



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

-TESIS DOCTORAL-

Efecto protector de la cardiotrofina-1 en la
fibrosis tubulointersticial y glomerulonefritis

Memoria presentada por **Nuria Perretta Tejedor**

para optar al Grado de Doctor

por la Universidad de Salamanca.

Mención “Doctorado Internacional”

Nuria Perretta Tejedor
Salamanca a 7 de junio de 2017

LA DOCTORA DÑA **MARÍA JESÚS MONTE RÍO**, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por la Graduada en Farmacia Dña. **Nuria Perretta Tejedor** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título **“Efecto protector de la cardiotrofina-1 en la fibrosis tubulointersticial y glomerulonefritis”** ha sido realizado bajo la dirección del Doctor D. Carlos Martínez Salgado, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Salamanca, a 7 de junio de 2017.

Dra. Dña. María Jesús Monte Río

EL DOCTOR D. **CARLOS MARTÍNEZ SALGADO**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA (IBSAL) Y PROFESOR DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (USAL)

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado “**Efecto protector de la cardiotrofina-1 en la fibrosis tubulointersticial y glomerulonefritis**” presentado por la Graduada en Farmacia Dña. Nuria Perretta Tejedor, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, considera que cumple las condiciones necesarias y autoriza su presentación con el fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado, en Salamanca, a 7 de junio de 2017.

Dr. D. Carlos Martínez Salgado

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes organismos:

- Fundación Mutua Madrileña, IX Convocatoria de Becas y Ayudas a la Investigación Médica
- Instituto de Salud Carlos III, expediente PI12/00959
- Junta de Castilla y León (Consejería de Sanidad), expte. BIO/SA87/13
- Instituto de Salud Carlos III, expediente PI15/01055

La doctoranda ha sido financiada por un Contrato de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU), de la Junta de Castilla y León. (**Órden EDU/1084/2012 de 17 de diciembre**) y por una ayuda de la European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (*ERA-EDTA Young fellowship programme*) durante su estancia en Londres.

Índices

ÍNDICES	I
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XIII
ABREVIATURAS	XV
INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad renal crónica	3
1.1. Definición y epidemiología	3
1.2. Fases de la ERC	4
1.3. Etiopatogenia y fisiopatología de la ERC	5
2. Fibrosis renal	8
2.1. Generalidades de la fibrosis	8
2.2. Fibrosis renal. Mecanismos que la desencadenan	9
2.3. Fibrosis tubulointersticial. Daño inicial y activación celular	9
2.4. Fibrosis tubulointersticial. Principales mecanismos implicados	11
2.4.1. Células inflamatorias	11
2.4.2. Epitelio tubular	11
2.4.3. Matriz extracelular	13
2.4.4. Fibroblastos y miofibroblastos	14
2.4.5. Microvasculatura	15
2.5. Principales citoquinas y otros factores implicados en la fibrosis renal	15
2.6. Perspectivas terapéuticas de la fibrosis renal y líneas de investigación actuales ...	22
3. Enfermedades glomerulares	23
3.1. Alteraciones histopatológicas, y mecanismos implicados en el daño glomerular ..	23
3.2. Células implicadas en el desarrollo de las glomerulopatías	25
3.2.1. Células mesangiales	25
3.2.2. Células parietales epiteliales de la cápsula de Bowman	26

3.2.3.	Podocitos	26
3.2.4.	Células endoteliales glomerulares	28
3.3.	Membrana basal glomerular	28
3.4.	Glomerulopatías primarias o glomerulonefritis	29
3.4.1.	Glomerulonefritis extracapilares	31
3.5.	Perspectivas terapéuticas de las enfermedades glomerulares y líneas de investigación actuales	32
4.	Cardiotrofina-1 (CT-1).....	33
4.1.	Expresión y estructura molecular	33
4.2.	Complejo receptor de CT-1	34
4.2.1.	Activación del complejo receptor	36
4.3.	Vías de señalización y su implicación	37
4.4.	Efectos de la cardiotrofina-1.....	42
4.4.1.	Principales mecanismos protectores de la CT-1.....	42
4.4.2.	Efectos de la CT-1 en el sistema cardiovascular	44
4.4.3.	Efectos de la CT-1 en el hígado.....	47
4.4.4.	Efecto de la CT-1 en el sistema nervioso	48
4.4.5.	Efectos de la CT-1 en el riñón	49
4.4.6.	Efectos de la CT-1 en otros órganos	50
4.4.7.	Otros factores que regulan la expresión de CT-1	52
	OBJETIVOS	55
	MÉTODOS	59
1.	Materiales.....	61
2.	Ratones homocigotos de CT-1	61
2.1.	Mantenimiento y manipulación de los animales	61
2.2.	Genotipado de los ratones	62
3.	Técnicas experimentales <i>in vivo</i>	63

3.1.	Obstrucción ureteral unilateral (OUU).....	63
3.1.1.	Técnica quirúrgica	63
3.1.2.	Diseño experimental	64
3.2.	Glomerulonefritis inducida por suero nefrotóxico (SNT).....	69
3.2.1.	Técnica experimental	70
3.2.2.	Diseño experimental	70
3.3.	Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas	72
3.4.	Recogida de sangre y plasma	72
3.5.	Perfusión y recogida de órganos	73
4.	Determinaciones bioquímicas.....	73
4.1.	Determinación de la creatinina plasmática y en orina	73
4.2.	Determinación de la urea plasmática	74
5.	Estudio histológico	74
5.1.	Tinción hematoxilina-eosina (HE).....	75
5.2.	Tinción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS)	76
5.3.	Tinción de Rojo Sirio	76
5.4.	Tinción con tricrómico de Masson.....	77
5.5.	Inmunohistoquímica	77
5.6.	Inmunofluorescencia	79
5.7.	TUNEL.....	81
6.	Técnica de ELISA.....	81
7.	Análisis de la expresión de colágeno total.....	82
8.	Métodos de cultivo de celular.....	82
8.1.	Cultivo primario de miofibroblastos renales de ratón.....	82
8.2.	Cultivo primario de células epiteliales de túbulo proximal de ratón.....	85
8.3.	Cultivo primario de podocitos glomerulares.....	87

8.4.	Línea celular inmortalizada de podocitos de ratón	90
8.5.	Técnicas básicas de cultivos celulares.....	91
8.5.1.	Recuento celular	91
8.5.2.	Tripsinización celular.....	91
8.5.3.	Congelación y descongelación de las células.....	92
8.6.	Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia de células en cultivo	92
8.7.	Silenciamiento génico mediante transfección con ARNsi	94
8.8.	Ensayo de hipertrofia celular	94
8.8.1.	Cociente proteína/ADN	95
8.8.2.	Inmunofluorescencia de faloidina.....	95
8.9.	Ensayos de proliferación celular.....	96
8.10.	Ensayo de migración mediante cierre de herida o scratch	97
8.11.	Estudio de la morfología del citoesqueleto de podocitos	98
8.11.1.	Ensayo de actividad de RhoA y Cdc42.....	99
9.	Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot	100
9.1.	Obtención de extractos de proteínas de tejidos y células	100
9.2.	Determinación de la concentración de proteínas	101
9.3.	Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	101
9.4.	Bloqueo e incubación con los anticuerpos.....	102
9.5.	Revelado.....	104
10.	Análisis de la actividad enzimática de metaloproteasas de matriz mediante zimograma	104
11.	Análisis del nivel de expresión génica por qPCR	106
11.1.	Extracción de ARN de tejido	106
11.2.	Extracción de ARN de células en cultivo.....	106
11.3.	Obtención de ADNc.....	107
11.4.	Diseño de cebadores	107

11.5.	PCR cuantitativa, qPCR o PCR a tiempo real.....	109
12.	Tratamiento de los datos y análisis estadístico.....	110
	RESULTADOS	117
1.	Expresión de cardiotrofina-1 y sus receptores (GP130 y LIFR) en riñón de ratones.....	119
2.	Papel de la CT-1 endógena en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial.....	119
2.1.	Papel de la CT-1 endógena en la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de OUU..	120
2.2.	Papel de la CT-1 endógena en las fases tempranas del daño tubulointersticial ...	128
3.	Efecto de la administración de CT-1 en la fibrosis tubulointersticial	139
3.1.	Efecto del tratamiento con CT-1 en animales CT-1 ^{+/+}	139
3.1.1.	Efecto del tratamiento con CT-1 en la fibrosis tubulointersticial	139
3.1.2.	Efecto del tratamiento con CT-1 en las fases tempranas del daño tubulointersticial	141
3.2.	Efecto de la administración de CT-1 en ratones CT-1 ^{-/-}	148
3.2.1.	Efecto de la administración de CT-1 en la fibrosis tubulointersticial.....	148
3.2.2.	Efecto de la administración de CT-1 en las fases tempranas del daño tubulointersticial	152
4.	Papel de la CT-1 en miofibroblastos de cultivo primario.....	160
4.1.	Expresión de CT-1, GP130 y LIFR	160
4.2.	Vías de señalización activadas por CT-1.....	162
4.3.	Papel de la CT-1 en la síntesis de proteínas de MEC	163
4.4.	Papel de la CT-1 en la migración celular	165
4.5.	Papel de la CT-1 en la proliferación celular	167
5.	Papel de la CT-1 en células epiteliales tubulares	168
5.1.	Expresión de CT-1, GP130 y LIFR	168
5.2.	Vías de señalización activadas por CT-1.....	170
5.3.	Papel de la CT-1 en la hipertrofia celular	171
5.4.	Papel de la CT-1 en la proliferación celular.....	175

6. CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis.....	177
6.1. Expresión de CT-1 y sus receptores en la glomerulonefritis experimental.....	177
6.2. Efecto del tratamiento con CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis.....	181
7. Papel de la CT-1 en podocitos	189
7.1. Expresión de CT-1 y sus receptores en podocitos	189
7.2. Efecto de la ausencia de CT-1 en la migración, proliferación celular y morfología del citoesqueleto de los podocitos	191
7.3. Efecto de la estimulación con CT-1 en la migración, proliferación celular y morfología del citoesqueleto de los podocitos.....	196
DISCUSIÓN	201
1. CT-1 en la fibrosis tubulointersticial	203
2. CT-1 en la hipertrofia de células epiteliales tubulares en cultivo	212
3. CT-1 en la glomerulonefritis.....	213
CONCLUSIONES	219
CONCLUSIONS	223
BIBLIOGRAFÍA.....	227
SUMMARY.....	257

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción esquemática del proceso patológico de la degeneración tubular y la fibrosis tubulointersticial	10
Figura 2. Representación esquemática del proceso de degeneración glomerular y esclerosis en las glomerulopatías	23
Figura 3. Estructura normal de un glomérulo y sus principales componentes	25
Figura 4. Unión de la CT-1 a un complejo trimérico de receptores que activa la cascada de señalización formado por los receptores GP130, CT-1R α y LIFR β	35
Figura 5. Vías de señalización intracelulares activadas por la CT-1	38
Figura 6. Principales efectos producidos por la activación de las vías de señalización de la CT-1	41
Figura 7. Vías de señalización mediante las cuales la CT-1 podría llevar a cabo sus efectos en hipertrofia y supervivencia.....	47
Figura 8. Genotipado de los ratones.....	63
Figura 9. Esquema diseño experimental 1	65
Figura 10. Esquema diseño experimental 2	65
Figura 11. Esquema diseño experimental 3	66
Figura 12. Esquema diseño experimental 4	67
Figura 13. Esquema diseño experimental 5	68
Figura 14. Esquema diseño experimental 6	69
Figura 15. Esquema diseño experimental 1 modelo glomerulonefritis	71
Figura 16. Esquema diseño experimental 2 modelo glomerulonefritis.....	72
Figura 17. Imágenes representativas de los distintos scores de la tinción inmunohistoquímica de cardiotrofina-1.....	79
Figura 18. Miofibroblastos renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-} en cultivo	84
Figura 19. Expresión de α -SMA en miofibroblastos renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-}	85
Figura 20. Células epiteliales tubulares renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-} en cultivo	86
Figura 21. Expresión de pancitoqueratina y e-cadherina en células epiteliales tubulares CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-}	87
Figura 22. Glomérulos en cultivo.....	89
Figura 23. Expresión de nestina y nefrina en podocitos glomerulares en cultivo primario	89
Figura 24. Podocitos inmortalizados en cultivo	91
Figura 25. Distribución de filamentos de actina en podocitos maduros inmortalizados.....	98

