las proteínas de matriz extracelular en los ratones diabéticos [Ziyadeh *et al*, 2000].

El ratón db/db es uno de los modelos mejor caracterizados para el estudio de la nefropatía diabética humana. Las características comunes que tiene este modelo con la nefropatía diabética humana son la hipertrofia renal, albuminuria y expansión del glomérulo y de la matriz mesangial. Las características que no son observadas en este modelo con respecto a la condición humana son un incremento en el grosor de las membranas basales en relación a la albuminuria, albuminuria progresiva y características avanzadas de la nefropatía diabética como esclerosis nodular en el glomérulo, fibrosis tubulointersticial y atrofia tubular [Sharma *et al*, 2003].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El betaglicano, receptor III del TGF- β es un importante modulador de las acciones del TGF- β su importancia radica en su acción dual: su forma membranal potencia las acciones del TGF- β y su forma soluble antagoniza sus efectos. El betaglicano soluble se encuentra de manera natural en el organismo y su producción como proteína recombinante en un sistema de baculovirus es de alto rendimiento. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el SBG tiene una afinidad muy alta por todas las isoformas del TGF- β en mamífero y que su unión es específica y no une a otros miembros de la familia del TGF- β . Su potencial como agente anti-TGF- β ha sido demostrada es estudios *in vitro* utilizando diversas líneas celulares. En modelos *in vivo* su efecto anti-TGF- β ha quedado de manifiesto en diversos modelos animales tanto de cáncer como tuberculosis.

El betaglicano soluble se encuentra de manera natural en el suero y matriz celulares, y sus propiedades únicas como molécula anti-TGF- β sugieren su enorme potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades fibróticas mediadas por el TGF- β por arriba de otros agentes anti-TGF- β utilizados.

Este trabajo tiene como objetivo principal demostrar que el betaglicano soluble recombinante (SBG) es una molécula con capacidad terapéutica para el tratamiento de la nefropatía diabética que se desarrolla en el ratón diabético db/db de manera similar al observado en la nefropatía diabética humana.

Los estudios presentados en este trabajo contribuirán a la caracterización del betaglicano soluble recombinante como una molécula terapéutica anti-TGF- β para el tratamiento de enfermedades fibróticas, sumándose a los estudios de caracterización de esta molécula para hacer de su aplicación en humanos una posibilidad real en un futuro.

OBJETIVOS

General

Establecer si el betaglicano soluble recombinante (SBG) puede prevenir y/o retardar el daño renal en un modelo crónico de nefropatía diabética.

Particulares

Determinar la distribución en el suero y tejidos del ¹²⁵I-SBG en ratones normales y diabéticos de la cepa C57BL/KS.

Evaluar si la administración de SBG a ratones diabéticos db/db previene y/o retarda el daño a nivel funcional midiendo los niveles de creatinina plasmática, depuración de creatinina y albuminuria.

Establecer si la administración de SBG a ratones diabéticos db/db previene y/o retarda el daño a nivel estructural evaluando la expansión de la matriz mesangial de los glomérulos de los ratones experimentales.

Cuantificar el efecto del tratamiento con SBG sobre los niveles de ARNm de las isoformas del TGF- β y proteínas reguladas positivamente por TGF- β involucradas en el daño renal, en los riñones de los ratones tratados.

Determinar el efecto del SBG en la acumulación de las proteínas de matriz colágena IV y fibronectina en el glomérulo de los ratones experimentales.

Establecer la vía de señalización del TGF- β involucrada en el tratamiento con SBG de la nefropatía diabética en los ratones db/db.

MATERIALES Y METODOS

Expresión y purificación del betaglicano soluble recombinante.

El betaglicano soluble recombinante utilizado en estos experimentos fue producido en nuestro laboratorio por el M.C. Valentin Mendoza. Para su obtención se utilizó el sistema de expresión de baculovirus. La cepa recombinante de baculovirus empleada se obtuvo en trabajos anteriores [López-Casillas *et al*, 1994]. Para la expresión del SBG se infectaron células de insecto H5 con el vector pBlueBac4 que contiene el cDNA que codifica para el betaglicano de rata bajo la regulación del promotor de polihedrina para la expresión del betaglicano en células de insecto. Las células se cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/ml a una multiplicidad de infección de 10 con un stock de alto título de baculovirus recombinante y se incubaron a 27 °C en la oscuridad. Después de 48 h, se adicionó PMSF al cultivo a una concentración final de 1mM en etanol y se obtuvo el medio condicionado mediante centrifugación del cultivo a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C para remover restos celulares. El SBG se purificó a partir del medio condicionado mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando sefarsa quelante de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech, UK) cargada con níquel y equilibrada con buffer de lavado (hepes 25 mM pH 7.5, KCl 1 M, imidazole 20 mM y PMSF 1 mM). El betaglicano se eluyó utilizando un gradiente continuo de imidazol de 20 a 250 mM en un volumen de 200 ml. Se colectaron fracciones de 5 ml y se detectó el betaglicano mediante SDS-PAGE, tinción con plata y western blot utilizando el anticuerpo policlonal 822 que reconoce el ectodominio del betaglicano. Se juntaron todas las fracciones en las que el betaglicano se encontraba puro y se concentraron mediante un sistema de amicón (Millipore, Bedford, MA). La muestra se dializó contra buffer de fosfatos y salina (PBS) con 1% (v/v) de glicerol y 1 mM de PMSF. La concentración de proteínas a la muestra se determinó con método de Bradford y se congeló en alícuotas a -70°C hasta su uso.

Para realizar los experimentos de este trabajo, se mezclaron alícuotas de SBG procedentes de un mismo lote y se ajustó a la concentración requerida para la dosis equivalente a 50 µg de proteína en 100 µl utilizando PBS

Iodinación del betaglicano soluble recombinante

La iodinación del SBG se realizó de acuerdo al método de cloramina T [Cheifetz, 1990]. Brevemente, se mezclaron 1 μg de SBG resuspendido en 5 μL de acetonitrilo al 30 % y TCA 0.1%, con 5 μL de fosfato de sodio 1.5 M. Se adicionaron 4 μL de Na^{125}I (aproximadamente 400 μCi) y 2 μL de cloramina T (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incubó la mezcla durante 2 min. con agitación constante. Se adicionaron 2 μL de cloramina T y se incubó durante 1.5 min. Se adicionaron nuevamente 2 μL de cloramina T y se incubó durante 1 min. La reacción se detuvo adicionando 10 μL de N-acetiltirosina 50 mM, 100 μL de KI 60 mM y 100 μL de urea (1.2 g en ácido acético 1 M). Se realizó la separación del TGF- β marcado del ^{125}I libre por cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas de sephadex-G25 y se cuantificó su actividad específica mediante cromatografía de capa fina en un contador γ .

Distribución del ^{125}I -SBG

Se evaluó la distribución del SBG en suero y en diferentes órganos de los ratones normales y diabéticos de la cepa C57BLKs. Estos animales fueron reproducidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Se utilizaron 2 ratones por grupo, que fueron inyectados por vía intraperitoneal con una mezcla de 50 μg de SBG frío adicionado con una traza (577,700 cpm) de ^{125}I -SBG. Los ratones fueron sacrificados al tiempo 0 en el caso de los controles y a las 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 hrs. en el caso de los ratones tratados. La orina de los ratones experimentales se recolectó a los diferentes tiempos. En el sacrificio se recolectó la sangre de los ratones, el hígado, pulmón, corazón y riñón. Estos órganos fueron pesados y fraccionados para su cuantificación en el contador de centelleo Cobra II gamma.

Animales y diseño experimental

Los ratones diabéticos db/db fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc. (BarHarbor, ME). Los ratones diabéticos db/db y sus controles, ratones normales db/m, fueron divididos al azar en cuatro grupos como sigue: db/m PBS (n=12), db/db PBS (n=15) tratados con 100 μl de PBS como control, y, db/m SBG (n=8) y db/db SBG (n=15) tratados con 50 μg de SBG. El tratamiento comenzó a las 8 semanas de edad debido a

que a esta edad el 100% de los ratones db/db se encuentran hiperglicémicos. El tratamiento fue administrado por vía intraperitoneal cada tercer día durante dos meses. Antes del sacrificio (a las 16 semanas de edad), los animales fueron puestos en jaulas metabólicas individuales para recolectar la orina de 24 hrs. La creatinina sérica y urinaria fue determinada utilizando un autoanalizador (Technicon RA-1000, Bayer Co. Tarrytown, NY, USA). La depuración de creatinina fue calculada por la fórmula estandar $Ccr=UV/P$, donde U es la concentración de la creatinina en la orina, V es la velocidad de flujo en la orina y P es la concentración de creatinina en el plasma.

Ensayo de albúmina urinaria

La concentración de albúmina en las muestras de orina de 24 hrs. fue medida utilizando un ELISA competitivo [Cohen *et al*, 1995]. En el cual, la albúmina de ratón en la fase soluble compite con la albúmina inmovilizada dentro de los pozos de las placas por la unión al anticuerpo antialbumina conjugada con peroxidasa (Exocell, Philadelphia, PA). Para evitar errores provenientes de una recolección incompleta de orina, la excreción de albúmina fue normalizada por la concentración de creatinina urinaria.

Extracción de RNA

El RNA fue aislado del riñón de cada animal experimental siguiendo el método de guanidina-isotiocianato-cloruro de cesio [Sambrook *et al*, 1989]. En el sacrificio los riñones de los animales experimentales fueron guardados en nitrógeno líquido y guardados a -20° C. Cada riñón se homogeneizó en 8 ml de tiocinato de guanidina (Sigma) utilizando un homogeneizador Polytron-Aggregate (Brinkmann Instruments). Una vez homogeneizado, se agregó 400 μ l de sarcosil al 10% y se agitó suavemente. Se centrifugó a 12 000 rpm 15 minutos a 4° C. El sobrenadante se colocó en tubos para ultracentrifuga nuevos y estériles conteniendo 4 ml de una solución de cloruro de cesio 5.7 M y se centrifugó a 29, 000 rpm por 18 hrs. a 18° C. El sobrenadante se desechó y el botón de RNA se lavó y resuspendió en agua libre de RNAsas. La solución de RNA se colocó en hielo y se resuspendió agitando la solución cada 10 minutos durante 40 minutos.

PCR en tiempo real.

La transcripción reversa (RT) fue llevada a cabo utilizando 10 µg de RNA total de cada riñón. La RT fue llevada a cabo a 42° C por 50 minutos en un volumen total de 20 µl utilizando 200 U de RTMMLV (Invitrogen), 100 pmol de hexameros (Invitrogen), 0.5 mmol/L de cada dNTP (Sigma Chemical) y 1X RT buffer de reacción (Invitrogen). La PCR en tiempo real fue realizada utilizando quantitec SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) en un volumen de reacción de 25 µl conteniendo 1 µl de cDNA y 20 pmolas de oligos específicos. Se construyó una curva estándar utilizando diluciones seriadas en número de copias de cada producto de PCR. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. La curva estándar fue calculada en referencia al ciclo "Threshold" (el ciclo de PCR en el cual la fluorescencia específica comienza a ser detectable) para el logaritmo de cada dilución de cDNA. Los resultados fueron expresados como el número de copias del gene blanco normalizadas por el número de copias del gene "acidic ribosomal protein" (ARP).

Tabla 4. Secuencias de oligonucléotidos utilizados para el análisis de los niveles de ARNm por PCR en tiempo real.

Gene	Oligos sentido (5' a 3')	Oligos antisentido (5' a 3')
TGF-β1	AGGGCTACCATGCCAACTTCT	CCGGGTTGTGTTGGTTGTACA
Collagen I	TGGATTCCCGTTTCGAGTACG	AGGTGATGTTCTGGGAGGCC
Collagen IV	TTCCTTCGTGATGCACACCA	CCGTGGCACTCGATGAATG
Fibronectin	TGGCTGCCTTCAACTTCTCCT	TGTTTGATCTGGACTGGCAGTTT
SGK	GCATGCAAACACGCTGAAGTT	TTGTTGAGAGGGACTTGGCG
ARP	AGGTGGTGCTGATGGGCA	CCTCCGGATGTGAGGCAG
TGF-β2	AAGTTTACACTGCCCTGCTG	GGTGCCATCAATACCTGCAAA
TGF-β3	GGAAGGCTGCACTCAGGAGA	CGGCCAGTTCATTGTGCTC
Betaglicano	GCCAGACGGCTACGAAGATTT	AACACTACCACTCCAGCACGG

Histología glomerular y morfometría

Una porción de la corteza renal fue fijada en buffer neutro de formalina al 10%, embebido en parafina, cortado (5 μ m) y teñido con ácido periódico de Schiff (PAS). Veinte glomérulos de cada animal fueron seleccionados al azar y la expansión de la matriz mesangial fue identificada como material PAS positivo y medida utilizando el analizador de imágenes Leika Qwinn (Cambridge, UK). El área del material PAS positivo en el mesangio fue factorizada por el área del penacho glomerular y expresada como fracción mesangial.