Figura 26. Expresión de cardiotrofina-1 y sus receptores en riñones de ratones	119
Figura 27. Expresión de CT-1 en riñones de ratones CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-}	120
Figura 28. Análisis de la expresión de CT-1 en riñones NO y O de ratones CT-1 ^{+/+} tras 15 días de obstrucción.....	121
Figura 29. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina en riñones NO y riñones O de ratones CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-} tras 15 días de obstrucción	122
Figura 30. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial mediante tinción con Rojo Sirio tras 15 días de obstrucción	123
Figura 31. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción	124
Figura 32. Análisis de la expresión de proteínas características de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción.	125
Figura 33. Análisis de la expresión de p-STAT3 tras 15 días de obstrucción	126
Figura 34. Análisis de la expresión de p-STAT3 y de la actividad de la MMP2 tras 15 días de obstrucción.....	127
Figura 35. Análisis de la expresión de LIFR y de GP130 tras 3 días de obstrucción	128
Figura 36. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción	129
Figura 37. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción.....	131
Figura 38. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción	132
Figura 39. Análisis de la expresión de p-STAT3 tras 3 días de obstrucción.....	133
Figura 40. Análisis de la expresión de α -SMA y vimentina tras 3 días de obstrucción	134
Figura 41. Análisis de la expresión de ARNm de Cd68 tras 3 días de obstrucción	135
Figura 42. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión, COX-2 y activación de NF- κ B tras 3 días de obstrucción	137
Figura 43. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de obstrucción	138
Figura 44. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción	140
Figura 45. Análisis de la expresión de fibronectina y CTGF tras 15 días de obstrucción	141
Figura 46. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción	142
Figura 47. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción.....	143
Figura 48. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción	144
Figura 49. Análisis de la expresión de α -SMA, PCNA y vimentina tras 3 días de obstrucción .	145
Figura 50. Análisis de la expresión de ARNm de Cd68 e IL-1 β tras 3 días de obstrucción	146
Figura 51. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión, COX-2 y activación de NF- κ B tras 3 días de obstrucción	147
Figura 52. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de obstrucción	148

Figura 53. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción	149
Figura 54. Análisis de la expresión de colágeno I, fibronectina y CTGF tras 15 días de obstrucción	150
Figura 55. Análisis de la expresión de α -SMA y PCNA tras 15 días de obstrucción	151
Figura 56. Análisis de la expresión de vimentina tras 15 días de obstrucción	152
Figura 57. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción	153
Figura 58. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción.....	154
Figura 59. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción	155
Figura 60. Análisis de la expresión de α -SMA y vimentina tras 3 días de obstrucción	156
Figura 61. Análisis de la expresión de marcadores de inflamación tras 3 días de obstrucción	157
Figura 62. Análisis de la expresión de VCAM-1, I κ B- α y COX-2 tras 3 días de obstrucción.....	158
Figura 63. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de OUU	159
Figura 64. Análisis de la expresión de CT-1, GP130 y LIFR en miofibroblastos renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-}	161
Figura 65. Análisis de la activación de vías de señalización intracelular	162
Figura 66. Análisis de la expresión de CT-1	163
Figura 67. Análisis de la expresión de proteínas de MEC y de la activación de NF- κ B	164
Figura 68. Migración de miofibroblastos renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-} en el ensayo de cierre de herida	166
Figura 69. Cuantificación de la migración celular en el ensayo de cierre de herida	167
Figura 70. Análisis de la proliferación celular	168
Figura 71. Análisis de la expresión de CT-1, GP130 y LIFR en células epiteliales tubulares renales CT-1 ^{+/+} y CT-1 ^{-/-}	169
Figura 72. Análisis de la activación de vías de señalización intracelular	170
Figura 73. Análisis de la hipertrofia celular mediante inmunofluorescencia con faloidina	172
Figura 74. Análisis de la hipertrofia celular mediante el cociente proteína/ADN	173
Figura 75. Análisis de la expresión de p-STAT3	174
Figura 76. Análisis de la hipertrofia celular mediante inmunofluorescencia con faloidina	175
Figura 77. Análisis de la proliferación celular	176
Figura 78. Análisis de la proliferación celular	176
Figura 79. Imágenes representativas de la tinción con PAS.....	178
Figura 80. Análisis de la función renal	179
Figura 81. Análisis de la expresión de CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis	180

Figura 82. Análisis de la expresión de ARNm de GP130 y LIFR 21 días tras la administración de SNT	181
Figura 83. Análisis de la albuminuria tras administración de SNT	182
Figura 84. Análisis de la creatinina plasmática tras administración de SNT	182
Figura 85. Análisis del aclaramiento de creatinina (A) y de los compuestos nitrogenados en sangre (B)	183
Figura 86. Análisis de la inflamación en la glomerulonefritis nefrotóxica	184
Figura 87. Análisis del grado de fibrosis renal	185
Figura 88. Análisis de la expresión de colágeno IV	186
Figura 89. Análisis de la expresión de α -SMA	186
Figura 90. Análisis de la distribución de podocitos	188
Figura 91. Expresión de CT-1 en glomérulos de ratones controles	189
Figura 92. Análisis de la expresión de GP130, LIFR y CT-1 en podocitos glomerulares maduros en cultivo primario	190
Figura 93. Análisis de la expresión de GP130, LIFR y CT-1 en podocitos inmortalizados.....	191
Figura 94. Análisis de la expresión de CT-1	192
Figura 95. Análisis de la migración celular en el ensayo de cierre de herida	193
Figura 96. Análisis de la proliferación celular	194
Figura 97. Análisis de la morfología del citoesqueleto	195
Figura 98. Cuantificación de la actividad de RhoA (A) y Cdc42 (B)	196
Figura 99. Cuantificación de migración celular en el ensayo de cierre de herida	197
Figura 100. Análisis de la proliferación celular	197
Figura 101. Análisis de la morfología del citoesqueleto	198
Figura 102. Cuantificación de la actividad de RhoA (A) y Cdc42 (B)	199
Figura 103. Esquema del papel de la CT-1 en la fibrosis tubulointersticial tras la OUU	211

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación etiológica, histológica y clínica de las glomerulonefritis.....	30
Tabla 2. Cebadores para genotipado y condiciones de PCR	62
Tabla 3. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.....	78
Tabla 4. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia de tejido	80
Tabla 5. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia en células en cultivo	93
Tabla 6. Condiciones de los anticuerpos utilizados para western blot	102
Tabla 7. Cebadores de diseño propio y condiciones de PCR.....	108
Tabla 8. Relación de productos y reactivos utilizados	111
Tabla 9. Relación de equipos y aparatos utilizados	114
Tabla 10. Relación de programas y softwares informáticos utilizados	115

Abreviaturas

GLOSARIO DE ABREVIATURAS**A**

AcM	Anticuerpo monoclonal
AcP	Anticuerpo policlonal
ACF	Adyuvante completo de Freud
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKT	Proteína quinasa B (<i>Serine/threonine kinase 1</i>)
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (<i>Protein kinase AMP-activated</i>)
ANGPTs	Angiopietinas

B

Bad	<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i>
Bcl-2	Célula B leucemia/linfoma 2 (<i>B cell leukemia/lymphoma 2</i>)
Bcl-xl	Célula B linfoma extra grande (<i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BMP7	Proteína morfogenética ósea-7 (<i>Bone morphogenetic protein 7</i>)
BMPRI	Receptor de BMPs de tipo I
BMPRII	Receptor de BMPs de tipo II
BUN	Compuestos nitrogenados en sangre (<i>Blood urea nitrogen</i>)

C

CT-1	Cardiotrofina-1
CEM	Comunicación epitelio-mesenquimal
CHR	Regiones homólogas de unión a la citoquina
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CSF-1	Factor estimulante de colonias (<i>Colony stimulating factor 1</i>)
CT-1R α	Subunidad alfa del receptor CT-1

CTGF Factor de crecimiento del tejido conectivo (*Connective tissue growth factor*)

D

DMEM *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetil sulfóxido

DTT Ditioneitol

E

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EGF Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*)

ELISA Ensayo de inmunoabsorción enzimática (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

EMA Agencia Europea de Medicina (*European Medicine Agency*)

ERC Enfermedad renal crónica

ERK Proteína quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular-signal-regulated Kinase*)

FasL Fas ligando

F

FDA Agencia del control de fármacos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*)

FGF-2 Factor de crecimiento de fibroblastos-2 (*Fibroblast growth factor 2*)

FNIII Fibronectina tipo III

G

GN Glomerulonefritis

GP130 Glicoproteína 130

GP190 Glicoproteína 190

H

HE Hematoxilina-eosina

HGF Factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte growth factor*)

Hprt *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.*

HRP Peroxidasa de rábano picante (*Horseadish peroxidase*)

Hsp Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)

I

i.v. Vía intravenosa

ICAM-1 Molécula de adhesión intracelular-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*)

IFN- γ Interferón gamma

Ig Inmunoglobulina

IGF-1 Factor de crecimiento insulínico-1 (*Insulin like growth factor 1*)

IL Interleuquina

iNOS Óxido nítrico sintasa inducible (*Inducible nitric oxide synthase*)

ITS Insulina-Transferrina-Selenio

J

JAKS Janus quinasa

K

kb Kilobase

kDa Kilodalton

L

LIF factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia inhibitory factor*)

LIFR Receptor de LIF

LPS Lipopolisacáridos

M

MAP Proteínas asociadas a microtúbulos (*Microtubule associated proteins*)

MAPK Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen activated kinase-like protein*)

MCP1	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MEC	Matriz extracelular
MEK	MAP quinasa de ERK1/2 (<i>MAP kinase-ERK kinase</i>)
MMPs	Metaloproteasas de matriz
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (<i>Manganese superoxide dismutase</i>)

N

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAG	N-acetilglucosaminidasa
NF-IL6	Factor nuclear IL-6
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear- κ B
NO	No obstruido
Nphs1	Nefrina

O

O	Obstruido
OUU	Obstrucción ureteral unilateral

P

p.c.	Peso corporal
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAS	Ácido peryódico de Schiff
pb	Pares de bases
PBS	Salino con tampón fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Antígeno de proliferación celular (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)

PDGFR- α	Cadena alfa del receptor de PDGF
PDGFR- β	Cadena beta del receptor de PDGF
PFA	Paraformaldehido
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa (<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PIAS	Proteína inhibidora de las STATs (<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PTPs	Proteína fosfatasa de residuos tirosina (<i>Protein tyrosine phosphatases</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)

R

RIPK1	Receptor interactivo serina/treonina proteína quinasa 1 (<i>Receptor interacting serine/threonine protein kinase 1</i>)
RIPK2	Receptor interactivo serina/treonina proteína quinasa 2 (<i>Receptor interacting serine/threonine protein kinase 2</i>)
RLO	Radicales libres de oxígeno
rps13	Proteína ribosomal S13 (<i>Ribosomal protein S13</i>)
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)

S

s.c.	Subcutáneo
SBF	Suero bobino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	Servicio de Experimentación Animal
Ser	Aminoácido serina
SNT	Suero nefrotóxico
SOCS	Supresores de señalización de citoquinas
STATs	Transductor de señal y activador de transcripción (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>)

T

TEM	Transición epitelio mesénquima
TEMED	Tetrametiletilendiamina (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
TFG	Tasa de filtración glomerular
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta-1 (<i>Transforming growth factor β-1</i>)
TIMP-1	Inhibidor de MMP1
TM	Transmembrana
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>)

V

VCAM-1	Molécula de adhesión vascular -1 (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-1	Integrina alfa-1 (<i>Integrin subunit alpha 1</i>)
VLA-5	Integrina alfa-5 (<i>Integrin subunit alpha 5</i>)

W

WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>
-----	----------------------

Z

ZO-1	Zonula occludens-1
α -SMA	Actina de músculo liso vascular (<i>α Smooth Muscle Actin</i>)

Introducción

1. Enfermedad renal crónica

1.1. Definición y epidemiología

La enfermedad renal crónica (ERC) engloba una serie de afecciones en la que la estructura del riñón y su función excretora se encuentran dañadas de una manera crónica, progresiva e irreversible, dando lugar al “estadio final de la enfermedad renal crónica” siendo necesaria una terapia renal sustitutiva (diálisis o trasplante renal) (Remuzzi et al, 2006).

La ERC según las guías internacionales está definida como la disminución de la función renal, esto es, como una tasa de filtración glomerular (TFG) inferior a 60 mL/min/1,73 m², o por la presencia de un marcador de daño renal (albuminuria, sedimento urinario anormal, anomalías en la estructura renal o historia de trasplante renal) o ambos durante al menos 3 meses. Cuando la tasa de filtración glomerular es menor que 15 mL/min/1,73 m² se ha alcanzado el “estadio final de la enfermedad renal crónica”, ya que este grado de función renal es difícilmente compatible con la vida (Stevens & Levin, 2013).

La importancia de esta enfermedad reside en su alta prevalencia, la cual se estima entorno al 11% en los países de “altos ingresos”, incluyendo Estados Unidos y Australia, lo que origina un elevado coste a los sistemas de salud (Webster et al, 2016).

Además, 12,2 muertes de cada 100.000 ocurridas al año se deben a esta enfermedad, y se estima que en el 2030 aumentara hasta 14 muertes de cada 100.000 (Webster et al, 2016).

En España, según el Ministerio de Sanidad y Consumo, aproximadamente 4 millones de personas padecen ERC. De ellas unas 50.000 están en tratamiento renal sustitutivo, la mitad en diálisis y el resto con un trasplante renal funcionante (Informe de Diálisis y Trasplante 2012). Cada año unas 6.000 personas con insuficiencia renal progresan hasta la necesidad de seguir uno de los tres tipos de tratamiento sustitutivo renal: hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante renal. La prevalencia de la ERC aumenta de forma progresiva con el envejecimiento (el 22% en mayores de 64 años, el 40% en mayores de 80 años), y con otras enfermedades como la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la arterioesclerosis.

1.2. Fases de la ERC

La guía *KDIGO CKD* de la “*National Kidney Foundation*” de los EE.UU. propuso un sistema para diferenciar las distintas fases evolutivas o estadios de la enfermedad en base a diferentes síntomas clínicos que presentan en cada una de ellas (Stevens & Levin, 2013).

Estadio 1

En el estadio 1 ya existe un daño renal, aunque la TFG permanece dentro de niveles normales o puede estar ligeramente aumentada ($TFG \geq 90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$).

Estadio 2

Corresponde a situaciones de daño renal que van acompañadas de una ligera reducción de la TFG (entre 60 y 89 mL/min/1,73 m^2). Es frecuente que los ancianos tengan una TFG ligeramente disminuida.

Estadio 3

Tiene lugar una disminución moderada de la TFG, que se sitúa entre 30 y 59 mL/min/1,73 m^2). Se observa un riesgo aumentado de progresión de la ERC y de la aparición de complicaciones cardiovasculares, además de la posibilidad de complicaciones clásicas de la insuficiencia renal como la anemia o las alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico.

Estadio 4

En el estadio 4 se produce una disminución grave de la TFG (oscila entre 15 y 29 mL/min/1,73 m^2). Comienzan a aparecer síntomas y signos urémicos (aumento de triglicéridos en suero, hiperfosfatemia, hipercalcemia, acidosis metabólica, fatiga, náuseas, anorexia y dolor óseo). Tanto el riesgo de que aparezcan complicaciones cardiovasculares como de progresión de la insuficiencia renal al estadio 5 son muy elevados.

Estadio 5

El estadio 5, también denominado “fallo renal” se caracteriza por una TFG inferior a 15 mL/min/1,73 m^2 . La necesidad del tratamiento renal sustitutivo es perentoria, especialmente cuando se presentan síntomas o signos urémicos. Aparece azotemia (acumulación de productos nitrogenados de desecho en suero).

Tanto el estadio 4 y fundamentalmente el estadio 5 (fallo renal) suponen un elevado coste social, humano y económico (Levey et al, 2003; Snively & Gutierrez, 2004).

1.3. Etiopatogenia y fisiopatología de la ERC

La ERC se origina fundamentalmente como consecuencia de la diabetes e hipertensión. Además, las reacciones autoinmunes, infecciones, hipoxia renal, acción de drogas y tóxicos, obstrucción del tracto urinario y alteraciones genéticas son también causas importantes de la ERC. Independientemente de la causa, la ERC puede empezar en los túbulos o intersticio (enfermedades tubulointersticiales), en el glomérulo (enfermedades glomerulares) o incluso en la vasculatura renal (enfermedades renovasculares) dando lugar en los estadios finales a un aumento de la matriz extracelular (MEC) en el intersticio (fibrosis tubulointersticial), en el glomérulo (glomeruloesclerosis), o en ambos (Lopez-Novoa et al, 2011).

La evolución del daño renal en la ERC comparte muchas características con otras enfermedades renales como la nefropatía obstructiva, la enfermedad poliquística renal y el rechazo al trasplante renal, siendo la fase fibrótica muy parecida en todas las enfermedades progresivas renales.

Origen tubular

Las nefropatías tubulointersticiales incluyen un conjunto de alteraciones que afectan de manera primaria a los túbulos e intersticio y de manera secundaria a otras estructuras renales como los glomérulos, siendo los túbulos los componentes que sufren el mayor daño en este tipo de enfermedades (Cogan, 1980).

El intersticio está formado por un andamio intracelular, compuesto por la MEC y las membranas basales, donde se encuentran distintos tipos celulares como son, los pericitos microvasculares, células residentes e infiltradas del sistema inmune, fibroblastos y, en condiciones patológicas, miofibroblastos (Lopez-Novoa et al, 2011).

El 90% aproximadamente del parénquima renal está compuesto por túbulos, por lo que la fibrosis tubulointersticial se correlaciona en un mayor grado con el daño renal total en comparación con la glomeruloesclerosis, que tiene una localización más reducida.

Este tipo de enfermedad se caracteriza por atrofia tubular, infiltración celular y fibrosis tubulointersticial (Lopez-Novoa et al, 2011). La función renal se deteriora de manera progresiva como consecuencia de una disfunción en los procesos de reabsorción y secreción tubular, activación de células tubulares con reclutamiento de mediadores inflamatorios, pérdida de masa tubular, cicatrización del tejido y finalmente daño de otras estructuras renales (Brown et al, 2006).

Estas enfermedades tubulointersticiales son idiopáticas, genéticas o debidas a (I) la acción de tóxicos que al acumularse en los túbulos inducen la apoptosis o necrosis de las células tubulares epiteliales; (II) a la infección o inflamación del intersticio tubular, debido al reflujo o a la pielonefritis crónica; (III) al aumento de la presión intratubular debido a un estrés mecánico y (IV) al rechazo inmune al trasplante (Braden et al, 2005).

Origen glomerular

Las glomerulopatías son alteraciones renales que afectan a la estructura y función del glomérulo. Se trata de entidades muy heterogéneas, tanto en su etiología como en sus manifestaciones clínicas y evolución, por lo que existen diversos tipos de clasificación de las mismas:

La *clasificación clínica* se basa en la evolución de la enfermedad en el tiempo: glomerulopatías agudas, glomerulopatías rápidamente progresivas y glomerulopatías crónicas. En la práctica, estos términos son relativos, ya que las consideradas como crónicas pueden tener un efecto agudo y viceversa y prácticamente todas pueden evolucionar de forma rápidamente progresiva en algún momento de la evolución.

La *clasificación histológica* es bastante utilizada y permite establecer diversos tipos morfológicos para las enfermedades glomerulares.

La *clasificación etiológica* distingue entre primarias y secundarias, y es la que más vamos a detallar en este apartado.

Las glomerulopatías primarias engloban las de tipo inflamatorio-inmune, denominadas glomerulonefritis y las de tipo metabólico-mecánico (Couser, 1998). Las glomerulopatías secundarias son el resultado de nefropatías tubulointersticiales y renovasculares primarias, que contribuyen a la progresión del daño (Eddy, 1994). Las condiciones primarias inflamatorias y no

inflamatorias dan lugar a los síndromes nefrítico y nefrótico respectivamente (Couser, 1998). La diabetes, hipertensión y glomerulonefritis representan las mayores causas de fallo renal crónico en las enfermedades glomerulares (Isaka et al, 1999).

La mayor consecuencia de las glomerulonefritis es el síndrome nefrítico caracterizado por edema, hematuria, proteinuria, oliguria e hipertensión arterial (Cunard & Kelly, 2003). Las glomerulonefritis son debidas fundamentalmente a I) infecciones sistémicas y renales, II) glomerulonefritis focal y segmental III) daños en la membrana basal glomerular debidos a depósitos inmunes en las paredes capilares (nefritis lúpica, glomerulonefritis membranoproliferativa), acumulación de inmunoglobulina A (IgA) en el glomérulo y otros, y IV) glomerulonefritis por vasculitis (Lopez-Novoa et al, 2011).

Las glomerulopatías no inflamatorias o de tipo metabólico-mecánico se deben a enfermedades metabólicas y hereditarias tales como diabetes, hipertensión, toxinas o neoplasias que mecánica o químicamente dañan el glomérulo. La nefropatía hipertensiva y la nefropatía diabética son las glomerulopatías más frecuentes de este tipo. El síndrome clínico más importante producido por este tipo de glomerulopatías es el síndrome nefrótico, caracterizado por proteinuria severa (más de 3 gramos/día), hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia , lipiduria y una reducción de la TFG pero sin presencia de hematuria (Brown et al, 2006). Cabe destacar que incluso las glomerulopatías conocidas como “no inflamatorias” cursan con inflamación, siendo un mecanismo clave para la progresión de la enfermedad así como una buena diana terapéutica (Lopez-Novoa et al, 2010). A diferencia de las glomerulopatías inflamatorias, en este caso se trata de una inflamación secundaria al daño inicial que las origina.

Origen vascular

Se trata de un grupo de condiciones progresivas que dan lugar a una disfunción y daño renal debidos al estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos (Lopez-Novoa et al, 2011). Según el “*U.S. Renal Data System*” (U.S. Renal Data System, 2002), un tercio de los casos de estadio final de ERC están relacionados con enfermedades renovasculares. Las enfermedades renovasculares normalmente aparecen como microangiopatías, aunque la oclusión de la arteria renal, trombosis en la vena renal y ateroembolismos renales también pueden ser causa de estas enfermedades.

El 70-90% de los casos de estenosis renal están inducidos por arterioesclerosis, siendo ésta la lesión mayoritaria en pacientes mayores de 50 años (de Mast & Beutler, 2009; Olin, 2002), mientras que el resto de los casos se deben principalmente a displasia fibromuscular. Otras causas menos frecuentes de estenosis son la presión externa (por ejemplo producida por un tumor), la oclusión parcial (por un trasplante renal), así como nefroangioesclerosis o enfermedad tromboembólica renal (Lopez-Novoa et al, 2011; Rihal et al, 2002).

Las enfermedades renovasculares pueden alterar la estructura y función renal mediante I) disfunción endotelial, estrés oxidativo e inflamación inducida por la arterioesclerosis dando lugar a fibrosis y una menor filtración, II) hipoperfusión y condiciones isquémicas que comprometen el flujo sanguíneo renal la función glomerular y tubular y III) el inicio de la hipertensión (Lopez-Novoa et al, 2011).

2. Fibrosis renal

2.1. Generalidades de la fibrosis

La fibrosis es un proceso común a diversas enfermedades, asociada a una excesiva deposición de MEC que da lugar a una disminución en la función del órgano. Así mismo la fibrosis está asociada con la progresión de enfermedades crónicas en distintos órganos tales como hígado, riñón, corazón y pulmón (Zeisberg & Kalluri, 2013). Además, juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades en otros órganos, como escleroderma en la piel (Morris et al, 2011), artritis reumatoide en las articulaciones o síndromes mielodisplásicos en la médula ósea (Zeisberg & Kalluri, 2013).

Los mecanismos implicados en el desarrollo de la fibrosis en los distintos órganos presentan una serie de características comunes. En primer lugar, presencia de fibroblastos activados o miofibroblastos, que son las células que mayoritariamente expresan proteínas de la MEC (Strutz & Zeisberg, 2006); otra característica general es la hipoxia producida en el tejido fibrótico debido a una rarefacción microvascular y la consiguiente disminución de la perfusión tisular. Y por último, daño en las células del parénquima del tejido fibrótico afectado: cardiomiocitos en el corazón, hepatocitos en el hígado y epitelio tubular en el riñón. En algunos casos, como en el riñón, la fibrosis también se asocia a inflamación (Mullis et al, 1986).

2.2. Fibrosis renal. Mecanismos que la desencadenan

La fibrosis renal se caracteriza por acumulación de MEC debido a un desequilibrio entre su síntesis y su degradación y es la consecuencia final de aquellas lesiones renales que desencadenan una insuficiencia renal crónica.