Inmunohistoquímica

Las secciones de riñón incluidas en parafina se desparafinaron en xilol durante 30 minutos, los tejidos se rehidrataron y bloquearon con H₂O₂ al 3% en metanol por 30 minutos seguido por la recuperación antigénica en microondas con 10mM de buffer de citratos pH 6 durante 5 minutos. Para reducir el ruido de fondo, los tejidos se trataron con una dilución 1:100 de suero de borrego (Sigma) en PBS. Después se incubaron con anticuerpos específicos contra colágena IV, fibronectina y fosfo-Smad2 toda la noche a 4° C. Al siguiente día, los tejidos se incubaron con un anticuerpo anti-inmunoglobulina biotinilado seguido por la incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Biogenes, San Ramon, CA). Como sustrato se utilizó 3-amino-9-ethyl-carbazole (Biogenex) en amortiguador de acetato conteniendo H₂O₂ al 0.05%. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Como control negativo se utilizó suero no inmune. En el caso de la colágena IV y la fibronectina se realizó la cuantificación en veinte glomérulos de cada animal seleccionados al azar, los resultados son expresados como el área positiva en el glomérulo factorizada por el área total del penacho glomerular. Para la cuantificación de la fosfo-Smad2 en el glomérulo se contaron los núcleos positivos de entre diez y quince glomérulos de cada animal, para la cuantificación en los túbulos se contaron los núcleos positivos de tres campos 40X de cada animal. En ambos casos los resultados se expresaron como el porcentaje de núcleos positivos de los núcleos totales contados.

Análisis estadístico.

Los datos son presentados como media \pm error estándar, donde n representa el número de animales. Los grupos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test Newman-Keuls para comparar entre los grupos. $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Para evaluar la efectividad del SBG en el tratamiento de la nefropatía diabética, elegimos como modelo de estudio al ratón diabético db/db, el cuál desarrolla espontáneamente diabetes mellitus al ser homocigoto para una mutación recesiva autosomal del gene del receptor de la leptina (proteína que controla el peso corporal) que da lugar a la aparición de severos síndromes diabéticos [Chen *et al*, 1996]. Por sus características, el ratón diabético db/db es el modelo de ratón mejor caracterizado y ampliamente utilizado para realizar estudios de tratamientos a largo plazo de la nefropatía diabética. La naturaleza y evolución de las anormalidades estructurales y funcionales que presenta son semejantes a las observadas en la nefropatía diabética humana. Una ventaja mas es que a diferencia de otros modelos, el ratón db/db permite realizar pruebas funcionales del riñón por lo que en nuestro estudio nos permitió evaluar la efectividad del SBG sobre la función renal.

Análisis de la distribución del ^{125}I -SBG.

Para analizar la distribución del SBG en circulación y en diferentes órganos, se realizó un experimento de distribución durante 24 horas en ratones normales y diabéticos de la cepa C57BL/Ks. Previo al análisis de distribución, se inyectaron diferentes dosis de ^{125}I -SBG a ratones normales y diabéticos y se sacrificaron a los 60 minutos después de la inyección para determinar la dosis menor de ^{125}I -SBG que nos permitiera detectarlo en circulación y en los órganos. Para realizar el análisis por 24 horas, se inyectaron 50 μg de SBG, una dosis equivalente a la dosis que sería utilizada para tratar a los ratones diabéticos del estudio, a los tiempos indicados los ratones se sacrificaron, y se evaluó la presencia de ^{125}I -SBG en suero, orina, hígado, riñón, corazón y pulmón. La figura 15 muestra que el SBG entra rápidamente en circulación observándose en ambos ratones el pico más alto a los 30 minutos después de haberlo inyectado, disminuyendo progresivamente hasta las 24 horas cuando es casi indetectable. La vida media del ^{125}I -SBG circulante fue de aproximadamente 4 horas en los ratones diabéticos y 6 horas en los no diabéticos. En cuanto a su distribución en tejidos, el ^{125}I -SBG se localizó preferencialmente en riñón concentrándose aproximadamente el 10% de la

marca total después de los 30 minutos de inyección (figura 16 y 17). Al igual que en el suero, la distribución del ^{125}I -SBG en tejidos se detectó a los 30 minutos y disminuyó gradualmente a lo largo de 24 horas. La eliminación del ^{125}I -SBG se da a través de heces y orina.

Distribución del ^{125}I -SBG en suero

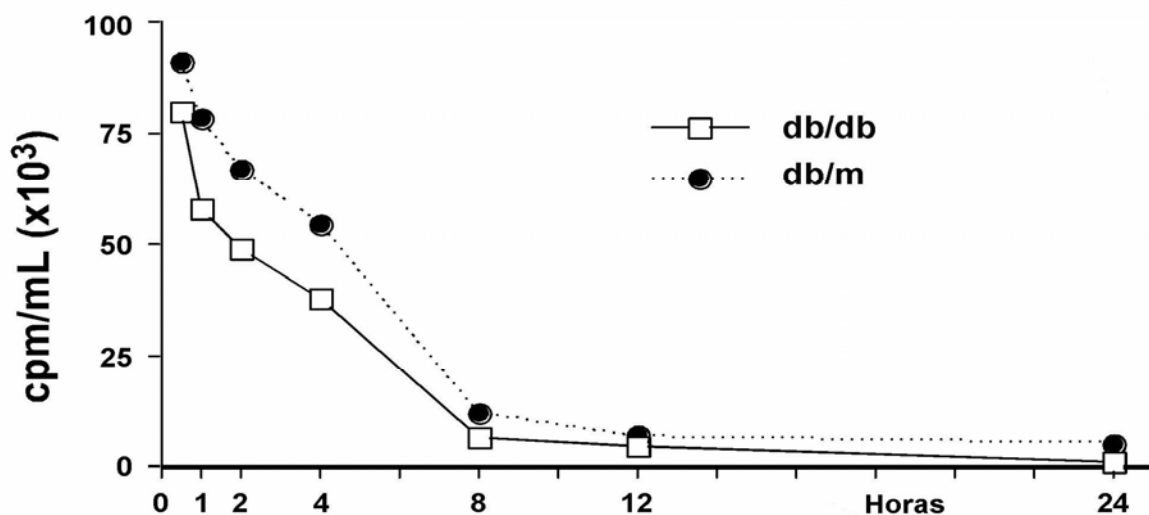


Figura 15. Distribución del ^{125}I -SBG en suero. La gráfica muestra la distribución del ^{125}I -SBG en el suero de los ratones normales db/m (puntos negros) y los ratones diabéticos db/db (cuadros blancos). Se utilizaron dos ratones por cada punto los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 50 μg de SBG conteniendo una traza de ^{125}I -SBG (577 700 cpm). Los ratones se sacrificaron a los tiempos indicados y su sangre fue obtenida del plexo axilar. El ^{125}I -SBG fue cuantificado en una alícuota del suero de los ratones experimentales utilizando un contador gamma.

La figura 19 muestra la cuantificación del ^{125}I -SBG en la orina de los ratones experimentales, en los ratones diabéticos la eliminación de la molécula marcada es muy rápida a los 30 minutos se observa el pico más alto que disminuye gradualmente hasta las 12 horas, indicando que los ratones presentan un daño renal severo ya que pareciera que la proteína es filtrada completamente en la orina. En los ratones normales no se detecta radiactividad hasta a partir de las 9 horas y a las 24 horas hay mayor detección, lo que indicaría que en las primeras horas no hay filtración de la proteína y la radiactividad detectada en el transcurso de las horas corresponde a productos de degradación de la proteína marcada (figura 18).

Datos de los animales experimentales

En los ratones db/db el curso de la enfermedad esta marcadamente influenciado por el fondo genético. Al nacer, los ratones son clínicamente sanos, presentan hiperinsulinemia temprana, seguida de hiperglicemia y su diabetes comienza a desarrollarse a partir de la 8a. semana de vida. En la 16^a semana de vida, la patología se manifiesta plenamente, presentando manifestaciones clínicas de diabetes y problemas de insuficiencia renal [Breyer *et al*, 2005].

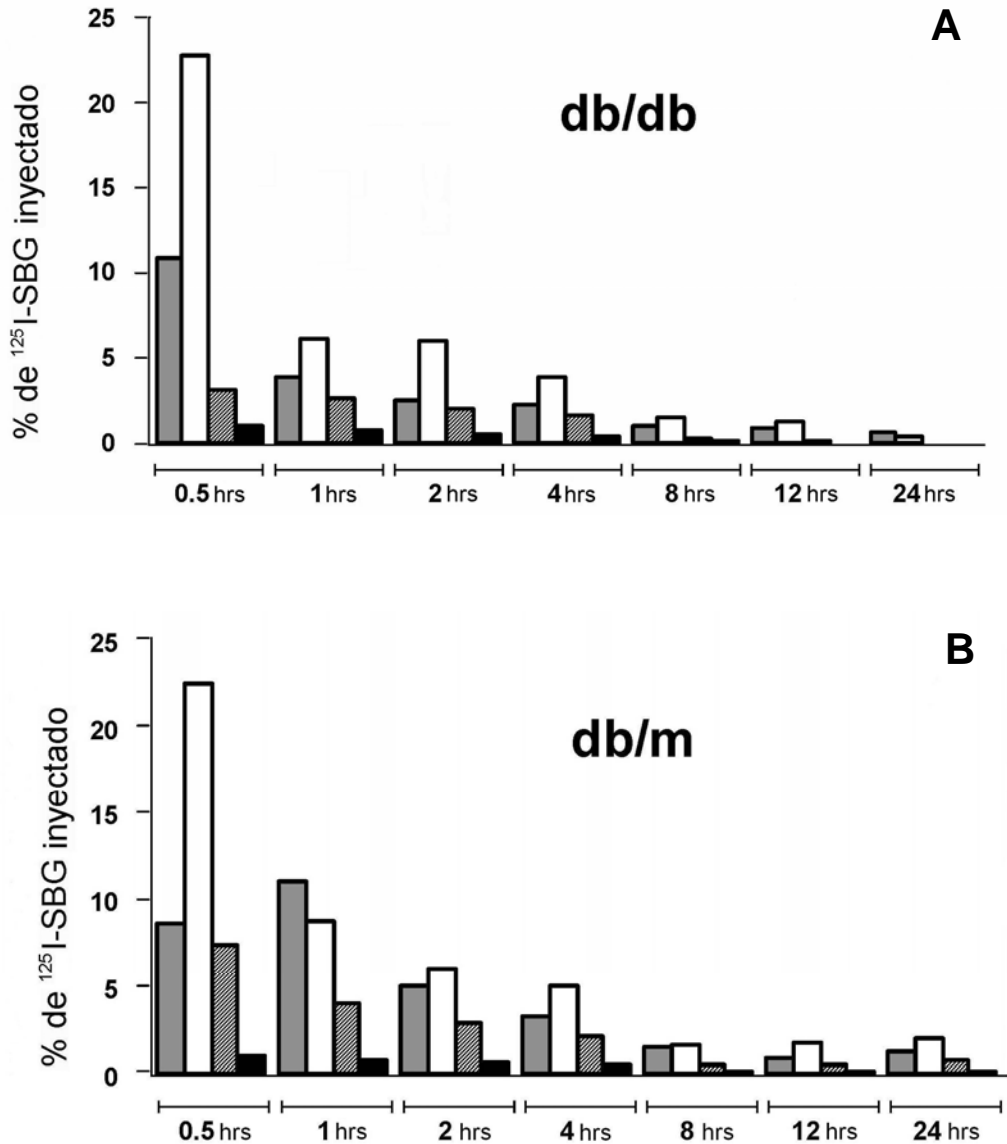


Figura 16. Distribución del ¹²⁵I-SBG en tejidos. La distribución del ¹²⁵I-SBG en tejidos se muestra en el panel A) correspondiente a ratones diabéticos db/db y B) ratones normales db/m. Los resultados se muestran como el porcentaje de marca acumulado en cada órgano, riñón (barras grises), hígado (barras blancas), pulmón (barras punteadas) y corazón (barras negras). La mayor acumulación de ¹²⁵I-SBG fue observada en el riñón.

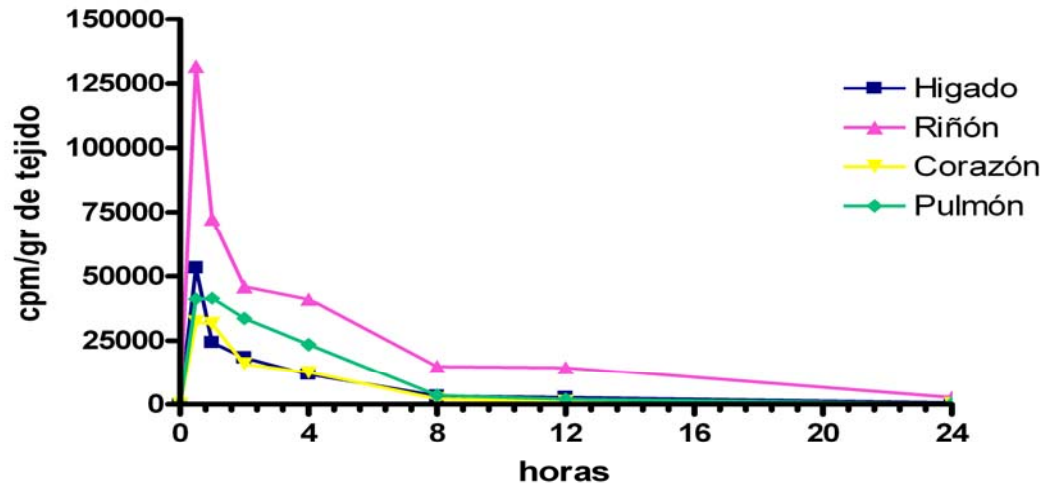
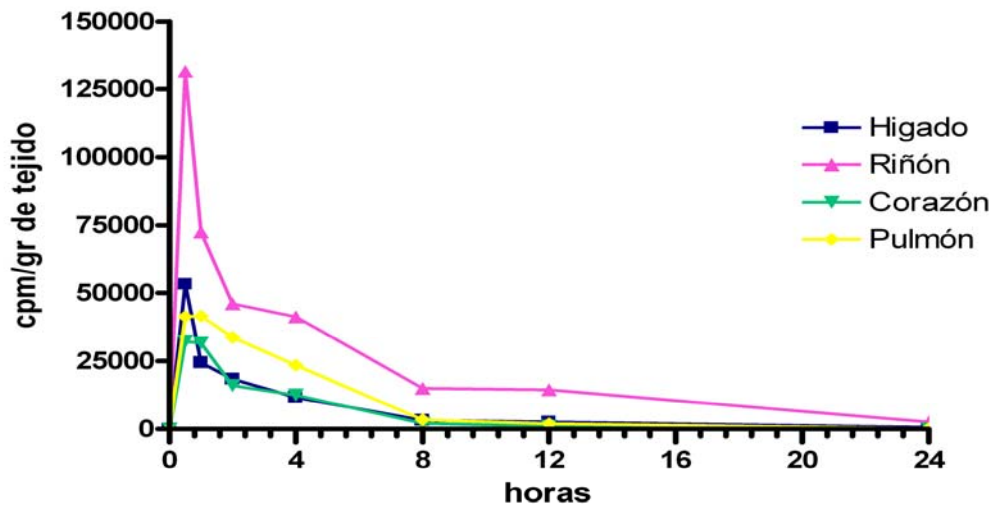
A**Distribución $^{125}\text{I-SBG}$
ratón diabético****B****Distribución $^{125}\text{I-SBG}$
ratón normal**

Figura 17. Distribución del $^{125}\text{I-SBG}$ en tejidos. La figura muestra la distribución del $^{125}\text{I-SBG}$ en varios tejidos. Los resultados son expresados como el número de cpm por gramo de tejido. A los 30 minutos se da la máxima detección de la molécula, la cual se acumula principalmente en riñón y disminuye gradualmente hasta que a las 24 horas no se detecta en tejidos.

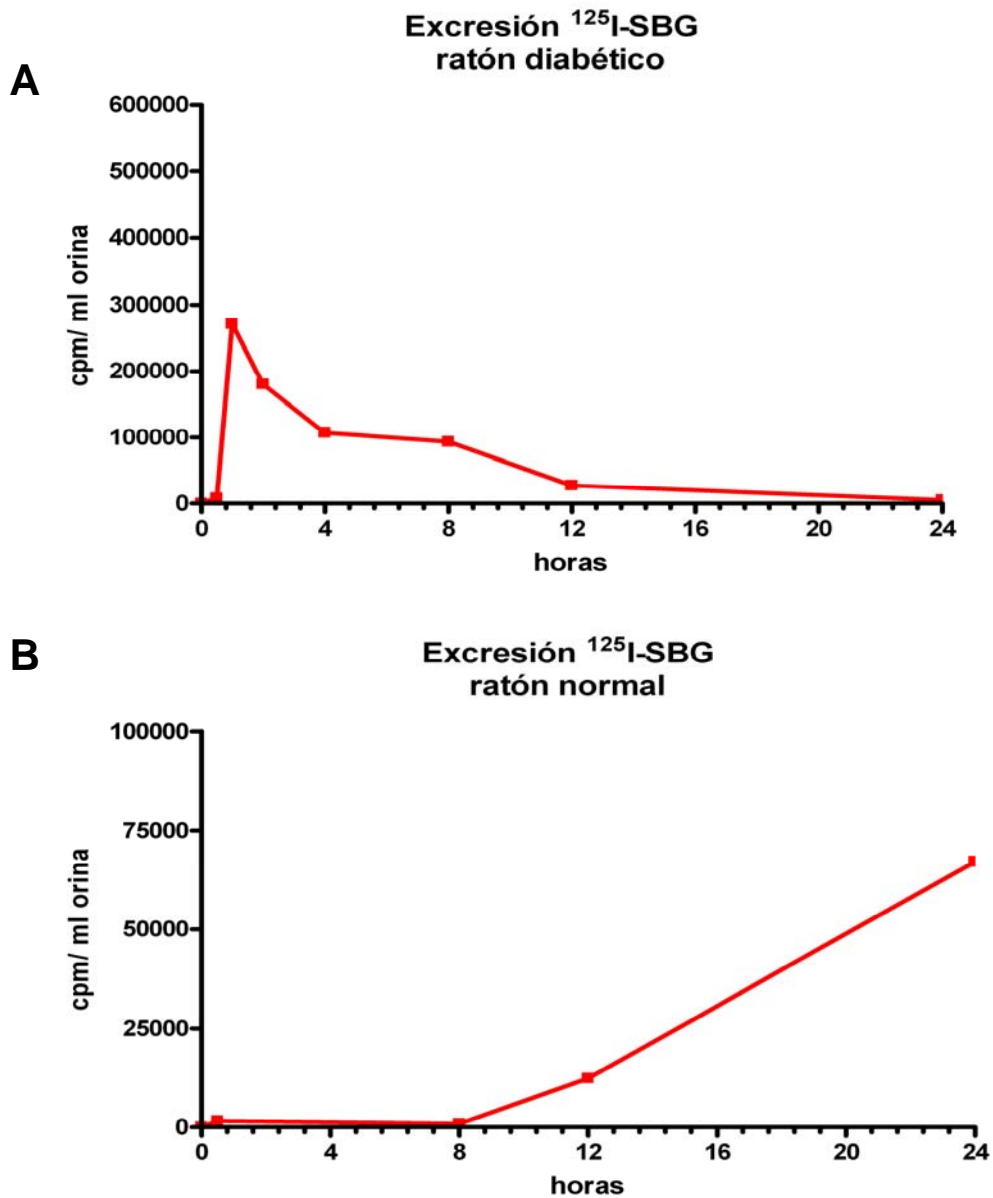


Figura 18. Eliminación del ^{125}I -SBG. Durante el experimento de biodistribución se colocaron los ratones en jaulas metabólicas y se recolectó su orina. Una pequeña fracción de la orina se midió en el contador gamma. Los resultados se expresan como el número de cpm por ml de orina. Los ratones diabéticos excretan rápidamente a la molécula, mientras que en los normales no se detecta radiactividad hasta después de las 8 horas correspondiente a posibles productos de degradación de la molécula marcada.

Basados en lo anterior, los ratones experimentales fueron divididos en 4 grupos: normales (db/m) y diabéticos (db/db) tratados con PBS y SBG respectivamente. El tratamiento se inició a las 8 semanas de edad de los ratones. Los ratones se inyectaron con $50\ \mu\text{g}$ SBG por vía intraperitoneal cada

tercer día durante dos meses hasta que los animales cumplieron 16^a semanas de vida. La dosis de SBG empleada se eligió basados en experimentos previos realizados en ratas con glomerulonefritis experimental donde se observó que respondían favorablemente a diversas dosis de SBG. Al término del tratamiento se recolectó la orina de los animales y se sacrificaron para obtener muestras de suero y sus riñones. Los ratones diabéticos utilizados en el estudio permanecieron hiperglicémicos a través del periodo experimental y su peso corporal desde el comienzo hasta el final del estudio fue significativamente más elevado que en los controles no diabéticos. Debido a la glucosuria, los volúmenes de orina fueron marcadamente incrementados en los dos grupos diabéticos (Tabla 5). El peso del riñón fue también significativamente mas grande en los ratones diabéticos comparado con los normales, sin embargo, la relación peso del riñón/peso corporal no fue significativamente diferente debido a que el peso de los ratones diabéticos es más grande que el de los normales (Tabla 5). El tratamiento con SBG no afectó los niveles de glucosa, el peso corporal ni el peso del riñón en los ratones diabéticos y los normales.

Pruebas funcionales.

Los cambios tempranos de la función renal del ratón db/db se caracterizan por un incremento en la velocidad de filtración glomerular seguida por la aparición de proteinuria, al progresar la enfermedad renal en los ratones maduros se observa una disminución de la velocidad de filtración glomerular [Sharma K *et al*, 2003]. Al término del estudio, los ratones diabéticos tratados con PBS desarrollaron daño renal como lo indicó el incremento en la creatinina plasmática y la excreción de albúmina urinaria. La concentración de albúmina plasmática fue 2.5 veces mayor en los ratones db/db tratados con PBS en comparación con los ratones db/m. El tratamiento con SBG redujo significativamente los niveles de creatinina plasmática en los ratones diabéticos y no tuvo efecto en los ratones normales (figura 19A). La depuración de creatinina en los ratones diabéticos tratados con PBS disminuyó significativamente comparada con los ratones normales, el tratamiento con SBG tiende a mejorar la depuración de creatinina en los ratones diabéticos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas estadísticamente (figura 19B).

Tabla 5. Datos de los animales experimentales

	db/m PBS n=8	db/m SBG n=8	db/db PBS n= 14	db/db SBG n=14
Peso 8 semanas (g)	23.98±0.66	24.03±0.46	39.48±1.12*	39.97±1.69*
Peso 16 semanas (g)	26.25±0.66	26.32±0.46	48.63±1.22*	47.40±1.89*
Peso riñón (mg)	169.3±5.5	163.5±3.4	186.7±5.2*	190.5±4.3*
Peso riñón/cuerpo , x 10⁻³	6.210±0.16	6.454±0.22	3.859±0.13*	4.032±0.12*
Volúmen orina (ml/día)	0.44±0.1	0.48 ±0.2	11.7 ±0.45 *	12.5±0.71 *
Glucosa plasma 8 sem (mg/dl)	79.5±12.04	80.4±5.28	203.3±20.7*	210.7±19.64*
Glucosaplasma16 sem (mg/dl)	87.6±11.56	98.5±5.5	388.5±14*	410.0±14.02*

* P<0.05 vs db/m PBS

La tabla muestra las características fisiológicas de los ratones tratados con SBG. El experimento se inició a las 8 semanas de edad de los animales, los ratones se trataron con 50 µg de SBG por vía intraperitoneal durante 2 meses. Desde el inicio del experimento el peso corporal de los ratones diabéticos fue mayor que el de los animales normales. Los ratones diabéticos presentaron poliuria e hiperglicemia durante el periodo experimental.

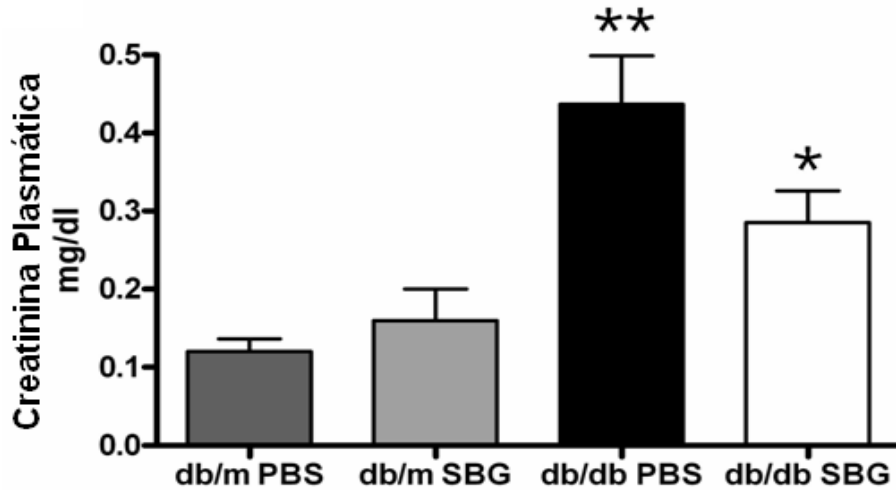
La excreción de albúmina en la orina fue 4 veces mayor en el grupo db/db PBS comparado con el grupo control db/m PBS (figura 20). El tratamiento de los ratones diabéticos con SBG redujo en un 50% la excreción de albúmina en la orina. El tratamiento con SBG no tuvo efecto sobre la excreción de albúmina en los ratones normales.

Análisis de la expansión de la matriz mesangial.

Entre las lesiones estructurales que presenta el riñón de los ratones diabéticos db/db se encuentra un engrosamiento difuso y nodular de la matriz mesangial, aumento en el número de células mesangiales, lesiones exudativas, cambios vasculares y depósito de colágena que produce engrosamiento de la membrana basal glomerular [Sharma K *et al*, 2003].

Los glomérulos de los ratones db/db analizados al final del estudio, presentaron expansión mesangial difusa caracterizada por un incremento en la acumulación de material PAS positivo en el mesangio comparado con los glomérulos de los ratones db/m (figura 21).

A



B

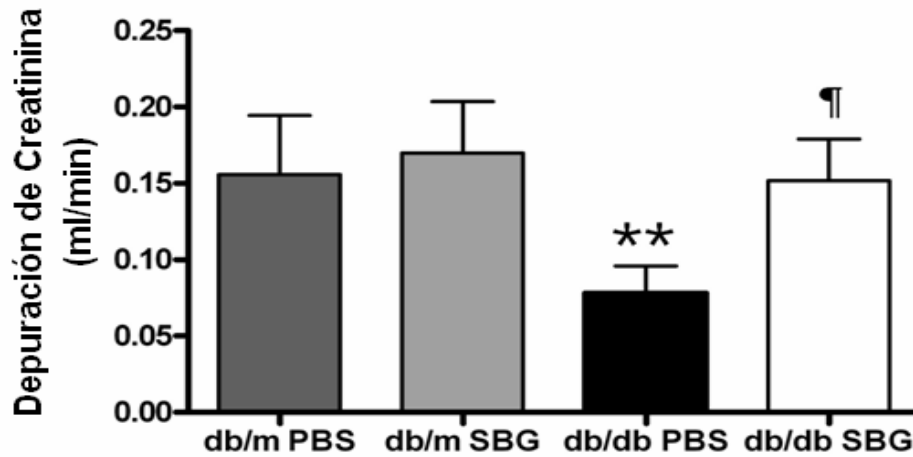


Figura 19. El tratamiento con SBG mejora la función renal de los ratones db/db. El panel A) muestra la creatinina plasmática y el B) la depuración de creatinina en los ratones diabéticos db/db. Las barras grises representan a los ratones db/m PBS y db/m SBG, las barras negras a los ratones db/db PBS y las barras blancas a los ratones db/db SBG. **, $P < 0.05$ vs db/m PBS. *, $P < 0.05$ vs db/db PBS. ¶, $P = 0.09$ vs db/db PBS.