En el desarrollo de la fibrosis renal existen diversos tipos celulares implicados, tales como miofibroblastos, células mesangiales y células epiteliales tubulares, siendo las células mesangiales en el glomérulo y los miofibroblastos en el intersticio los principales responsables de la síntesis de proteínas de MEC.

La lesión puede originarse en el compartimento glomerular (como la glomeruloesclerosis) o en el túbulo intersticial, y la consecuencia final será una fibrosis global, con un gran componente de afectación tubulointersticial. Por lo tanto, el grado de fibrosis tubulointersticial es el mejor predictor de supervivencia renal en la ERC (Munoz-Felix et al, 2013).

Es probable que la fibrosis renal se desencadene como un mecanismo beneficioso de defensa en respuesta a un daño inicial. Sin embargo, si no se produce una correcta regulación en alguna de las fases de esta respuesta, se origina una fibrosis patológica dando lugar a glomeruloesclerosis, atrofia y dilatación tubular, fibrosis tubulointersticial y rarefacción de los capilares glomerulares y peritubulares (Boor et al, 2010).

2.3. Fibrosis tubulointersticial. Daño inicial y activación celular

La fibrosis tubulointersticial se origina con un daño inicial que activa mecanismos inflamatorios y de reparación. Se produce apoptosis de las células del epitelio tubular, dando lugar a la atrofia del túbulo hasta desencadenar un estado de fibrosis que origina una destrucción progresiva del tejido (Zeisberg & Kalluri, 2013). Esta fibrosis tubulointersticial se caracteriza por una excesiva acumulación de componentes de MEC como fibronectina y colágenos I, III y V, y la presencia y proliferación de miofibroblastos (Grande & Lopez-Novoa, 2009; Liu & Preisig, 2002).

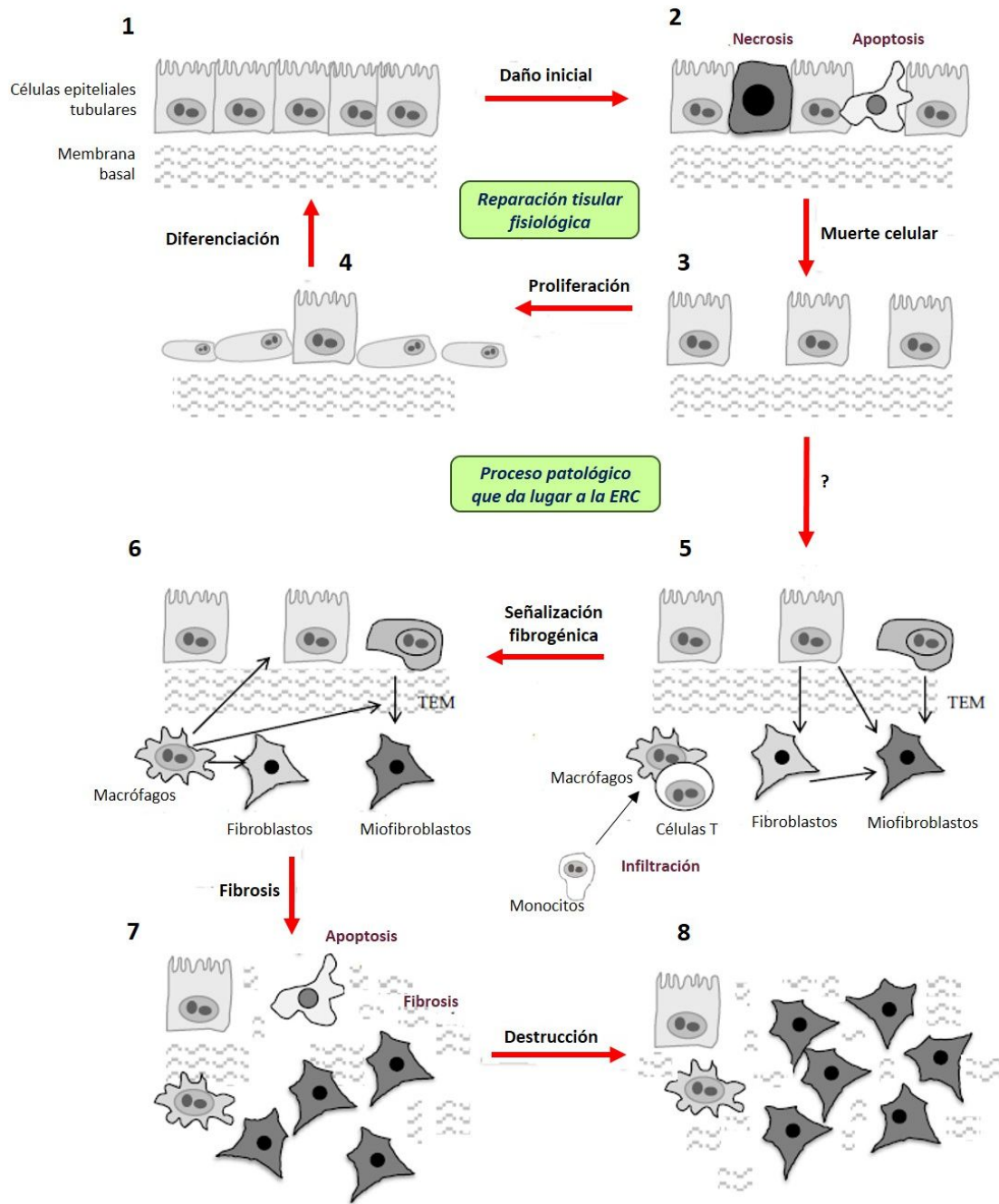


Figura 1. Descripción esquemática del proceso patológico de la degeneración tubular y la fibrosis tubulointersticial característica de las enfermedades tubulointersticiales y estadios tardíos de enfermedades glomerulares y renovasculares que originan enfermedad renal crónica. Reparación tisular fisiológica (1-4), proceso patológico (5-8). Adaptado de Lopez-Novoa et al 2011. ERC: enfermedad renal crónica; TEM: transición epitelio mesénquima.

La secuencia de eventos patogénicos que tienen lugar durante la fibrosis tubulointersticial se pueden resumir de este modo (figura 1): En respuesta al daño, se produce muerte de las células epiteliales, mediante necrosis o apoptosis fundamentalmente. La apoptosis del epitelio tubular produce una atrofia tubular. Mediante un proceso de reparación tisular fisiológica, se contrarresta esta muerte celular con una proliferación y diferenciación de este tipo celular. Bajo diversos factores, como la acción de diferentes citoquinas (vasoactivas, quimiotácticas, proinflamatorias o fibrogénicas) se producen fenómenos de infiltración de células inflamatorias o transición epitelio mesénquima (TEM), dando lugar al fenotipo miofibroblasto, que produce gran cantidad de proteínas de MEC (Lopez-Novoa et al, 2011).

2.4. Fibrosis tubulointersticial. Principales mecanismos implicados

2.4.1. Células inflamatorias

La fibrosis tubulointersticial está condicionada por la infiltración de células inflamatorias incluyendo células dendríticas (John & Nelson, 2007), linfocitos (Kelly, 1999), macrófagos (Sean Eardley & Cockwell, 2005) y mastocitos (Holdsworth & Summers, 2008). Tanto los monocitos como los macrófagos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la fibrosis renal; la acumulación intersticial de los monocitos y activación de macrófagos residentes aumentan la respuesta inflamatoria (por la liberación de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 1 beta, IL-1 β o factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α) y diapédesis de los linfocitos (Nath, 1992) así como también contribuyen a la apoptosis y progresión de la fibrosis renal por su capacidad de liberar mediadores profibróticos como galectina-3, Wnt y factor estimulante de colonias (CSF-1) (Henderson et al, 2008; Ma et al, 2009). La secreción de grandes cantidades de citoquinas causa la activación de otras células como son los fibroblastos y células endoteliales.

Además se ha visto que los macrófagos se pueden transdiferenciar a miofibroblastos productores de colágeno durante la fibrosis renal en humanos y en modelos experimentales de fibrosis renal (Meng et al, 2016).

2.4.2. Epitelio tubular

Las células epiteliales tubulares tienen un papel importante en el desarrollo de la fibrosis renal ya que su pérdida desata la progresión de la fibrogénesis. Estas células actúan modulando su proliferación (Schmitt et al, 2008) o liberando citoquinas proinflamatorias que inducen la

inflamación o la formación de fibroblastos (Zeisberg et al, 2001). Estas citoquinas locales actúan como mediadoras del daño intersticial primario.

El epitelio tubular puede presentar muerte celular, parada del ciclo celular, disfunción mitocondrial o defectos en la oxidación de ácidos grasos que origina un fenotipo proinflamatorio y profibrótico (Kang et al, 2015; Molitoris, 2014; Yang et al, 2010). Por otro lado, el daño en las células epiteliales tubulares produce proteinuria y puede dar lugar a una activación del sistema del complemento pudiendo desembocar en fibrosis renal (Boor et al, 2007b); también se ha observado que una activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) en las células tubulares esta correlacionada con parámetros de severidad de la enfermedad como proteinuria o inflamación (Sanz et al, 2010).

La muerte celular en el curso del daño renal puede ocurrir mediante necrosis, apoptosis o necroptosis (Sanz et al, 2008). La necrosis es el resultado de un estímulo letal intenso y no se observa frecuentemente durante la progresión de la ERC. La apoptosis requiere la activación intracelular de moléculas letales y la supresión de moléculas de supervivencia, siendo la principal forma de muerte celular observada en el modelo experimental de obstrucción ureteral unilateral (OUU), similar a lo que ocurre en la ERC. La necroptosis se ha descrito como una muerte celular activada por vías de señalización específicas que incluyen los receptores interactivos serina/treonina proteína kinasa 1 y 2 RIPK1 Y RIPK2 (del inglés, *Receptor interacting serine/threonine protein kinase*) (Ucero et al, 2014). En la progresión de la ERC, se produce un mayor grado de muerte de las células tubulares que de proliferación dando lugar a una disminución de este tipo celular y a una atrofia tubular. La apoptosis y autofagia que se producen en las células epiteliales tubulares en situaciones de daño renal favorece la aparición de fibrosis renal; así mismo, la inhibición de la apoptosis tubular reduce la fibrosis renal, tal como se ha demostrado en modelos experimentales (Boor et al, 2010).

Además, la proporción de células epiteliales tubulares en fase G2/M está correlacionada con el grado de fibrosis renal a través de la secreción de grandes cantidades de factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) que activa los fibroblastos (Boor et al, 2010; Yang et al, 2010).

Transición epitelio mesénquima

Se define como un proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal y apariencia de miofibroblasto, pudiendo sintetizar proteínas de MEC a la vez que expresan marcadores propios de miofibroblastos como actina de músculo liso vascular (α -SMA), vimentina, vitronectina y fibronectina. Así mismo, estas células pierden la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y zonula occludens-1 (ZO-1) (Docherty et al, 2007; Iwano et al, 2002; Xu et al, 2009).

El fenómeno de TEM se produce en algunos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y en procesos patológicos como la metástasis tumoral y los procesos fibróticos (Xu et al, 2009). Sin embargo, en la fibrosis renal la presencia de una completa TEM ha sido difícil de probar (Liu, 2011). Numerosos autores han señalado que las células epiteliales sufren el proceso de TEM por acción de citoquinas como TGF- β 1 (Zeisberg & Kalluri, 2004); sin embargo otros autores dudan que la TEM tenga algún papel relevante *in vivo* (Koesters et al, 2010). También se ha propuesto la presencia de una TEM parcial, en la que el epitelio adquiere características mesenquimales sin que se produzca una TEM completa. Mientras que la TEM es controvertida, no hay duda sobre la “comunicación epitelio-mesenquimal” (CEM) que ocurre en los riñones dañados. Esta CEM es mediada por factores solubles que dan lugar a señales intracelulares de activación y aumento de transcripción de diferentes genes (Grande et al, 2015; Tan et al, 2016).

2.4.3. Matriz extracelular

La excesiva deposición de MEC, fundamentalmente la presencia de fibras de colágeno, es la característica más notable de la fibrosis tubulointersticial (Zeisberg & Neilson, 2010).