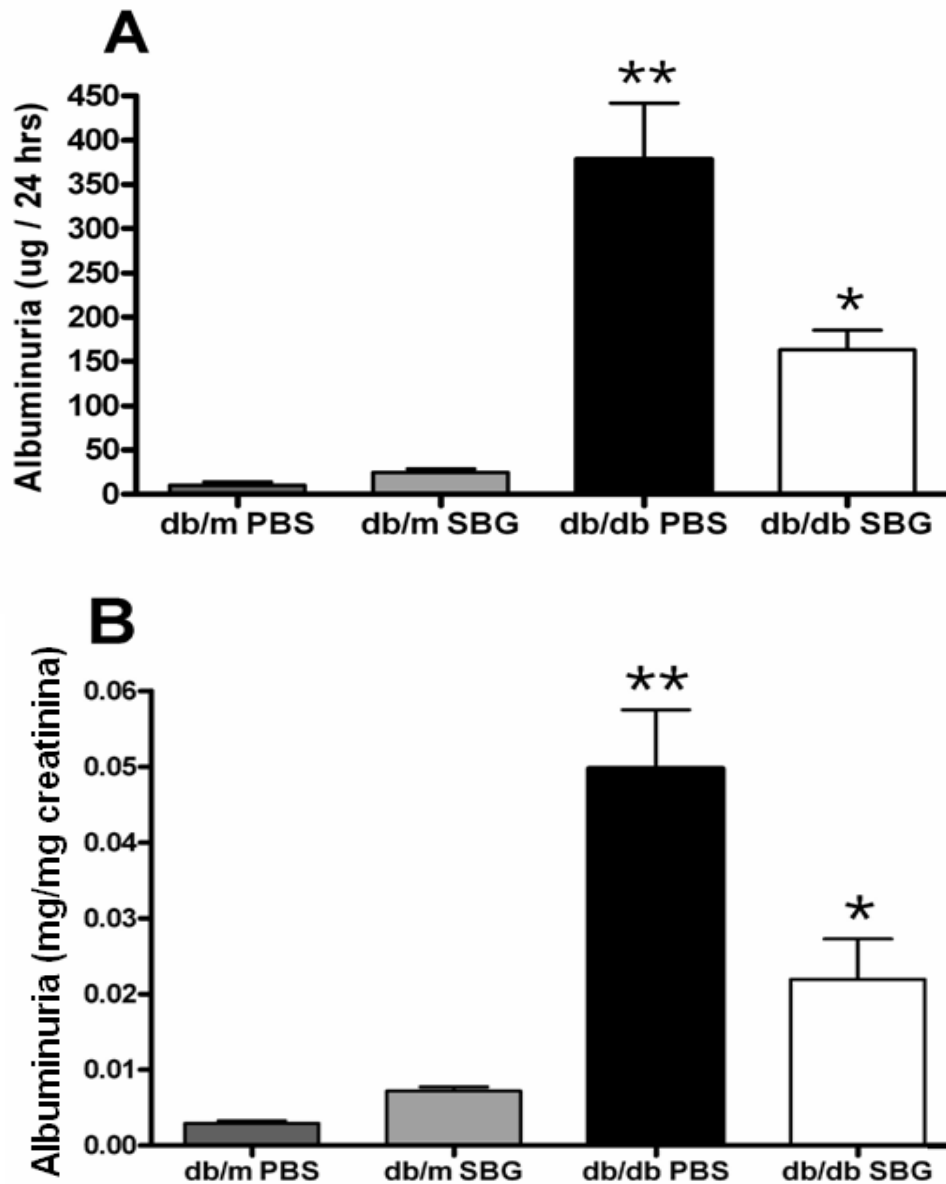


Figura 20. El tratamiento con SBG disminuye la albuminuria. La excreción de albúmina urinaria en ratones normales db/m (barras grises) y diabéticos (barras negras y blancas) fue determinada en la orina colectada durante 24 horas. El panel A muestra la cantidad de albúmina excretada en 24 horas, el panel B muestra la excreción de albúmina urinaria normalizada por la creatinina urinaria. **, $P < 0.05$ vs db/m PBS. *, $P < 0.05$ vs db/db PBS

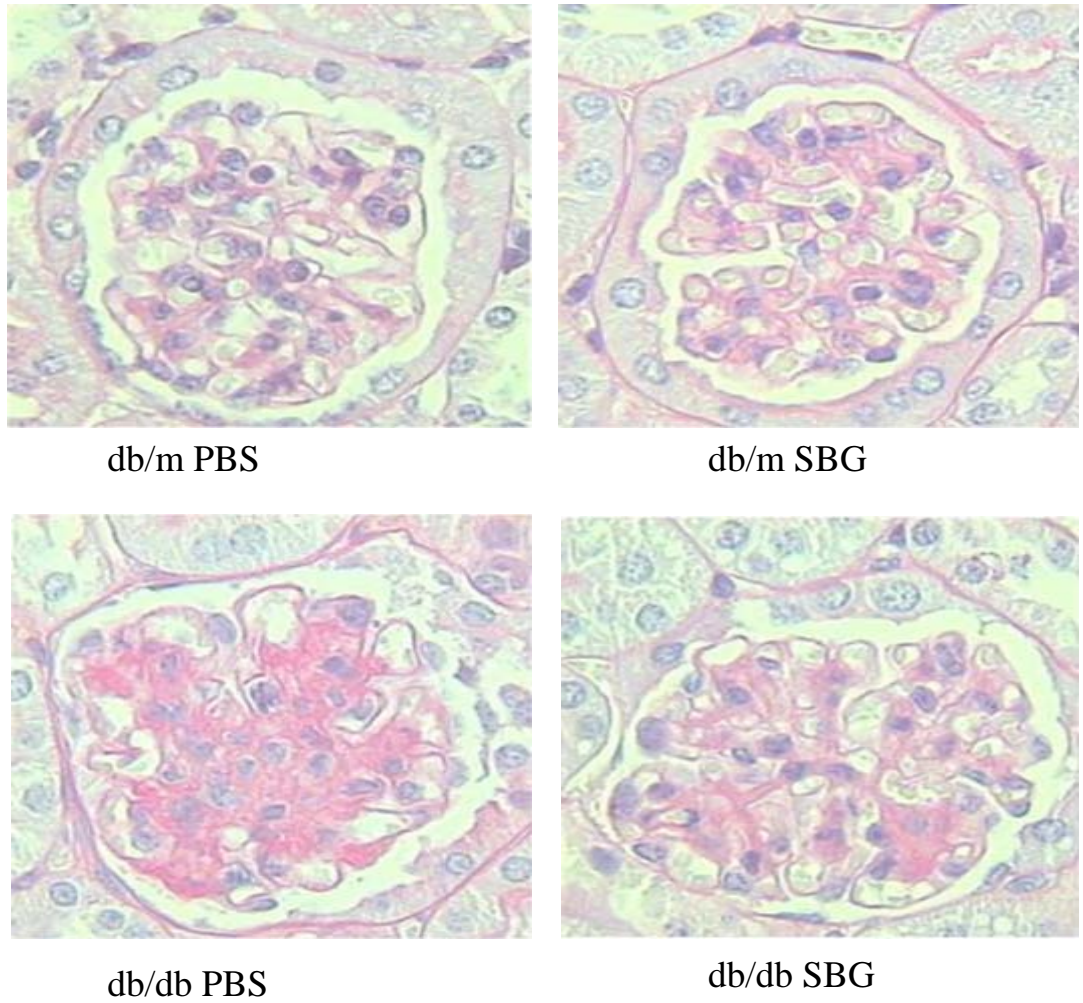
El análisis morfométrico de la expansión mesangial en los ratones db/db mostró un incremento de 2.4 veces en los ratones diabéticos comparado con los ratones no diabéticos. Como se esperaba el tratamiento con betaglicano soluble redujo significativamente la expansión mesangial en los ratones db/db, pero no afectó el área mesangial en ratones db/m (figura 21).

Como ha sido reportado por otros grupos, ninguno de nuestros grupos experimentales presentó cambios patológicos significativos en el compartimento tubulointersticial (dato no mostrado).

Análisis de la expresión del TGF- β y proteínas de matriz extracelular

El TGF- β es conocido por sus poderosas acciones fibrogénicas una de las más importantes es el estimular su propia producción y la síntesis de proteínas de matriz extracelular [Roberts y Sporn, 1990]. En este estudio analizamos el efecto del SBG sobre la expresión de las diferentes isoformas del TGF- β por PCR en tiempo real utilizando los oligonucleótidos listados en los métodos. Encontramos que los ARNs mensajeros del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 se encuentran incrementados significativamente en 2.8, 2.0 y 5.0 veces respectivamente en los ratones diabéticos tratados con PBS comparados con los ratones normales (figura 22). Por el contrario, los ratones que fueron tratados con SBG disminuyeron significativamente la sobreexpresión de las tres isoformas del TGF- β hasta niveles normales. El tratamiento con SBG no afectó los niveles de los ARNs del TGF- β en los ratones normales (figura 22).

Estudiamos también la expresión de genes que codifican para proteínas reguladas positivamente por el TGF- β como son las proteínas de matriz extracelular. La colágena IV, colágena I y fibronectina se encuentran sobreexpresadas en los ratones diabéticos db/db en comparación con los ratones controles db/m. El tratamiento con SBG disminuyó la expresión de colágena I, colágena IV y fibronectina de 3, 3.3, y 2 veces respectivamente (figura 23A, B y C). Como se esperaba, la expresión de los genes en los ratones controles fue significativamente mas baja que en los ratones diabéticos y no fue influenciada por el tratamiento con SBG.



B

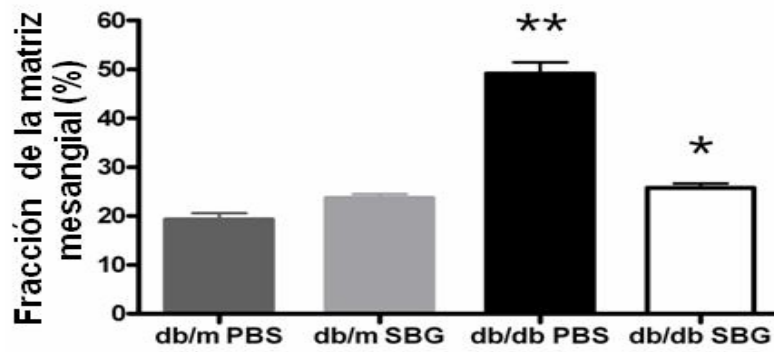


Figura 21. El tratamiento con SBG disminuye la expansión de la matriz mesangial. El panel A muestra la tinción de PAS de los glomérulos de los ratones experimentales. El panel B muestra la cuantificación del análisis morfométrico. **, $P < 0.05$ vs db/m PBS. *, $P < 0.05$ vs db/db PBS.

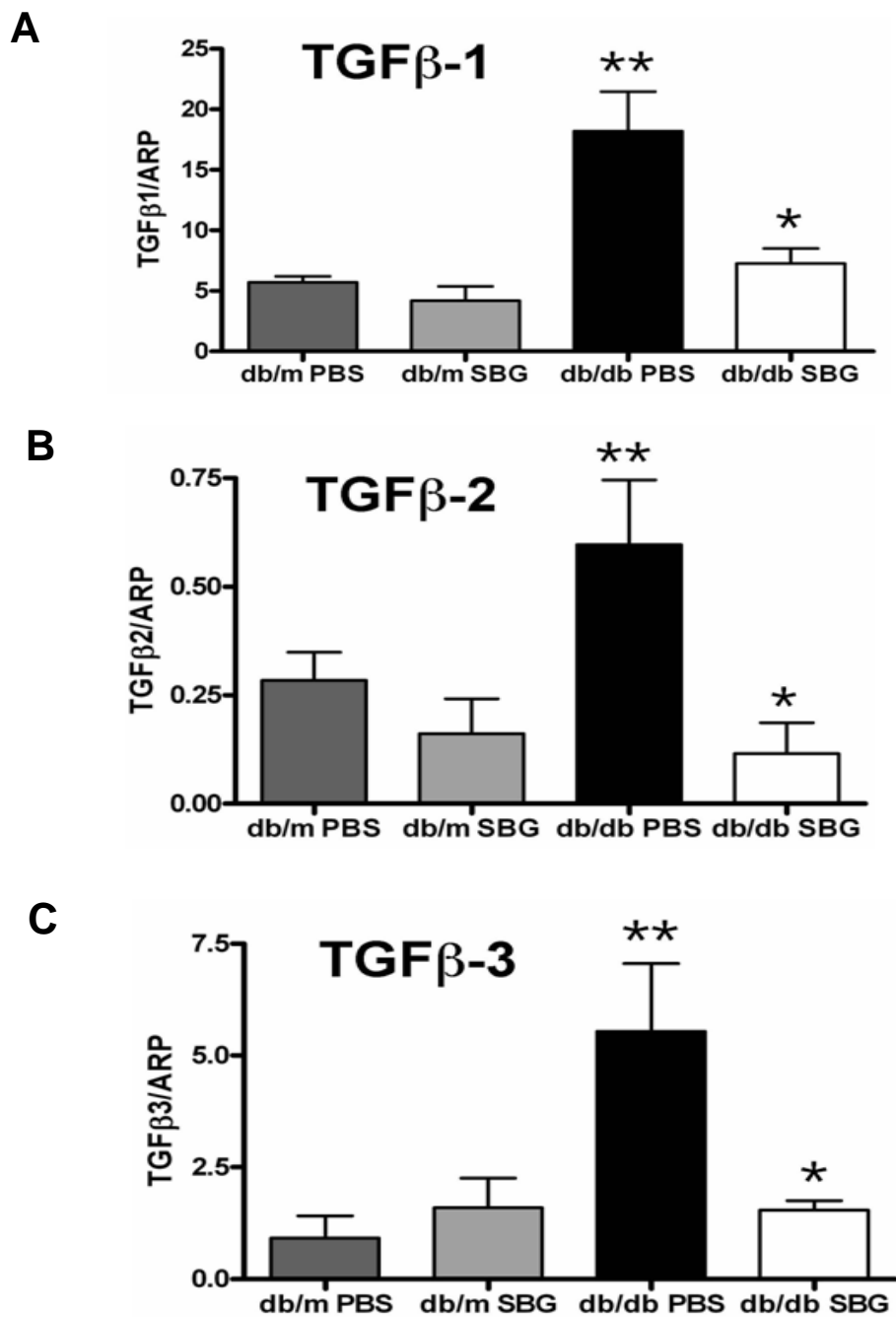


Figura 22. Efecto del SBG sobre la expresión de las isoformas del TGF- β . El análisis se realizó utilizando PCR en tiempo real. El tratamiento con SBG disminuye los niveles de ARNm de las isoformas del TGF- β en los ratones diabéticos db/db. Los resultados son normalizados con la "acidic ribosomal protein" (ARP). **, $P < 0.05$ vs db/m PBS. *, $P < 0.05$ vs db/db PBS.

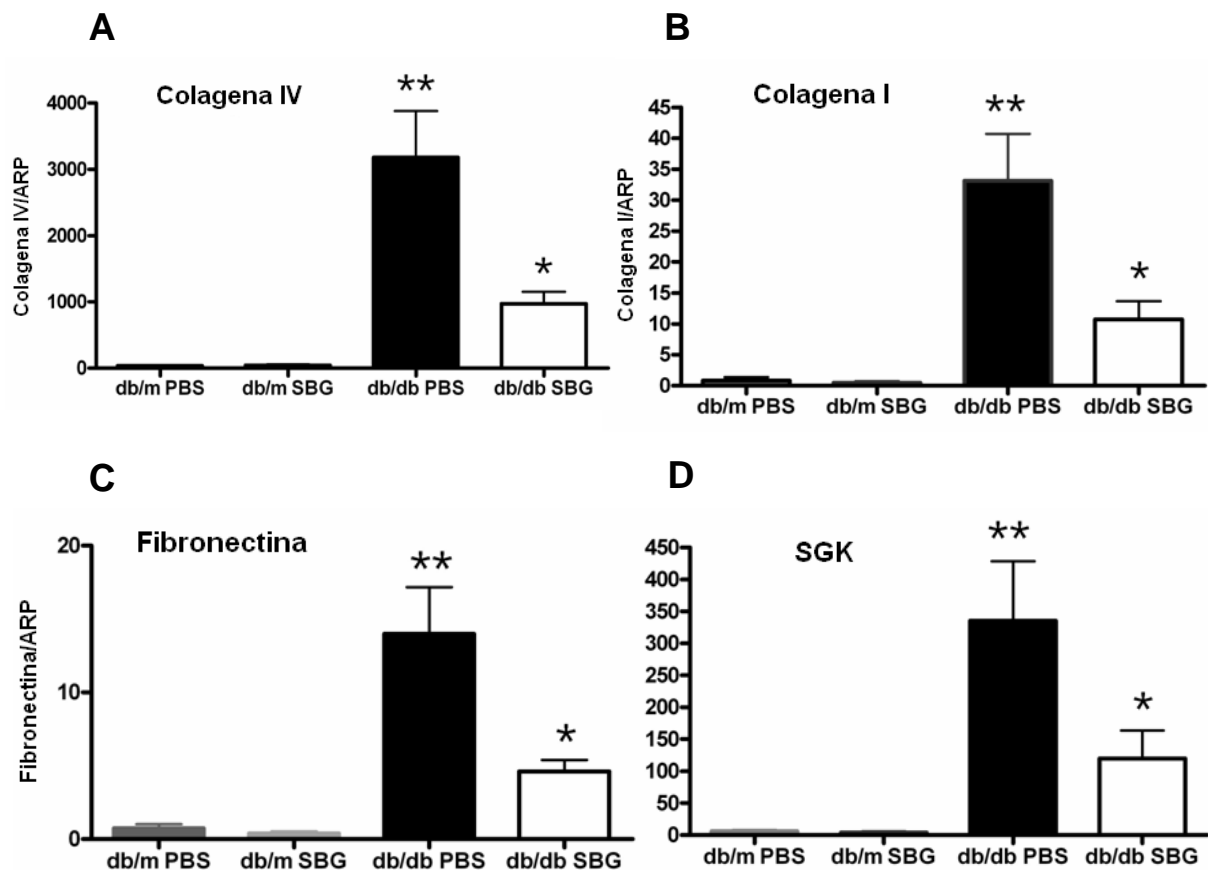


Figura 23. El betaglicano soluble regula la expresión de genes de MEC y SGK. La figura muestra la cuantificación por PCR en tiempo real del nivel de ARNm de genes regulados positivamente por el TGF- β . Los resultados se normalizaron utilizando el nivel de ARNm del gene ARP. El panel A) colágena IV, B) colágena I y c) fibronectina corresponden a proteínas de matriz. El panel D) a la proteína SGK que regula el transporte de sodio en el asa de Henle. **, P < 0.05 vs. db/m PBS. *, P < 0.05 vs. db/db PBS

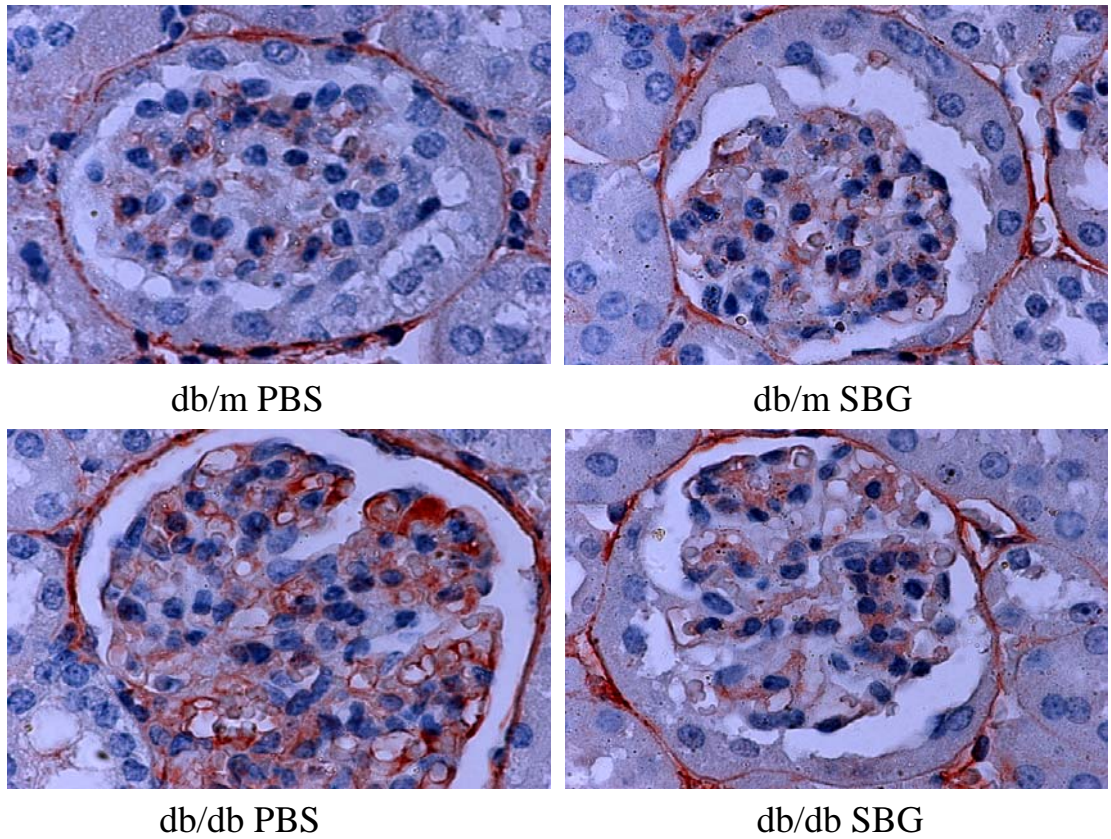
Evaluamos también la expresión de la proteína “Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase” (SGK), una cinasa de proteínas clonada originalmente como un gen regulado por el volumen celular. La SGK es capaz de regular la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ sensible a furosemida del asa ascendente de Henle (BSC1) y del canal epitelial de sodio (EnaC) del túbulo colector. Esta función sugiere la participación de esta cinasa como uno de los mediadores principales de la hiperfiltración glomerular y la hipertensión sistémica que se observan en la nefropatía diabética [Lang *et al*, 2000]. La regulación de la SGK por el TGF- β ha quedado demostrada en estudios *in vitro* donde en células en cultivo de tejidos, el TGF- β en presencia de altas concentraciones de glucosa, aumenta el RNAm de la SGK y este

aumento puede ser bloqueado por anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β [Waldegger *et al*, 1999]. En nuestro estudio, observamos que en los ratones diabéticos db/db los niveles de ARNm de SGK se incrementaron significativamente y cuando los ratones fueron tratados con SBG la expresión de SGK disminuyó en un 50% a pesar de la continua hiperglicemia (figura 23D).

El betaglicano soluble disminuye la acumulación de la fibronectina y la colágena IV en ratones diabéticos.

La colágena IV y la fibronectina son proteínas reguladas positivamente por el TGF- β y al igual que éste, se incrementan en enfermedades fibróticas [Roberts y Sporn, 1990]. Los ratones db/db tratados con PBS presentaron un incremento de por lo menos 3 veces en la acumulación de ambas proteínas en el glomérulo de los ratones diabéticos tratados con PBS con respecto a sus controles. Mientras que los ratones diabéticos tratados con SBG disminuyeron significativamente el depósito de estas proteínas en el glomérulo. El tratamiento con SBG redujo en un 30% y 50% la acumulación de colágena IV y fibronectina respectivamente. El tratamiento con SBG no afectó los niveles de estas proteínas en los ratones normales (figura 24 y 25).

A



B

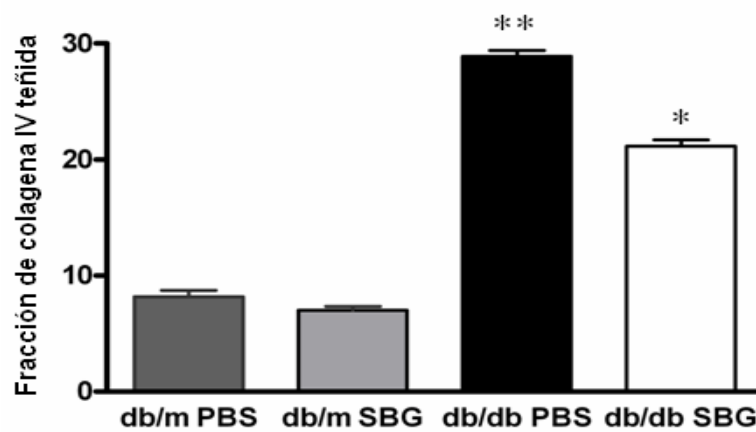


Figura 24. El tratamiento con SBG disminuye el nivel de Colágena IV en el ratón db/db. El panel A muestra inmunohistoquímica de la colágena IV en el glomérulo de los ratones db/db. El panel B muestra los resultados del análisis morfométrico. **, P < 0.05 vs. db/m PBS. *, P < 0.05 vs. db/db PBS