La MEC es una red organizada, formada por el ensamblaje de polisacáridos y proteínas secretadas por las células, que actúa como elemento estructural en los tejidos e influye en su desarrollo y su fisiología. Existen 2 tipos de MEC en función de su localización y composición: la *membrana basal*, formada por una capa de matriz condensada que es sintetizada fundamentalmente por las células que se apoyan en ella y la *matriz intersticial*, que es la que se encuentra entre las células. La MEC está constituida fundamentalmente por colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. Es la cantidad, la proporción y el tipo de cada una de estas macromoléculas lo que distingue unas MEC de otras, y además algunos componentes solo aparecen en condiciones patológicas (Bonnans et al, 2014). En los riñones

fibróticos, la MEC de los espacios intersticiales sintetizada por los fibroblastos activados está fundamentalmente formada por colágeno tipo I, colágeno tipo III y fibronectina. La matriz fibrótica que normalmente aparece en las membranas basales también contiene residuos de colágeno tipo IV (Zeisberg & Neilson, 2010).

Entre las funciones que tiene la MEC se encuentran: aporte de propiedades mecánicas a los tejidos, mantenimiento de la forma celular, comunicación intercelular y adhesión de las células a los tejidos, modulación de la diferenciación y fisiología celular y regulación de la acción de diversos factores de crecimiento.

La MEC está sometida a una remodelación continua, un proceso que implica la degradación de los componentes existentes y la síntesis y deposición de nuevas proteínas (Stetler-Stevenson, 1996). Existen diversas citoquinas, que se tratan a lo largo del capítulo, que promueven la expresión de proteínas de MEC. La degradación de la MEC está mediada por proteasas específicas secretadas por las células, principalmente la familia de las metaloproteasas (MMPs) y plasminógeno/plasmina. La mayoría de los estudios en riñón se centran en la MMP2 y MMP9, las cuales degradan colágeno tipo IV, V, VII, X, fibronectina, elastina, gelatina (Bonnans et al, 2014) y quizás colágenos tipo I y III (Sabeh et al, 2009).

2.4.4. Fibroblastos y miofibroblastos

Los fibroblastos son células mesenquimales que aparecen en el intersticio renal, siendo responsables de generar el andamio requerido para mantener la estructura renal. Por el contrario, los miofibroblastos son células activadas cuya acumulación está asociada con la enfermedad fibrótica ya que tienen la capacidad de producir gran cantidad de proteínas de MEC y un fenotipo de contractilidad asociado a la expresión de α -SMA (Tan et al, 2016).

Los estímulos que producen la activación de los fibroblastos están generalmente asociados al daño tisular. Los fibroblastos residentes se activan fundamentalmente por citoquinas como TGF- β 1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2). También se han descrito otros mecanismos de activación como el contacto célula-célula, interacción de las integrinas con la MEC, y algunos otros estímulos ambientales como la hipoxia y la hiperglicemia (Strutz & Zeisberg, 2006; Tan et al, 2016).

Existen numerosos estudios sobre la procedencia de los miofibroblastos, que sugieren al menos 6 posibles orígenes (Chevalier et al, 2009): fibroblastos intersticiales que proliferan, células derivadas de médula ósea, células epiteliales tubulares que sufren TEM, células endoteliales que sufren transición endotelio-mesénquima y otros tipos celulares como pericitos vasculares o fibrocitos que tras desdiferenciarse adquieren fenotipo de miofibroblasto. Según un estudio sobre la procedencia de los miofibroblastos en la fibrosis renal, el 50% derivan de fibroblastos residentes que proliferan, un 35% de la transdiferenciación de células de médula ósea, un 10% de la transición endotelio-mesénquima y sólo un 5% de la TEM (LeBleu et al, 2013).

2.4.5. Microvasculatura

La rarefacción de la vasculatura peritubular con la consiguiente hipoxia son signos determinantes de la fibrosis tubulointersticial (Zeisberg & Neilson, 2010). La hipoxia contribuye directamente a la progresión de la fibrosis tubulointersticial estimulando la TEM y promoviendo la acumulación de nuevos fibroblastos (Higgins et al, 2007). En este contexto, cabe destacar la importancia de las células endoteliales por ser una fuente de fibroblastos vía transición endotelio-mesénquima (Zeisberg et al, 2008).

2.5. Principales citoquinas y otros factores implicados en la fibrosis renal

Existen una gran variedad de citoquinas y otros factores implicados en el desarrollo de la fibrosis renal; se pueden dividir en distintos grupos según su función:

- Citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β)
- Citoquinas fibrogénicas: relacionadas con la síntesis de la MEC (TGF- β 1, factor de crecimiento del tejido conectivo o CTGF, proteína morfogenética ósea-7 o BMP7)
- Citoquinas mitogénicas o factores de supervivencia (PDGF, IL-6, factor de crecimiento insulínico-1 o IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos o HGF, factor de crecimiento epidérmico o EGF)
- Citoquinas relacionadas con la muerte celular (Fas ligando o FasL, TNF- α)
- Quimiocinas (proteína 1 quimioatrayente de monocitos o MCP1, RANTES)
- Citoquinas vasoactivas (angiotensina II o endotelina)
- Antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13)
- Factor de transcripción NF- κ B
- Moléculas de adhesión

- **Citoquinas proinflamatorias**

Las citoquinas TNF- α e IL-1 β actúan sobre células renales e inflamatorias amplificando la respuesta inflamatoria. La administración de estas citoquinas agrava la lesión glomerular o tubulointersticial, mientras que la administración de moléculas que disminuyen su expresión (Li et al, 2011) así como anticuerpos anti-TNF- α o antagonistas del receptor de IL-1 β conllevan una mejora en la progresión de la fibrosis renal y de las lesiones glomerulares (Jones et al, 2009; Khan et al, 2005). Además, promueven la expresión en células renales del inhibidor de MMP1 (TIMP-1) (Eddy, 2000), aunque su participación en la fibrosis renal es controvertida ya que ratones deficientes de TIMP-1 no muestran diferencias significativas en la fibrosis tubulointersticial inducida durante el daño renal (Eddy, 2000; Eddy et al, 2000).

- **Citoquinas fibrogénicas**

Dentro de este grupo se encuentran el TGF- β 1 y el CTGF. Cabe destacar en este apartado otra citoquina que antagoniza el mecanismo de acción del TGF- β 1 en modelos experimentales de fibrosis renal, la BMP7.

- *Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)*

Está ampliamente descrita la relación entre esta citoquina y la fibrosis renal induciendo la producción de MEC y proliferación de fibroblastos y también a través de funciones de inmunoregulación (Boor et al, 2010). Además, participa en la apoptosis y diferenciación (Lopez-Hernandez & Lopez-Novoa, 2012).

Esta citoquina está relacionada con el desarrollo de la fibrosis renal mediante diversos mecanismos: estimulando la expresión de proteínas de MEC así como de otras citoquinas relacionadas con la expresión de proteínas de MEC (CTGF), inhibiendo la síntesis de MMPs (encargadas de la degradación de la MEC) y estimulando la síntesis de los TIMPs y del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), que también inhibe la expresión de MMPs. También juega un papel importante en las alteraciones observadas en la vasculatura renal, glomérulos y túbulos (promoviendo apoptosis) en el riñón fibrótico (Lopez-Hernandez & Lopez-Novoa, 2012).

La superfamilia de TGF- β transmite sus señales intracelulares a través de glicoproteínas de membrana de tipo serina-treonina quinasa, que forman la familia de receptores de TGF- β y por proteínas citoplasmáticas denominadas Smads (Lopez-Hernandez & Lopez-Novoa, 2012).

También induce la activación de otras vías de señalización independientes de Smads, como la vía de MAPK/ERK1/2 (proteínas quinasas activadas por mitógenos/proteína quinasa regulada por señales extracelulares) y PI3K/AKT (fosfatilinositol 3 quinasa/proteína quinasa B), que se han visto activadas en modelos experimentales de fibrosis renal (Rodríguez-Pena et al, 2008).

En diversos modelos de enfermedad renal se ha demostrado su sobreexpresión así como la de sus receptores (Prieto et al, 2005; Rodríguez-Pena et al, 2002). Además, en distintos modelos experimentales la inhibición de los receptores o proteínas implicadas en su señalización disminuyen la fibrosis renal (Moon et al, 2006; Sato et al, 2003).

- *Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)*

La expresión de esta citoquina también denominada CCN2 se regula por diversas moléculas relacionadas con la fibrosis como TGF- β 1, angiotensina II o BMPs entre otras. Diversos estudios demuestran que TGF- β 1 aumenta la expresión de CTGF en distintos tipos celulares (Velasco et al, 2008) y ambas citoquinas pueden actuar sinérgicamente en la fibrosis crónica. La expresión de CTGF está correlacionada con el grado de fibrosis tubulointersticial en modelos experimentales de fibrosis renal (Gupta et al, 2000). La administración de angiotensina II induce la expresión de CTGF en células del glomérulo y del epitelio tubular en un periodo anterior a la acumulación de proteínas de MEC (Ruperez et al, 2003). En estudios en rata, la administración de CTGF produce un aumento en la expresión de proteínas de MEC en riñón y de la cantidad de células inflamatorias; así mismo, la administración de partenólido (inhibidor de NF- κ B) disminuye la respuesta inflamatoria y fibrótica inducida por CTGF (Gupta et al, 2000; Sanchez-Lopez et al, 2009a).

- *Proteína morfogenética ósea-7 (BMP7)*

La BMP7 es un miembro de la superfamilia del TGF- β 1 que se une a un receptor de tipo II de BMPs (BMPRII), que a su vez activa a un receptor de tipo I (BMPRI) y fosforila las Smad 1 y 5. Durante los últimos años diversos autores han indicado la importancia de esta citoquina proponiendo a esta molécula como terapia contra la fibrosis renal (Meng et al, 2013), ya que su administración exógena disminuye y revierte esta fibrosis (Manson et al, 2011; Zeisberg et al, 2003).

- **Factores de supervivencia**

En este grupo englobamos un conjunto de citoquinas inductoras de proliferación de células que juegan un papel muy importante en el desarrollo de la fibrosis: células mesangiales en el glomérulo, y miofibroblastos en el intersticio tubular. También hay que tener en cuenta que estos factores pueden desempeñar mecanismos antifibróticos ya que protegen frente a la apoptosis.

- *Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)*

PDGF es uno de los mitógenos más potentes de las células mesenquimales, entre los que se incluyen los miofibroblastos, y estimula la producción de MEC en la fibrosis renal. Además, el sistema PDGF regula otros eventos fisiopatológicos como son la proliferación y migración celular, producción de mediadores pro y antiinflamatorios, permeabilidad tisular y regulación de la hemodinámica. El sistema PDGF está compuesto por cuatro isoformas (PDGF-A, -B, -C y -D) y dos cadenas de receptores (PDGFR- α y - β). Sus principales vías de señalización son JAK/STAT (janus quinasa/transductor de señal y activador de transcripción), PI3K y MAPK. En la fibrosis renal se encuentran sobreexpresadas las distintas isoformas (Floege et al, 2008). En un modelo experimental de fibrosis por obstrucción ureteral se ha observado que PDGF-DD está altamente expresada en fibroblastos intersticiales (Taneda et al, 2003), y además la inhibición de dicha isoforma durante las fases tempranas y tardías de la glomerulonefritis progresiva mejora la fibrosis tubulointersticial (Boor et al, 2007a; Ostendorf et al, 2006). También se ha demostrado que PDGF-BB y PDGF-DD- ligandos del receptor PDGFR- $\beta\beta$ - están implicados en la glomerulonefritis mesangioproliferativa debido a que actúan como mediadores de la proliferación mesangial (Floege et al, 2007). La expresión de la isoforma PDGF-CC ocurre de *novo* en el intersticio renal, ya que se asocia fundamentalmente con la infiltración de monocitos y macrófagos (Boor et al, 2010). La inhibición o deficiencia genética de dicha isoforma también disminuye la fibrosis renal en ratones después de la OUU. El efecto principal de esta isoforma es la inducción de la proliferación de fibroblastos y la infiltración de leucocitos (Boor et al, 2010).

- *Interleuquina 6 (IL-6)*

Es una citoquina producida por diversos tipos celulares entre los que se incluyen macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T. Estimula la proliferación de células

mesangiales en cultivo y actúa como un factor de supervivencia en muchos tipos celulares. Se trata de una citoquina pleiotrópica con propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias; su producción aumenta en las nefropatías glomerulares, aunque en un estudio reciente se ha demostrado que la IL-6 posee un efecto positivo en el desarrollo de la glomerulonefritis ya que el tratamiento con anticuerpos frente a dicha citoquina y su receptor empeora el desarrollo de la enfermedad en ratones (Luig et al, 2015). El papel de esta citoquina en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial no está claro: mientras que varios estudios muestran que pacientes con fibrosis renal presentan un aumento en la expresión de IL-6, la deficiencia de IL-6 no conlleva diferencias en la fibrosis tubulointersticial tras la OUU (Pecoits-Filho et al, 2003).