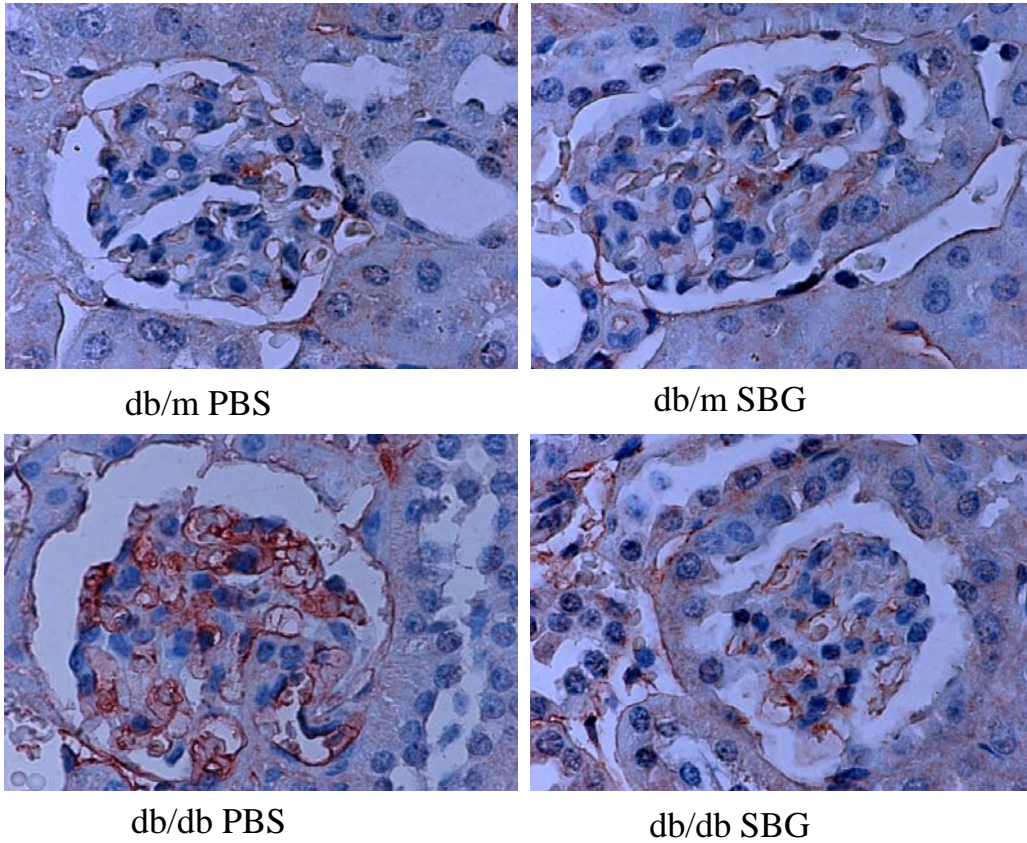
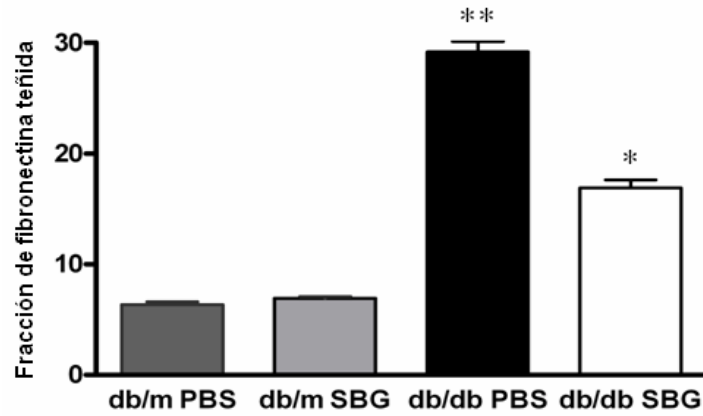
A**B**

Figura 25. El tratamiento con SBG disminuye el nivel de fibronectina en el ratón db/db. Se analizó por inmunohistoquímica la acumulación de fibronectina en el glomérulo de los ratones db/db. Se contaron 20 glomérulos al azar de cada ratón. El panel B muestra los resultados del análisis morfométrico. **, $P < 0.05$ vs. db/m PBS. *, $P < 0.05$ vs. db/db PBS

La inhibición de los efectos del TGF- β por el SBG es a través de la vía de Smads.

En la vía clásica del TGF- β , las proteínas Smad son los efectores intracelulares de la señalización del TGF- β , son activadas por los receptores del TGF- β y translocadas dentro del núcleo donde regulan la transcripción de genes que responden al TGF- β . Sin embargo, hay una evidencia creciente de la existencia de otras vías que median las señales del TGF- β a través de sus receptores pero de manera independiente de las Smads [Derynck y Zhang, 2003]. Para evaluar si los efectos del SBG observados en los ratones diabéticos db/db son a través de la vía clásica del TGF- β realizamos una inmunohistoquímica de los cortes del riñón de los animales experimentales utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a la Smad2 fosforilada es decir la Smad 2 activa. Cuando la Smad2 es activada por el receptor I del TGF- β se une a la proteína Smad 4 formando un complejo que se transloca a núcleo donde junto con coactivadores o represores modula la expresión de genes blanco regulados por TGF- β . En este estudio analizamos el número de núcleos positivos correspondientes a la Smad2 fosforilada translocada.

En los glomérulos y túbulos de los ratones diabéticos tratados con PBS la proteína Smad2 se encontró sobreactivada, cuando los ratones fueron tratados con SBG la Smad2 regresó a niveles normales. Los niveles de Smad2 fosforilada en los glomérulos y túbulos de los ratones normales no fueron afectados por el tratamiento con SBG (figura 26 y 27).

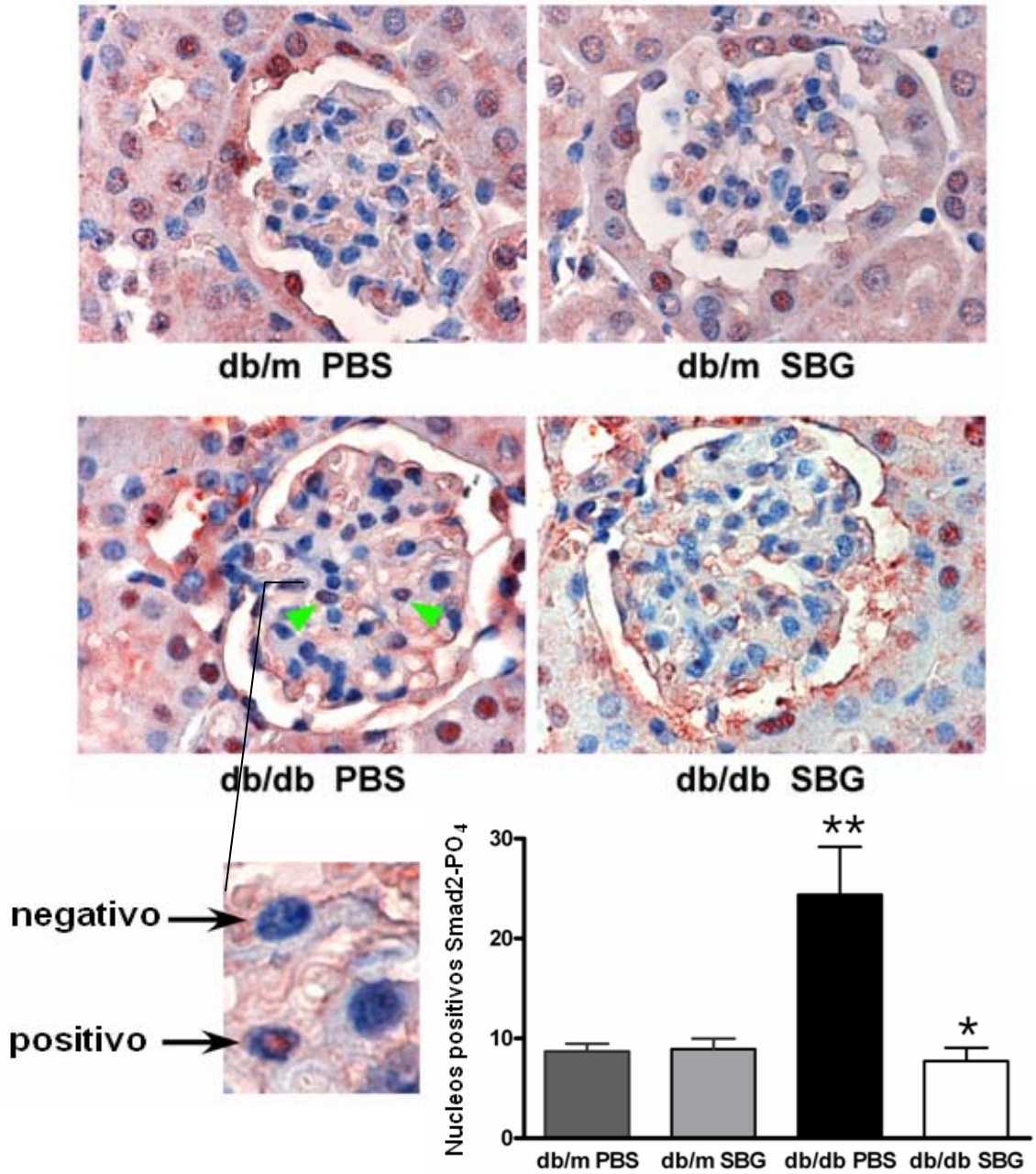


Figura 26. Los efectos del SBG son a través de la vía de señalización de las Smads. Inmunohistoquímica con anti-PO₄-Smad2 en glomérulos de los ratones db/db. **, P < 0.05 vs. db/m PBS. *, P < 0.05 vs. db/db PBS

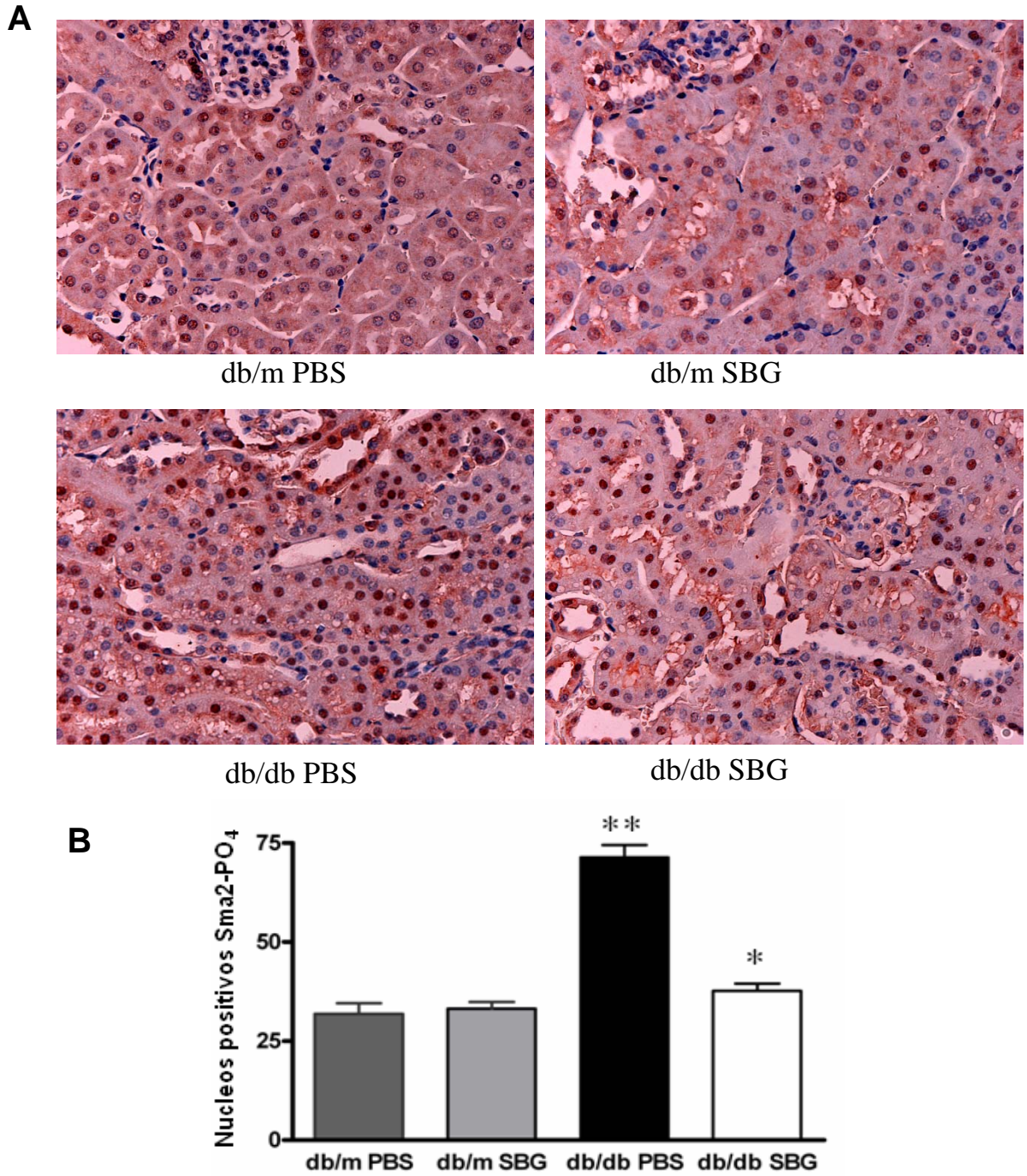


Figura 27. El SBG apaga la señalización de la vía de las Smads. A) Inmunohistoquímica con anti-PO₄-Smad2 en tubulos de los ratones db/db. **B)** % de núcleos positivos del total de núcleos contados. **, P < 0.05 vs. db/m PBS. *, P < 0.05 vs. db/db PBS

DISCUSION

El papel del TGF- β como mediador clave de las enfermedades renales ha sido extensamente estudiado [Sharma y ziyadeh, 1994; Wang *et al*, 2005]. Independientemente de la etiología, el TGF- β juega un papel central patofisiológico en las nefropatías humanas. El TGF- β juega un papel muy importante en el desarrollo de las lesiones patológicas en la nefropatía diabética no solo a nivel molecular aumentando la síntesis y degradación de componentes de matriz extracelular, sino también a nivel celular estimulando la apoptosis de las células glomerulares como los podocitos y las células endoteliales, además es el mediador clave en la transformación epitelio-mesenquimal que sufren las células tubulares en la fibrosis renal [Bhowmick *et al*, 2001]. Cada uno de los factores que inducen el estado diabético en la nefropatía diabética, estimula la expresión del TGF- β en la mayoría de los tipos celulares renales *in vitro*, en modelos animales y en pacientes diabéticos. El exceso de TGF- β y la pérdida de su regulación da lugar a los cambios característicos de la enfermedad que incluyen el engrosamiento de las membranas basales y la expansión del mesangio debido a la acumulación de matriz extracelular. Estas lesiones estructurales tienen consecuencias funcionales que se manifiestan en un aumento en la velocidad de filtración glomerular, proteinuria y la pérdida progresiva de la función renal.