- *Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)*

El HGF es un factor pleiotrópico que juega un papel importante en la reparación y regeneración tubular después de un daño renal agudo. Presenta propiedades mitogénicas y antiapoptóticas. Además, previene la iniciación y progresión de la fibrosis renal e inhibe la expresión de TGF- β 1 en diferentes modelos experimentales. En estudios *in vitro* contrarresta la acción de TGF- β 1 en diferentes tipos celulares, bloqueando la activación de miofibroblastos así como la TEM. Además, la administración de esta citoquina retrasa el desarrollo de la glomeruloesclerosis (Liu, 2004).

- **Quimiocinas**

Las quimiocinas son un grupo de moléculas que actúan como quimioatrayentes favoreciendo la migración y adhesión celular en el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación y en la regulación de la respuesta inmune de los linfocitos T. Las quimiocinas se unen a receptores específicos del endotelio, leucocitos y MEC. Son inducidas por citoquinas (TNF- α e IL-1 β), activación del complemento, especies reactivas del oxígeno, NF- κ B y vías de señalización relacionadas con receptores de tipo Toll (Furuichi et al, 2008). Las quimiocinas más importantes involucradas tanto en la glomerulosclerosis como en la fibrosis tubulointersticial son MCP-1, quimiotáctica para monocitos, RANTES, quimiotáctica para monocitos y linfocitos T e IL-8, quimiotáctica para neutrófilos.

- **Citoquinas vasoactivas**

Tanto la angiotensina II como la endotelina-1 además de ser péptidos vasoactivos, pueden comportarse como mitógenos e inducir la producción de otras citoquinas profibróticas.

La angiotensina II juega un papel fundamental contribuyendo al desarrollo de la fibrosis renal y por tanto a la progresión de la enfermedad. Niveles elevados de angiotensina II modulan la fibrosis renal ejerciendo efectos directos sobre la MEC y regulando la expresión de otros factores que promueven la fibrosis como TGF- β 1 (Ruiz-Ortega et al, 2003; Wolf, 2006), PDGF (Nogueira et al, 2017), CTGF (Yang et al, 2009), así como factores que regulan la inflamación como TNF- α , molécula de adhesión vascular -1 (VCAM-1) y NF- κ B (Nogueira et al, 2017).

Los receptores de angiotensina II, AT₁ y AT₂, están implicados en la inflamación y fibrosis renal por distintos mecanismos: ambos receptores juegan un papel importante en la inflamación, ya que su activación activa la vía de señalización de NF- κ B (que regula la transcripción de diversos genes proinflamatorios que codifican citoquinas y moléculas de adhesión). Sin embargo, AT₁ es el receptor que se encuentra mayoritariamente implicado en la fibrosis, debido a que activa proteínas directamente implicadas en este fenómeno como son Smads y RhoA (Ruiz-Ortega et al, 2006).

- **Factor de transcripción NF- κ B**

La familia de factores de transcripción NF- κ B regula la transcripción de numerosos genes implicados en la inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación celular y diferenciación. Forma parte de la familia Rel de factores transcripcionales, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros. Estas proteínas son: p50 (NF- κ B y su precursor p105), p52 (NF- κ B2 y su precursor p100), p65 (también llamado RelA), c-Rel y RelB (Latanich & Toledo-Pereyra, 2009). Existen dos vías de señalización que controlan la traslocación nuclear de NF- κ B, la clásica y la alternativa. La clásica es la vía de señalización más importante y más estudiada, cuyo principal efector es RelA/p50. Esta vía se centra en la activación del complejo trimérico de la I κ B quinasa (IKK), complejo formado de dos subunidades catalíticas (IKK- β , IKK- α) y una subunidad reguladora NEMO (Van Waes et al, 2007). Una vez que el complejo IKK es activado, se fosforila la I κ B- α , llevando a su poliubiquitinación y su posterior degradación por el proteosoma 26S, permitiendo así, la liberación de NF- κ B (representada principalmente por los heterodímeros p65/p50) que se transloca al núcleo para

llevar a cabo la transcripción de genes específicos, entre ellos, genes de diferentes citoquinas y quimiocinas, moléculas de adhesión, receptores de citoquinas o moléculas de histocompatibilidad (Grande et al, 2010b; Sanz et al, 2010).

Aunque el NF- κ B actúa principalmente como iniciador de la inflamación, hay estudios que sugieren que también puede actuar en la modulación de esta (Lawrence et al, 2001). Por tanto, este factor nuclear puede participar en la iniciación y resolución de la inflamación dependiendo del tiempo y del contexto biológico.

Existen diferentes evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de una activación de NF- κ B en células glomerulares, tubulares y endoteliales durante el daño renal o tras la exposición a un estímulo inflamatorio (Sanz et al, 2010).

Se ha demostrado en modelos experimentales de daño renal que la administración de agentes que inhiben o antagonizan la activación de NF- κ B produce efectos beneficiosos. También se ha conferido un efecto beneficioso de drogas pleiotropicas que se utilizan en uso clínico para el tratamiento de enfermedades renales, como los esteroides y estatinas y en uso preclínico como inhibidores de Rho, que entre otras acciones inhiben la activación de NF- κ B (Sanz et al, 2010).

- **Moléculas de adhesión**

Las moléculas de adhesión son un conjunto de ligandos/receptores que median la adhesión célula-célula y célula-matriz, activan la transducción de señales intracelulares y modifican el comportamiento celular. Pertenecen a tres familias: integrinas, selectinas e inmunoglobulinas.

La expresión de moléculas de adhesión (selectinas, molécula de adhesión intracelular-1 o ICAM-1, VCAM-1, integrina alfa-1 o VLA-1, integrina alfa-5 o VLA-5) aumenta cuando hay un daño glomerular (Avendaño, 2008), así mismo, en modelos experimentales de fibrosis renal aumenta la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 que median la quimiotaxis y adhesión de macrófagos (Morrissey & Klahr, 1998b). En un estudio clínico se han correlacionado los niveles plasmáticos de ICAM-1 y VCAM-1 con el grado de enfermedad renal así como con marcadores inflamatorios (TNF- α) (Vaccaro et al, 2007) .

2.6. Perspectivas terapéuticas de la fibrosis renal y líneas de investigación actuales

Muchos de los estudios experimentales sobre fibrosis renal se han enfocado en la búsqueda de estrategias terapéuticas capaces de inhibir parte de las rutas de señalización implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Para ello se han utilizado distintos modelos experimentales de fibrosis renal como son el modelo de OUU (Chevalier et al, 2009), o el modelo de reducción de masa renal (Rodríguez-Pena et al, 2001) combinados con la administración de inhibidores de dichas rutas de señalización; también se han realizado estudios utilizando animales modificados genéticamente que sobreexpresan o no expresan un determinado gen.

Se han realizado diversos estudios con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o con inhibidores de sus receptores, obteniendo buenos resultados reduciendo la progresión de la ERC y fibrosis renal tanto en humanos como en modelos experimentales (Lopez-Nova et al, 2010; Nogueira et al, 2017). Como ya se ha mencionado, se ha estudiado la inhibición de CTGF en modelos animales observándose una disminución de la fibrosis renal (Sanchez-Lopez et al, 2009b), así como que la inhibición de la actividad de NF- κ B previene la fibrosis renal inducida por OUU (Tashiro et al, 2003).

La ruta de señalización de TGF- β 1 también ha sido diana terapéutica en la fibrosis renal; se ha visto que la administración de distintos inhibidores de los receptores de TGF- β 1 (Meng et al, 2012a; Moon et al, 2006) así como la inhibición de proteínas implicadas en su señalización celular (Meng et al, 2010; Meng et al, 2012b) induce una disminución de la fibrosis renal.

Como se explicó anteriormente, PDGF ha sido objeto de estudio por numerosos autores. Actualmente, un anticuerpo neutralizante de la isoforma PDGF-DD se encuentra en ensayos clínicos como posible candidato para el tratamiento de la fibrosis renal. Además se han realizado otros estudios inhibiendo citoquinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y HGF (Boor et al, 2007c).

El mayor problema que se encuentra en la inhibición de estas citoquinas es que muchas de ellas son pleiotrópicas, actúan en muchos tejidos y pueden ejercer funciones diferentes dependiendo del tipo celular. Por ello es necesario el abordaje de estrategias terapéuticas más específicas dirigidas hacia la diana concreta donde deben ejercer su función.

3. Enfermedades glomerulares

3.1. Alteraciones histopatológicas y mecanismos implicados en el daño glomerular

Aunque existen mecanismos patogénicos diversos según los tipos de glomerulopatías, hay una serie de características comunes a la mayoría de éstas: alteración de la filtración glomerular y colapso de la estructura glomerular que origina esclerosis y cicatrización (figura 2).

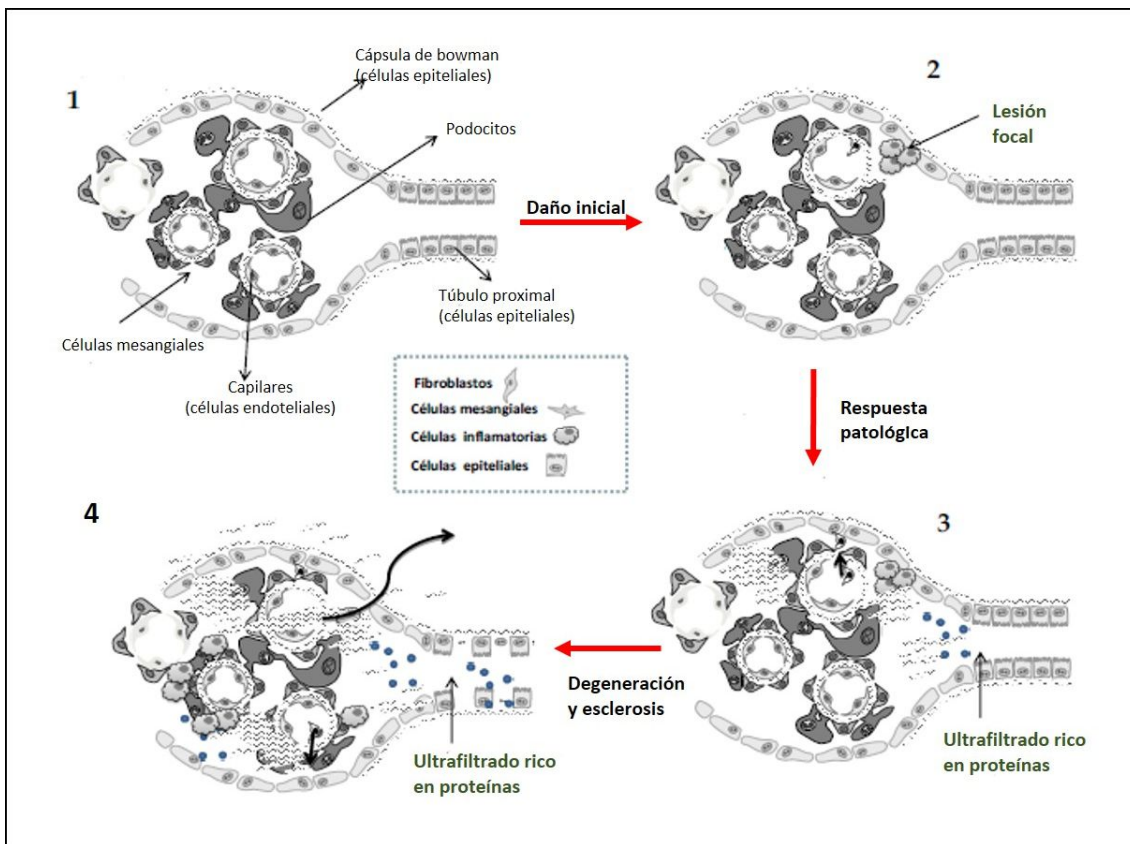


Figura 2. Representación esquemática del proceso de degeneración glomerular y esclerosis en las glomerulopatías. La estructura normal de un corpúsculo muestra la cápsula de Bowman junto a la red capilar glomerular, compuesta por células endoteliales, células mesangiales, podocitos y la membrana basal (1). Un daño inicial de naturaleza indeterminada produce una lesión focal que origina una pérdida de podocitos y una activación de la respuesta inflamatoria implicando tanto a células del sistema inmune como a células residentes (2). Cuando esta lesión no se resuelve mediante los mecanismos de reparación tisular normal, y aparece proliferación de células mesangiales y epiteliales – de la cápsula de Bowman-, extravasación e infiltración de linfocitos, fibrosis y pérdida de podocitos, tiene lugar la respuesta patológica (3). La fibrosis producida extiende el daño por el corpúsculo induciendo apoptosis de las células epiteliales y rellenando los espacios vacíos que dejan las células muertas y dando lugar a vías que conectan la cápsula de Bowman con el intersticio, de tal modo que el ultrafiltrado rico en proteínas accede a otras áreas del corpúsculo y causa un mayor daño (4). Adaptado de Lopez-Novoa et al, 2011.