El TGF- β señala a través de un complejo de receptores transmembranales que tienen actividad de cinasa en serinas y treoninas, denominados receptores tipo I y II [Massague, 1998]. Además de los receptores de señalamiento I y II, el TGF- β es regulado por el receptor tipo III o betaglicano. El betaglicano es un proteoglicano transmembranal que es considerado un co-receptor debido a que no participa directamente en la vía de señalización del TGF- β , pero sí incrementa la unión del TGF- β a los receptores I y II [López-Casillas *et al*, 1993]. Además de la forma unida a la membrana existe una forma soluble del betaglicano, la cual se ha encontrado *in vivo* en suero y matriz extracelular [Andres *et al*, 1989]. En contraste con la forma membranaral, el betaglicano soluble producido en células de insecto por métodos recombinantes, secuestra al TGF- β y no permite que se una a los receptores I y

II, bloqueando de este modo las acciones del TGF- β [López-Casillas *et al*, 1994; Vilchis-Landeros *et al*, 2001].

Tanto en estudios *in vitro* como en modelos *in vivo* utilizando ratones con cáncer y tuberculosis ha quedado demostrado el potencial del betaglicano como un agente terapéutico anti-TGF- β , en este trabajo como primer paso para determinar los efectos del SBG *in vivo* en un modelo de fibrosis renal, evaluamos si el tratamiento con SBG podría ser benéfico para prevenir ó reducir la progresión del daño renal en un modelo clásico de nefropatía diabética, el ratón diabético db/db, el cual es un modelo de diabetes mellitus tipo II que presenta un daño renal equivalente a la patología observada en el riñón diabético humano.

El SBG fue administrado a ratones diabéticos db/db durante dos meses, periodo en el cual la nefropatía diabética progresa en estos animales. El tratamiento con SBG protegió a los ratones diabéticos del daño renal a nivel estructural como a nivel funcional, como lo demuestra una disminución significativa en la concentración de creatinina plasmática y albuminuria, además la depuración de creatinina tendió a disminuir en los ratones diabéticos (figura 20 y 21). Con respecto a la expansión mesangial, el tratamiento con SBG disminuyó significativamente la expansión de la matriz mesangial a pesar del hecho de que los ratones permanecieron hiperglicémicos durante el estudio (figura 22), corroborando este efecto, la acumulación de colágena IV y fibronectina en el glomérulo se encontró disminuida en los ratones tratados (figura 25 y 26).

Es muy interesante observar que a pesar de que los niveles de SBG decaen en las primeras 24 horas después de inyectado, como lo indican los experimentos de biodistribución observados en la figura 16, 17 y 18, el tratamiento fue efectivo previniendo el daño renal en los ratones tratados. El tratamiento con SBG previno el aumento en la sobreexpresión del TGF- β 1 y las isoformas TGF- β 2 y TGF- β 3 en los ratones diabéticos (figura 23) en consecuencia el tratamiento también fue efectivo en prevenir la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas de matriz extracelular reguladas positivamente por TGF- β , tales como la colágena I, colágena IV y la fibronectina (figura 24). De igual forma, el tratamiento disminuyó la

sobreexpresión de la SGK, un marcador funcional del riñón que se encuentra aumentado en la nefropatía diabética y es regulado positivamente por TGF- β [Lang *et al*, 2000]. La SGK se localiza predominantemente en el mesangio, el túbulo distal y el asa ascendente de Henle y regula la reabsorción tubular de sodio al incrementar la actividad del canal epitelial de Sodio, Potasio y el cotransportador de Cloro [Pearce *et al*, 2000]. En la nefropatía diabética la estimulación de estos canales por la actividad de la SGK puede contribuir a la hipertensión, por otro lado, un incremento en la reabsorción de sodio en el asa ascendente de Henle resulta en hiperfiltración glomerular que caracteriza a la nefropatía diabética temprana, vía el fenómeno de la retroalimentación tubuloglomerular [Lang *et al*, 2000].

En la vía clásica del TGF- β , conocida de este modo porque es la más estudiada, sus miembros son ubicuamente expresados en todas las células y organismos y se le ha atribuido la mayoría de las funciones reguladas por el TGF- β , los efectores intracelulares de la señalización del TGF- β son las proteínas Smad, las cuales son activadas por los receptores y se translocan al núcleo donde regulan la transcripción. Sin embargo, estudios recientes [Wang *et al*, 2005; Derynck y Zhang 2003] han mostrado que los receptores del TGF- β pueden activar otras vías de señalización independientes de las proteínas Smad. En enfermedades renales al existir una sobreactivación del TGF- β se espera que la vía de las Smad se encuentre también sobreactivada, para estudiar este efecto analizamos la expresión de la proteína Smad2 fosforilada en los riñones de los ratones experimentales (figura 27 y 28). En los ratones diabéticos db/db se encontró una expresión mayor de la proteína Smad2 fosforilada, sin embargo los ratones db/db tratados con SBG presentaron una reducción en la activación de la proteína Smad2, indicando que los efectos observados del SBG sobre el TGF- β en los ratones diabéticos db/db son mediados a través de la vía de las proteínas Smad.

Varios blancos y metodologías se han utilizado para prevenir el daño renal a través de la inhibición del TGF- β . Estos incluyen anticuerpos anti-TGF- β [Border *et al*, 1990], el inhibidor decorina [Border *et al*, 1992], oligonucléotidos antisentido [Akagi *et al*, 1996], el péptido asociado de latencia de TGF- β [Hugo *et al*, 1999] y la molécula de señalización regulatoria Smad 7 [Nakao *et al*,

1999]. Así también, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y antagonistas del receptor I de angiotensina [Lacourciere *et al*, 2000; Nakamura *et al*, 1999]. En este trabajo, mostramos que el SBG es efectivo en el tratamiento de la fibrosis renal. De acuerdo a las propiedades del SBG, su utilización podría aventajar a otros inhibidores del TGF- β . Por ejemplo los anticuerpos anti-TGF- β , los cuales han sido ampliamente estudiados, podrían producir reacciones séricas, formación de complejos inmunes ó la generación de anticuerpos que los bloqueen cuando sean administrados por largos periodos de tiempo. Por otro lado, debido a que el SBG se encuentra normalmente en suero y fluidos extracelulares, a diferencia de los anticuerpos, su administración a largo plazo podría reducir la respuesta inmune. Con respecto a la potencia de neutralización del TGF- β comparado con los anticuerpos anti-TGF- β , el SBG es igual o mucho más potente especialmente en el caso de la isoforma TGF- β 2, ya que debido a su alta afinidad por esta isoforma su efecto neutralizador es diez veces más potente [Vilchis-Landeros *et al*, 2001]. A pesar de que el papel del TGF- β 2 es poco estudiado en enfermedades renales, es claro que esta isoforma al igual que el TGF- β 1 juega un papel relevante en la fibrosis renal [Nelly *et al*, 1999]. Ziyadeh y colaboradores han empleado anticuerpos anti-TGF- β para bloquear el TGF- β en el ratón diabético db/db. Aunque nuestros hallazgos son similares, el uso de anticuerpos anti-TGF- β no atenúa el grado de albuminuria en el ratón db/db, en contraste, el tratamiento con SBG disminuye la albuminuria en los ratones db/db en las mismas condiciones experimentales sugiriendo que la terapia con SBG confiere una mejor renoprotección. Las razones para esta diferencia entre SBG y anticuerpos anti-TGF- β requieren ser estudiadas. En resumen, el tratamiento con SBG no solo previno la expansión de matriz extracelular en los ratones diabéticos db/db, sino también previno la disfunción renal, sin causar algún efecto sistémico notable.

Por ultimo, una propiedad muy relevante del betaglicano soluble que lo hace destacar de otros inhibidores, es el hecho de que su generación podría ser regulada *in vivo*. Estudios con diferentes líneas celulares han mostrado que el corte del betaglicano membranal puede ser un proceso regulado [Velasco-Loyden *et al*, 2004], y dado que el betaglicano es ampliamente expresado en tejidos, el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas anti-TGF β basadas

en una terapia utilizando moléculas que promuevan el corte de este receptor puede resultar efectiva en el control de las diversas enfermedades donde el TGF- β juega un papel relevante.

CONCLUSIONES

El SBG inyectado a ratones diabéticos db/db y normales db/m se mantiene en circulación entre 4 y 6 horas y se acumula principalmente en el riñón.

El tratamiento con SBG mejora la función renal, tiende a disminuir la depuración de creatinina y disminuye significativamente la creatinina plasmática y la albuminuria.

El SBG disminuye la expansión de la matriz mesangial y los niveles de ARNm de las isoformas del TGF- β , SGK y genes de MEC. Así también, disminuye la acumulación de Fibronectina y colágena IV en el glomérulo de los ratones experimentales.

Los efectos observados del tratamiento con SBG son mediados a través de la vía clásica del TGF- β modulando la activación de las proteínas Smad.

Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el tratamiento con SBG protegió a los ratones diabéticos db/db del daño renal característico que presenta este modelo, mostrando una vez más la efectividad del SBG para el tratamiento de enfermedades mediadas por un exceso de TGF- β .

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham DJ**, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15220-5.
- Ahima RS**, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
- Akagi Y**, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1996;50(1):148-55.
- Alderson NL**, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int*. 2003;63(6):2123-33.
- Andres JL**, DeFalcis D, Noda M, Massague J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem*. 1992;267(9):5927-30.
- Andres JL**, Ronnstrand L, Cheifetz S, Massague J. Purification of the transforming growth factor-beta (TGF- β) binding proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem*. 1991;266(34):23282-7.
- Andres JL**, Stanley K, Cheifetz S, Massague J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*. 1989;109:3137-45.
- Attisano L**, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(2):235-43.
- Barbara NP**, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*. 1999;274(2):584-94.
- Bandyopadhyay A**, Lopez-Casillas F, Malik SN, Montiel JL, Mendoza V, Yang J, Sun LZ. Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Res*. 2002;62(16):4690-5.
- Bandyopadhyay A**, Zhu Y, Cibull ML, Bao L, Chen C, Sun L. A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res*. 1999;59(19):5041-6.
- Barton DE**, Foellmer BE, Du J, Tamm J, Derynck R, Francke U. Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta 2 and beta 3 in man and mouse: dispersion of TGF- β gene family. *Oncogene Res*. 1988;3(4):323-31.
- Baumann H**, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(16):8374-8.
- Beck LS**, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2841-9.
- Bedossa P**, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003;200(4):504-15.
- Bellon T**, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*. 1993;23(9):2340-5.
- Berl T**. Angiotensin-converting enzyme inhibitors versus AT1 receptor antagonist in cardiovascular and renal protection: the case for AT1 receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15 Suppl 1:S71-6.
- Kellerer M**, Capp E, Haring HU. Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia*. 1997;40(5):606-9.
- Bhowmick NA**, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12(1):27-36.
- Bitzer M**, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottinger EP. A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev*. 2000;14(2):187-97.
- Bloomgarden ZT**. Clinical diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2005;28(12):2968-74.
- Boehm U**, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.
- Border WA**, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 1992;360(6402):361-4.
- Border WA**, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*. 1990;346(6282):371-4.
- Border WA**, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*. 1992;90(1):1-7.
- Bork P**, Sander C. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett*. 1992 Apr 6;300(3):237-40.
- Bottinger EP**, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2600-10.
- Bottinger EP**, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*. 1997;51(5):1355-60.
- Bradham DM**, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*. 1991;114(6):1285-94.
- Breyer MD**, Bottinger E, Brosius FC, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):27-45.
- Brown CB**, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. 1999;283(5410):2080-2.

Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors*. 1990;3(1):35-43.

Cheifetz S, Andres JL, Massague J. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem*. 1988;263(32):16984-91

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19027-30.

Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J. Distinct transforming growth factor-beta (TGF- β) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J Biol Chem*. 1990;265(33):20533-8.

Cheifetz S, Massague J. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem*. 1991;266(31):20767-72.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996;84(3):491-5.

Chen S, Iglesias-de la Cruz MC, Jim B, Hong SW, Isono M, Ziyadeh FN. Reversibility of established diabetic glomerulopathy by anti-TGF- β antibodies in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300(1):16-22.

Choi ME, Liu A, Ballermann BJ. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors in rat kidney development. *Am J Physiol*. 1997;273:F386-95.

Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30(3):293-8.

Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW. Increased urinary type IV collagen marks the development of glomerular pathology in diabetic d/db mice. *Metabolism*. 2001;50(12):1435-40. **Cohen MP**, Sharma K, Jin Y, Hud E, Wu VY, Tomaszewski J, Ziyadeh FN. Prevention of diabetic nephropathy in db/db mice with glycosylated albumin antagonists. A novel treatment strategy. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2338-45.

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 1998;93(7):1159-70.

DeGroot J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(3):301-5.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*. 1985;316(6030):701-5.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.

Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):410-21.