La glomeruloesclerosis se caracteriza fundamentalmente por acumulación de MEC en el glomérulo, principalmente en el mesangio glomerular. Dicha acumulación de MEC da lugar a un estrechamiento de los capilares glomerulares y a una disminución de la filtración glomerular. Numerosos tipos celulares participan en este proceso, siendo los más importantes las células mesangiales, endoteliales y los podocitos, tal y como se detallará más adelante.

La proliferación de las células mesangiales y el daño en los podocitos son características de muchas de las glomerulopatías (Wiggins, 2007; Ziyadeh & Wolf, 2008).

La inflamación juega un papel importante en el desarrollo de las enfermedades glomerulares, ya que activa diversas células renales que mediante la producción de citoquinas dañan directamente a las células e intensifican la inflamación. Las células glomerulares residentes y las células inflamatorias circulantes (entre las que se encuentran neutrófilos, plaquetas y macrófagos) median una respuesta inflamatoria que origina lesiones glomerulares. Las células inflamatorias reclutadas aumentan la respuesta fibrótica y proliferativa de las células mesangiales, la expresión del marcador de la TEM α -SMA, la producción de componentes de la MEC e incrementan la liberación de citoquinas y factores de crecimiento.

Como ocurre en las enfermedades tubulointersticiales, diferentes citoquinas proinflamatorias participan en acciones paracinas dando lugar a: daño y muerte celular, producción de TGF- β 1 por células renales y fibrosis, vasoconstricción renal que origina una disminución de la filtración glomerular e hipoxia, congestión microvascular y contracción mesangial, que causa una disminución de la filtración glomerular (Lopez-Novoa et al, 2011).

En pacientes con glomerulonefritis, la deposición de MEC en los glomérulos promueve una progresión en la enfermedad (Funabiki et al, 1990). La progresión del daño renal está correlacionada con un aumento de colágeno IV y VI, laminina y fibronectina en el mesangio glomerular. En estadios posteriores de la glomerulonefritis, la cantidad de colágeno IV, laminina y fibronectina disminuye de forma gradual mientras que aumenta la expresión focal de colágeno I y III. En paralelo a la esclerosis ocurre una apoptosis celular, por lo que los espacios que dejan las células muertas son rellenados por componentes de MEC.

3.2. Células implicadas en el desarrollo de las glomerulopatías

3.2.1. Células mesangiales

Las células mesangiales se encuentran en la parte central del glomérulo entre las asas capilares haciendo contacto con las células endoteliales (figura 3); sintetizan proteínas de la MEC, mantienen la estructura del glomérulo y secretan numerosas citoquinas.

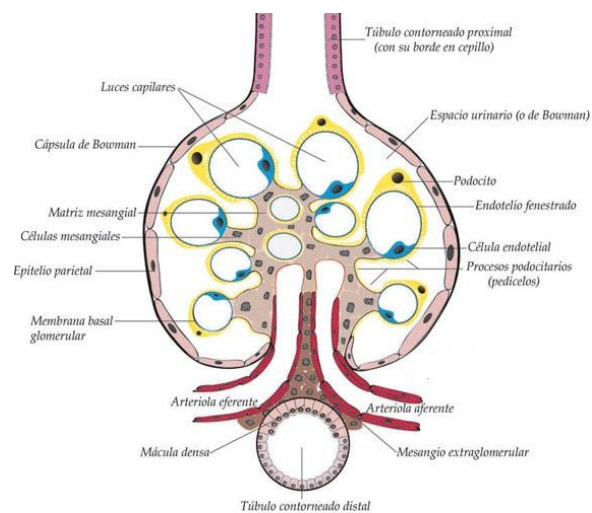


Figura 3. Estructura normal de un glomérulo y sus principales componentes. Adaptado de www.kidney pathology.com

Estas células juegan un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo renal y de la filtración glomerular debido a su capacidad de contracción. La proliferación de las células mesangiales es una característica común de la fase inicial de muchas glomerulopatías; además en distintos modelos experimentales de enfermedad glomerular se ha demostrado que esta proliferación precede y está asociada a la deposición de MEC en el mesangio y por lo tanto a la fibrosis y glomeruloesclerosis así como que una disminución en la proliferación de células mesangiales mejora la fibrosis y glomeruloesclerosis inducida por la enfermedad glomerular (Kurogi, 2003; Lopez-Novoa et al, 2011). Las células mesangiales son las principales causantes de la fibrosis glomerular, especialmente en la nefropatía diabética, donde tiene lugar una gran expansión de la matriz mesangial (Duffield, 2014).

Hay diferentes mediadores como son la angiotensina II, PDGF o TGF- β 1 que promueven la proliferación y activación mesangial dando lugar a la secreción de diversas citoquinas por

parte de dichas células que van a promover alteraciones como la proliferación, hipertrofia o producción de MEC (Ardailou et al, 1999; Haberstroh et al, 1993).

3.2.2. Células parietales epiteliales de la cápsula de Bowman

La proliferación de las células parietales epiteliales de la cápsula de Bowman está implicada en el desarrollo de la glomerulonefritis focal segmentaria y en la proliferación extracapilar. Diversos estudios han mostrado que dichas células proliferan y producen componentes de la MEC, adhesión de los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman y colapso glomerular en diferentes glomerulopatías. Además, estas células pueden activarse y expresar diversos factores de crecimiento, citoquinas y quimoquinas (Lopez-Novoa et al, 2011).

3.2.3. Podocitos

Los podocitos son células epiteliales altamente diferenciadas que se sitúan sobre la membrana basal glomerular (figura 3). Tienen una organización compleja que consiste en un cuerpo celular con prolongaciones primarias dirigidas hacia las asas capilares y prolongaciones digitiformes secundarias denominadas pies de los podocitos o pedicelos, que se adosan contra la pared de los capilares. Los pedicelos y los diafragmas de filtración cubren la parte exterior de la membrana basal glomerular y juegan un papel importante estableciendo la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular, lo que explica por qué el daño en los podocitos está asociado con una marcada albuminuria y por tanto la pérdida de podocitos es una marca distintiva de la progresión de la enfermedad glomerular (Bartlett et al, 2016).

Muchas de las enfermedades glomerulares (como nefropatía diabética, síndrome nefrótico de cambios mínimos, glomeruloesclerosis focal segmentaria, glomerulopatía membranosa o lupus nefrítico) tienen como característica común el daño en los podocitos, por lo que se les denominan podocitopatías; este daño en los podocitos se caracteriza por una reorganización del citoesqueleto de actina que origina desaparición de los pedicelos y pérdida de los diafragmas de filtración, lo que termina provocando proteinuria (Greka & Mundel, 2012).

La disfunción de los podocitos origina una insuficiencia renal progresiva. 1º) El daño en los podocitos causa proteinuria dando lugar a un daño tubulointerstitial que finalmente progresa a fallo renal. 2º) El daño en los podocitos perjudica a la estructura y función mesangial como se ha demostrado en distintos estudios; los podocitos regulan la función y estructura mesangial mediante la secreción de distintos factores humorales, por lo que su reducción

conllevaría una función mesangial deteriorada, proliferación mesangial y expansión de la MEC. (Lopez-Novoa et al, 2011). Por ejemplo, la exposición a angiotensina II y glucosa elevada aumentaría la producción de TGF- β 1 (Chen et al, 2004) y VEGF (Kang et al, 2006) por parte de los podocitos, y ambos factores activan las células mesangiales (Wang et al, 2004). 3º) La pérdida o separación de los podocitos de la membrana basal glomerular da lugar a glomeruloesclerosis (Wiggins, 2007). Además, la sobreexpresión del receptor AT1 de la angiotensina II en podocitos causa glomeruloesclerosis focal y segmentaria. También se ha observado que en la nefropatía diabética y en la nefropatía IgA, una disminución en el número de podocitos está correlacionada con un peor pronóstico (Lemley et al, 2002; Pagtalunan et al, 1997), por lo que el daño en los podocitos es crítico tanto en las podocitopatías como en las enfermedades que no se consideran específicas de estas células como la nefropatía IgA.

Transición epitelio-mesénquima

Es importante señalar que los podocitos no son células típicamente epiteliales, ya que carecen de algunos de los marcadores típicos epiteliales (expresan fundamentalmente P-cadherina en lugar de E-cadherina) y presentan algunas características mesenquimales como son la expresión de vimentina y α -SMA.

Se ha descrito que tras un daño la TEM y dediferenciación de los podocitos puede ser el primer paso que da lugar a preteínuria y glomeruloesclerosis en la mayoría de las glomerulopatías (May et al, 2014). La TEM puede ser iniciada en respuesta a mediadores circulantes como TGF- β 1 (Bottinger & Bitzer, 2002). Durante el proceso de TEM, los podocitos pierden su polaridad epitelial, el diafragma de filtración es alterado y se produce una reorganización del citoesqueleto de actina. Durante este proceso, tras la estimulación con TGF- β 1 los podocitos pierden la expresión de nefrina y de ZO-1, proteínas importantes en el diafragma de filtración; además se produce un aumento de marcadores mesenquimales como desmina o MMP9 (May et al, 2014). También, tras estimulación con TGF- β 1 los podocitos adoptan un fenotipo mesenquimal ya que producen colágeno I y fibronectina, mientras que en condiciones normales producen fundamentalmente colágeno tipo IV y laminina, que son componentes de la membrana glomerular (Li et al, 2008).

Debido a que los podocitos no son células típicamente epiteliales, algunos autores denominan este proceso como “transformación del podocito enfermo”.

3.2.4. Células endoteliales glomerulares

Las células endoteliales glomerulares responden a distintas señales y junto a las demás células glomerulares son responsables de la superficie del complejo tridimensional de la filtración glomerular.

Un daño en las células endoteliales glomerulares da lugar a diversas glomerulopatías y ERC. Este daño causa desde un aumento en la secreción de albumina a una marcada proteinuria con una filtración glomerular reducida y posterior fallo renal agudo. Además la disfunción endotelial origina vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo renal y por tanto disminución en la filtración glomerular (Obeidat & Ballermann, 2012).

3.3. Membrana basal glomerular

La membrana basal glomerular es una MEC especializada que soporta sus células adherentes, las células endoteliales glomerulares y los podocitos y separa la vasculatura del espacio urinario (figura 3). Se trata de una red fibrosa compuesta por laminina, colágeno tipo IV, nidógeno y proteoglicanos.

La membrana basal glomerular es un componente de la barrera de filtración glomerular. Tiene un papel importante en la comunicación celular que se produce en el glomérulo, lo que es esencial para un adecuado desarrollo y mantenimiento de la barrera de filtración glomerular. Así, los podocitos producen factores que son ligandos para receptores expresados por el endotelio glomerular (Scott & Quaggin, 2015). Existen distintos factores implicados en este proceso de comunicación célula-célula, entre los que se encuentran VEGF, angiopietinas y TGF- β 1.

La familia de VEGF incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario.

VEGF es angiogénico, antiapoptótico, quimiotáctico para monocitos y aumenta la permeabilidad vascular.

VEGF-A juega un papel importante en la regulación de la filtración glomerular. La regulación de la señalización de VEGF-A puede tener un papel terapéutico en la nefropatía diabética, microangiopatía trombótica, glomerulonefritis extracapilar y membranoproliferativa.

Existen diversos mecanismos por los que VEGF-A puede empeorar la progresión de la nefropatía diabética. Entre ellos se puede destacar que un exceso de VEGF-A en diabetes causa desaparición de los pies de podocitos y aumento de fenestraciones endoteliales que conllevan una alteración de la filtración glomerular (Veron et al, 2011); además VEGF-A estimula la activación de TGF- β 1 y la síntesis de colágeno IV en podocitos y células mesangiales y directamente induce la proliferación mesangial (Bartlett et al, 2016).