Di Paolo S, Gesualdo L, Ranieri E, Grandaliano G, Schena FP. High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor-beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cells. *Am J Pathol*. 1996;149(6):2095-106.

Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. 1995;270(18):10618-24.

Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*. 2002;13(3):902-14.

Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG. Betaglycan inhibits TGF- β signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem*. 2002;277(1):823-9.

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37413-20.

Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, Lopez-Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14588-96.

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int*. 1999;56(4):1455-67.

Fogo AB. Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol*. 1999;7(2):147-59.

Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, Cooper ME. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J*. 2003;17(12):1762-4.

Freedman BI, Spray BJ, Tuttle AB, Buckalew VM Jr. The familial risk of end-stage renal disease in African Americans. *Am J Kidney Dis*. 1993;21(4):387-93.

Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet*. 1986;12(3):281-8

Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, Okuda S. AGEs activate mesangial TGF- β -Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int*. 2004;66(6):2137-47.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003;200(4):500-3.

Gamble JR, Vadas MA. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol*. 1991;146(4):1149-54.

Garcia-Sainz JA, Vilchis-Landeros MM, Juarez P, Lopez-Casillas F, Hernandez-Pando R, Massague J. Receptors and functions of TGF- β , a crucial cytokine in wound healing. *Gac Med Mex*. 2003 Mar-Apr;139(2):126-43.

Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Rossiello MR, Colucci M, Semeraro N, Grandaliano G, Schena FP, Ursi M, Cerullo G. Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1999;56(2):461-70.

Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes.* 1998;47(3):414-22.

Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes.* 1998;47(3):414-22.

Gnudi L, Viberti G, Raij L, Rodriguez V, Burt D, Cortes P, Hartley B, Thomas S, Maestrini S, Gruden G. GLUT-1 overexpression: Link between hemodynamic and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension.* 2003;42(1):19-24.

Gobe GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest.* 1987;56(3):273-81.

Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF- β) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 1999;10(4):303-60.

Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999;59(2):320-4.

Griswold-Prenner I, Kamibayashi C, Maruoka EM, Mumby MC, Derynck R. Physical and functional interactions between type I transforming growth factor beta receptors and Balpa, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol Cell Biol.* 1998;18(11):6595-604.

Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(3):171-9.

Gruden G, Thomas S, Burt D, Lane S, Chusney G, Sacks S, Viberti G. Related Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells: mechanisms of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(22):12112-6.

Guh JY, Yang ML, Yang YL, Chang CC, Chuang LY. Captopril reverses high-glucose-induced growth effects on LLC-PK1 cells partly by decreasing transforming growth factor-beta receptor protein expressions. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(8):1207-15.

Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD. Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res.* 1997;57(9):1735-42.

Guyton AC y Hall JE. Los riñones y los líquidos corporales en *El tratado de Fisiología Médica*. McGraw-Hill-Interamericana. Décima edición, 2001.

Han DC, Isono M, Chen S, Casaretto A, Hong SW, Wolf G, Ziyadeh FN. Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF- β type II receptor expression. *Kidney Int.* 2001;59(4):1315-23.

Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 1998;12(2):186-97.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell.* 1997;89(7):1165-73.

Heilig CW, Liu Y, England RL, Freytag SO, Gilbert JD, Heilig KO, Zhu M, Concepcion LA, Brosius FC. 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;46(6):1030-9.

Heino J, Massague J. Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem.* 1989;264(36):21806-11.

Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1997;90(4):607-17.

Hernandez-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, Aguilar-Leon D, Vilchis-Landeros MM, Mata-Espinosa DA, Mendoza V, Lopez-Casillas F. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2006;144(2):264-72.

Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, Sheppard MC, Logan A. The renal expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology.* 2000;141(3):1196-208.

Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1999;4(4):1157-91.

Howell M, Itoh F, Pierreux CE, Valgeirsdottir S, Itoh S, ten Dijke P, Hill CS. Xenopus Smad4beta is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes. *Dev Biol.* 1999;214(2):354-69.

Hugo CP, Pichler RP, Schulze-Lohoff E, Prols F, Adler S, Krutzsch HC, Murphy-Ullrich JE, Couser WG, Roberts DD, Johnson RJ. Thrombospondin peptides are potent inhibitors of mesangial and glomerular endothelial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 1999;55(6):2236-49.

Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol.* 1996;106(4):729-33.

Inoki K, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R. TGF- β 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 1999;55(5):1704-12.

Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*. 1996;272(5262):728-31.

Jacobsen P, Rossing K, Parving HH. Single versus dual blockade of the renin-angiotensin system (angiotensin-converting enzyme inhibitors and/or angiotensin II receptor blockers) in diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(3):319-24.

Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*. 1995;11(4):415-21.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2431-7.

Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 ;13(3):806-16.

Kelly DJ, Cox AJ, Tolcos M, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE. Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-angiotensin system in diabetic Ren-2 rats. *Kidney Int*. 2002;61(1):31-9.

Kelly FJ, Anderson S, Thompson MM, Oyama TT, Kennefick TM, Corless CL, Roman RJ, Kurtzberg L, Pratt BM, Ledbetter SR. Acute and chronic renal effects of recombinant human TGF- β 2 in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(6):1264-73.

Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, Sugimoto T, Yasuda H, Kashiwagi A, Ways DK, King GL, Kikkawa R. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J*. 2000;14(3):439-47.

Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest*. 1997;100(1):115-26.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66.

Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int*. 1998;54(3):687-97.

Kulkarni AB, Ward JM, Yaswen L, Mackall CL, Bauer SR, Huh CG, Gress RE, Karlsson S. Transforming growth factor-b1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am J Pathol*. 1995;146(1):264-75.

Lacourciere Y, Belanger A, Godin C, Halle JP, Ross S, Wright N, Marion J. Long-term comparison of losartan and enalapril on kidney function in hypertensive type 2 diabetics with early nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58(2):762-9.

Lahera V, Cachofeiro V, Balfagon G, Rodicio JL. Aldosterone and its blockade: a cardiovascular and renal perspective. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:413-24.

Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B, Lanzendorfer M, Melzig J, Moschen I, Steuer S, Waldegger S, Sauter M, Paulmichl M, Gerke V, Rislis T, Gamba G, Capasso G, Kandolf R, Hebert SC, Massry SG, Broer S. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(14):8157-62.

Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J Cell Biol*. 1996;133(5):1109-21.

Lawrence DA, Pircher R, Jullien P. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Dec 31;133(3):1026-34.

Leask A, Abraham DJ, Finlay DR, Holmes A, Pennington D, Shi-Wen X, Chen Y, Venstrom K, Dou X, Ponticos M, Black C, Bernabeu C, Jackman JK, Findell PR, Connolly MK. Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1857-65. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2830.

Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816-27.

Lee SM, Bressler R. Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse. *Diabetes*. 1981;30(2):106-11

LeRoy EC, Trojanowska MI, Smith EA. Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw*. 1990;1(4):215-9.

Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 2000;404(6776):411-4.

Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg*. 1995;222(2):146-54.

Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1998;283:2-37.

Liu B, Dou CL, Prabhu L, Lai E. FAST-2 is a mammalian winged-helix protein which mediates transforming growth factor beta signals. *Mol Cell Biol*. 1999;19(1):424-30.

Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(1):1-12.

Lo RS, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massague J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF- β receptors. *EMBO J*. 1998;17(4):996-1005.

Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*. 1991 Nov 15;67(4):785-95.

Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol*. 1994;124(4):557-68.

Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*. 1988 May;106(5):1659-65.

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell*. 1993;73(7):1435-44.

Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol*. 1983;97(1):153-65.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000;103(2):295-309.

Massague J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev*. 2000;14(6):627-44.

Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19(8):1745-54.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.

Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.

McAllister KA, Baldwin MA, Thukkani AK, Gallione CJ, Berg JN, Porteous ME, Guttmacher AE, Marchuk DA. Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet*. 1995;4(10):1983-5.

McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*. 1993 May 7;73(3):421-4.

Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2000;58(6):2301-13.

Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem*. 1988;263(13):6407-15.

Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*. 1993;8(1):11-22.

Montesano R, Orci L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(13):4894-7.

Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res*. 1981;41(7):2842-8.

Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(1):26-9.

Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11(1-2):59-69.

Nakamura T, Obata J, Kimura H, Ohno S, Yoshida Y, Kawachi H, Shimizu F. Blocking angiotensin II ameliorates proteinuria and glomerular lesions in progressive mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1999;55(3):877-89.

Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 1999;104(1):5-11.

O'Connor-McCourt MD, Wakefield LM. Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem*. 1981;256(1):1-5.

Oft M, Heider KH, Beug H. TGF- β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*. 1998;8(23):1243-52.

Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Invest Med*. 1997;45(2):50-6.

Pandit A, Ashar R, Feldman D. The effect of TGF- β delivered through a collagen scaffold on wound healing. *J Invest Surg*. 1999;12(2):89-100.

Pearce D, Verrey F, Chen SY, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Bhargava A. Role of SGK in mineralocorticoid-regulated sodium transport. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1283-9.

Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14595-600.

Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M. TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev*. 2000;14(24):3093-101.

Querfeld C, Eckes B, Huerkamp C, Krieg T, Sollberg S. Expression of TGF- β 1, - β 2 and - β 3 in localized and systemic scleroderma. *J Dermatol Sci*. 1999;21(1):13-22.

Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2002;106(2):257-66.

Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7667-9.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. El riñón en *Patología estructural y funcional*. McGraw-Hill-Interamericana. 5ª. Edición, 1996.

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5339-43.

Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S294-300.

Ruggenti P, Remuzzi G. The diagnosis of renal involvement in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997;6(2):141-5.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A LaboE-Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp 7–7.15

Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):2572-6.

Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGF- β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF-b knockout phenotypes. *Development*. 1997;124(13):2659-70.

Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP. Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7. *J Clin Invest*. 2001;108(6):807-16.

Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol*. 1998;152(2):485-93.

Segarini PR, Roberts AB, Rosen DM, Seyedin SM. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1987;262(30):14655-62.

Segarini PR, Rosen DM, Seyedin SM. Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type. *Mol Endocrinol*. 1989;3(2):261-72.

Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J. TGF- β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*. 2001;(4):400-8.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995;108:985-1002.

Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1994;46(2):430-42.

Sharma K, Considine RV, Michael B, Dunn SR, Weisberg LS, Kurnik BR, Kurnik PB, O'Connor J, Sinha M, Caro JF. Plasma leptin is partly cleared by the kidney and is elevated in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1997;51(6):1980-5.

Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes*. 1996;45(4):522-30.

Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(6):F1138-44

Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF- β 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol*. 1994;267:F1094-01.

Shen X, Hu PP, Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Wang XF. TGF- β -induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Mol Biol Cell*. 1998;9(12):3309-19.

Shi Y, Massague J. Abstract Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685-700.

Shovlin CL. Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):145-50.

Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Moren A, Heldin CH, Christian JL, ten Dijke P. Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 1998;273(39):25364-70.

Sporn MB, Roberts AB. The transforming growth factor-betas: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;593:1-6.

Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4371-85.

Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism*. 1997;46(8):918-25.

Sugaru E, Nakagawa T, Ono-Kishino M, Nagamine J, Tokunaga T, Kitoh M, Hume WE, Nagata R, Taiji M. Enhanced effect of combined treatment with SMP-534 (antifibrotic agent) and losartan in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2006;26(1):50-8.

Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39919-25.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.

Ueno M, Kawashima S, Nishi S, Shimada H, Karasawa R, Suzuki Y, Maruyama Y, Arakawa M. Tubulointerstitial lesions in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int Suppl*. 1997;63:S191-4.

Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*. 1996;382(6588):275-8.

Velasco-Loyden G, Arribas J, Lopez-Casillas F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7721-33.

Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J*. 2001;355(Pt 1):215-22.

Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, de Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O, Capella G. Disruption of the antiproliferative TGF- β signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 1998;17(15):1969-78.

Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002;251(2):87-101.

Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RM. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J.* 2001;359:77-87.

Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, Lang F. h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology.* 1999;116(5):1081-8.

Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology.* 2005;10(1):48-56.

Wiater E, Harrison CA, Lewis KA, Gray PC, Vale WW. Identification of distinct inhibin and TGFbeta binding sites on betaglycan: Functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J Biol Chem.* 2006

Wiater E, Vale W. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278(10):7934-41.

Winearls CG. Renal Failure. *Encyclopedia of life Sciences.* Nature. Publishing group. 2001:1-7.

Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep.* 2000 Apr;2(2):167-73.

Wolf G, Chen S, Han DC, Ziyadeh FN. Leptin and renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(1):1-11.

Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RA. Leptin stimulates proliferation and TGF- β expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1999;56(3):860-72.

Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1999;56(2):393-405.

Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis.* 1997;29(1):153-63.

Wu RY, Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2521-8.

Wu X, Monnier VM. Enzymatic deglycation of proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):16-24.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Free in PMC Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(5):1814-8.

Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 1996 Feb;49(2):461-9.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 1990;346(6281):281-4.

Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1994;269(3):1995-2001.

Yang CW, Hattori M, Vlassara H, He CJ, Carome MA, Yamato E, Elliot S, Striker GE, Striker LJ. 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;5(8):1610-7.

Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MW, Brunner G. Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay. *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):105-11.

Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-b responses. *EMBO J.* 2002;21(14):3749-59.

Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* 2003 Sep;64(3):844-56.

Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol.* 2000;142:125-31.

Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G, Bressan GM. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell.* 2006 Mar 10;124(5):929-42.

Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Bottinger. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6686-91.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.

Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. 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;97(14):8015-20.

Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest.* 1994;93(2):536-42.

Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP. High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol.* 1990;259:F704-14.