Aunque un estudio mostró que pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva o extracapilar tienen niveles elevados de VEGF tanto en suero como en orina (Nitta et al, 1999), otros estudios han demostrado que la pérdida de capilares en la glomerulonefritis está asociada con una reducción de VEGF-A (Yuan et al, 2002), y que la inhibición de la expresión de VEGF causa una proteinuria masiva. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden explicarse porque el daño en el endotelio puede inducir una liberación local de VEGF (Hara et al, 2006).

La **familia de las angiopoietinas (ANGPTs)** se une al receptor tirosina kinasa TIE2, expresado fundamentalmente en las células endoteliales. Las angiopoietinas son clave durante el desarrollo por su participación en la diferenciación de la vasculatura y en la angiogénesis. Las angiopoietinas y TIE2 están expresados en el riñón durante el desarrollo y están implicados en las nefropatías en las enfermedades glomerulares. Diversos estudios muestran una desregulación de la expresión de ANGPT1 y ANGPT2 en las enfermedades renales, observándose frecuentemente niveles elevados en suero de ANGPT2 y disminuidos de ANGPT1. De este modo, los niveles séricos de ANGPT2 pueden predecir la mortalidad en la ERC de pacientes y se han considerado un marcador de enfermedad cardiovascular en niños con diálisis crónica (Bartlett et al, 2016).

Es ampliamente conocido el papel de TGF- β 1 como mediador de la glomeruloesclerosis y la nefropatía diabética. Como ya se ha detallado previamente, niveles elevados de TGF- β 1 en la ERC están asociados con fibrosis intersticial así como pérdida de podocitos y expansión de la matriz mesangial (Bartlett et al, 2016).

3.4. Glomerulopatías primarias o glomerulonefritis

Las glomerulonefritis reúnen a un amplio grupo de glomerulopatías que presentan procesos inflamatorios de origen glomerular en los que intervienen de forma relevante

mecanismos inmunológicos. La patogenia de la mayoría de las glomerulonefritis se basa en cuatro mecanismos inmunitarios básicos: presencia de inmunocomplejos circulantes, inmunocomplejos formados in situ, activación de la vía alternativa del complemento y procesos mediados por células (Lopez-Novoa et al, 2011). El depósito glomerular de inmunocomplejos puede activar el complemento. Como consecuencia de su activación, se liberan fragmentos biológicamente activos y se ensambla un terminal común, el complejo de ataque a la membrana. Este complejo de ataque a la membrana es una estructura similar a un canal transmembrana, que puede llegar a lisar la célula o causar una lesión sublítica que produce la muerte por apoptosis o la secreción de mediadores de la inflamación (Avendaño, 2008).

Este tipo de glomerulopatías promueven cambios morfológicos en los podocitos que causan una filtración defectuosa y proteinuria (Greka & Mundel, 2012) acompañada por una marcada inflamación y fibrosis (Kurts et al, 2013), siendo su mayor consecuencia el síndrome nefrítico.

Tabla 1. Clasificación etiológica, histológica y clínica de las glomerulonefritis

GN agudas
GN proliferativa endocapilar (aguda postinfecciosa)
GN rápidamente progresivas
GN proliferativa extracapilar
GN crónicas
GN mesangiocapilar
GN proliferativas mesangiales
Nefropatía IgA
Nefropatía IgM
Enfermedad por cambios mínimos
GN focal y segmentaria
Nefropatía membranosa

En cuanto a su clasificación, quizás la más completa sea aquella que reúne una clasificación etiológica, clínica e histológica como se recoge en la tabla 1 (Avendaño, 2008).

3.4.1. Glomerulonefritis extracapilares

Las glomerulonefritis con proliferación extracapilar se caracterizan por la acumulación en forma circular de células en forma de semilunas (*crescents*, en inglés) que desplazan y ocupan estructuras normales del ovillo glomerular. Estas semilunas están formadas por varios tipos de células, entre las que destacan los macrófagos procedentes de los monocitos circulantes, que han pasado al espacio de Bowman a través de la pared capilar glomerular rota, células epiteliales de la capa parietal de la cápsula de Bowman así como podocitos desdiferenciados en el proceso de pérdida de sus marcadores de células maduras (Avendaño, 2008; Moeller et al, 2004). La lesión inicial que desencadena la formación de semilunas radica en la rotura de la membrana basal glomerular, que permite el paso de fibrina y monocitos al espacio de Bowman. Las semilunas aparecen cuando hay una rotura de la pared capilar y de la capa parietal de la cápsula de Bowman, que permite la entrada de proteínas plasmáticas, material inflamatorio y de fibroblastos al interior del espacio de Bowman. Esta solución de continuidad de la pared de los capilares permite el paso de ciertos elementos del plasma al espacio de Bowman, como son el fibrinógeno (esencial para la formación de las semilunas) y de varias citoquinas (IL-1 β) y factores de crecimiento (TNF- α) que estimulan la proliferación celular y la inflamación. También existen alteraciones de la inmunidad celular. Las semilunas evolucionan hacia la fibrosis, causando pérdida irreversible de la función renal (Avendaño, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que los podocitos, bajo ciertas condiciones pueden cambiar su fenotipo, proliferar y formar parte de las semilunas glomerulares y conducir ellos mismo este proceso de formación de semilunas mediante la expresión del gen Cxcr4 hasta dar lugar a la esclerosis glomerular (Ding et al, 2006).

Dentro de este tipo de glomerulonefritis, la clasificación más aceptada tiene en cuenta datos clínicos, serológicos e histológicos; según esta clasificación se pueden distinguir 4 tipos:

Tipo 1: glomerulonefritis asociadas con anticuerpos anti-membrana basal glomerular

Tipo 2: glomerulonefritis asociadas con complejos inmunes

Tipo 3: glomerulonefritis sin depósitos inmunes, con lesiones necrotizantes glomerulares

Tipo 4: glomerulonefritis combinación del tipo 1 y 3.

En todas ellas existen rasgos comunes, como la estructura de semilunas, la rotura de la pared capilar y el depósito de fibrinógeno/fibrina.

3.5. Perspectivas terapéuticas de las enfermedades glomerulares y líneas de investigación actuales

Tal como se ha explicado las enfermedades glomerulares poseen una serie de mecanismos patológicos que en la mayoría de los casos son comunes a distintas enfermedades (inflamación, mecanismos implicados en la pérdida de nefronas, disminución del filtrado glomerular, proliferación mesangial o pérdida de podocitos) siendo todos estos procesos dianas terapéuticas potenciales.

Al igual que ocurre con el tratamiento de la fibrosis renal, se han realizado muchos estudios con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y con inhibidores de los receptores de angiotensina (Lopez-Novoa et al, 2010) en los que se han encontrado efectos tanto en la prevención de la pérdida de podocitos (Macconi et al, 2009) como en la disminución de la proteinuria (Fukuda et al, 2009). Asimismo, PDGF también ha sido objeto de estudio para el tratamiento de estas nefropatías.

Actualmente está ampliamente aceptado que el daño en los podocitos es un proceso común en muchas enfermedades renales que causa proteinuria por lo que existen numerosos estudios para disminuir esta proteinuria basados en disminuir el daño, pérdida o separación de los podocitos (Reiser & Sever, 2013). Entre los compuestos habitualmente más utilizados por sus acciones antiinflamatorias o inmunoterapéuticas y que presentan los mejores resultados se encuentran los glucocorticoides, mineralocorticoides, el inhibidor de mTOR (sirolimus, que se une al complejo mTORC1), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y de sus receptores, o eritropoyetinas como darbepoetina, a los que se les han atribuido efectos directos sobre los podocitos no conocidos inicialmente (Mathieson, 2011). Por ejemplo, la dexametasona tiene un potente efecto en la estructura y función de los podocitos (Ransom et al, 2005; Xing et al, 2006) y previene su apoptosis (Wada et al, 2005). Otros autores han comprobado que la activación de mTORC1 está aumentada en la nefropatía diabética y que la reducción específica de su expresión en los podocitos de animales diabéticos inhibe el desarrollo de la nefropatía diabética (Inoki et al, 2011).

De este modo, cualquier intervención que pueda estabilizar el citoesqueleto de actina de los podocitos, promover su recuperación o reemplazar los podocitos dañados sería una potencial estrategia terapéutica en los estados que cursan con proteinuria; el desafío reside en dirigir selectivamente dichos efectos a los podocitos. Por ejemplo, HGF tiene efectos reparadores en podocitos dañados por adriamicina tanto *in vivo* como *in vitro* (Kato et al, 2011). El interferón β reduce la proteinuria en diferentes modelos experimentales de glomerulonefritis sin afectar aparentemente la inflamación y tiene efectos marcados en podocitos humanos *in vitro* (Satchell et al, 2007). También se ha observado que la inhibición de diferentes quinasas protege los podocitos *in vivo* e *in vitro* (Kang et al, 2010; Ma et al, 2010).

Como se ha detallado anteriormente la familia de VEGF juega un papel importante en el desarrollo de algunas enfermedades glomerulares como la nefropatía diabética, por lo que existen diversos estudios en los que sus isoformas son dianas terapéuticas para dicha enfermedad (Bartlett et al, 2016; Gnudi et al, 2015).

4. Cardiotrofina-1 (CT-1)

4.1. Expresión y estructura molecular

La cardiotrofina-1 (CT-1) fue caracterizada y descrita en 1995 por Pennica y colaboradores como una proteína de 21,5 kDa capaz de producir hipertrofia en cardiomiocitos (Pennica et al, 1995a).

Se trata de un mediador de comunicación celular que pertenece a la familia de la IL-6, junto con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M, el factor neurotrófico ciliar, citoquina similar a la cardiotrofina, IL-11, IL-31, IL-27 y la neuropoietina/cardiotrofina-2 (Kishimoto et al, 1995; Pennica et al, 1995a). Los miembros de esta familia, aunque tienen estructuras terciarias parecidas conteniendo 4 hélices anfipáticas, son muy distintos en cuanto a la secuencia primaria de aminoácidos (15-20% aminoácidos idénticos). Esta familia de citoquinas también son llamadas citoquinas-GP130 ya que comparten una subunidad común en su complejo receptor, la glicoproteína 130 (GP130), encargada de transducir la señal al interior de la célula (Heinrich et al, 2003). Además, constan de una segunda o tercera subunidad que juega un importante papel en la formación del complejo receptor.

Poseen efectos pleiotrópicos y redundantes en el organismo y participan en diferentes respuestas biológicas, incluyendo la respuesta inmune, inflamación, desarrollo neuronal y hematopoyesis. Además activan genes involucrados en diferenciación, crecimiento, supervivencia, apoptosis y proliferación (García-Cenador et al, 2013a).

El gen que codifica la CT-1 humana fue aislado en 1996 por Pennica y colaboradores y lo localizaron en el brazo corto del cromosoma 16, en la región 16p11.1-16p11.2. con un tamaño de 6-7 kb, compuesto por 3 exones y 2 intrones (Pennica et al, 1996b).

En el ratón, dicho gen está localizado en el cromosoma 7F3, compuesto por 3 exones y 2 intrones y con un tamaño de 5,4 kb (Funamoto et al, 2000). La secuencia de aminoácidos entre ratón y rata tiene una homología del 94%, mientras que la homología con humano es del 80% (Ishikawa et al, 1996).

En el ratón adulto el ARNm tiene un tamaño de 1,4 kb y se encuentra expresado en corazón, músculo esquelético, hígado, pulmón y riñón, encontrándose niveles más bajos en testículos y cerebro (Pennica et al, 1995a).

En el humano adulto el ARNm (1,7 kb) presenta elevados niveles de expresión constitutiva en el corazón, músculo esquelético, próstata y ovarios, niveles menores en pulmón, riñón, páncreas, timo, testículos e intestino delgado y poca expresión en cerebro, placenta, hígado, bazo, colon y en leucocitos de sangre periférica. El patrón de expresión es similar al de ratón y rata (Ishikawa et al, 1996; Pennica et al, 1995a), salvo en el hígado donde es mayor en ratón que en humano. También se ha observado una fuerte expresión en corazón, pulmón y riñón en fetos humanos (Pennica et al, 1995b) y recientemente se encontró expresión en tejido adiposo (Natal et al, 2008).

4.2. Complejo receptor de CT-1

La señalización de CT-1 requiere la formación de un heterocomplejo formado por 3 proteínas transmembranas altamente glicosiladas que son: GP130, la subunidad β del receptor de LIF (LIFR β) también llamada glicoproteína 190 (GP190) y un tercer componente denominado subunidad α del receptor CT-1 (CT-1R α). La unión de CT-1 a sus receptores causa la heterodimerización de GP130 y LIFR β (Skiniotis et al, 2008) (figura 4).

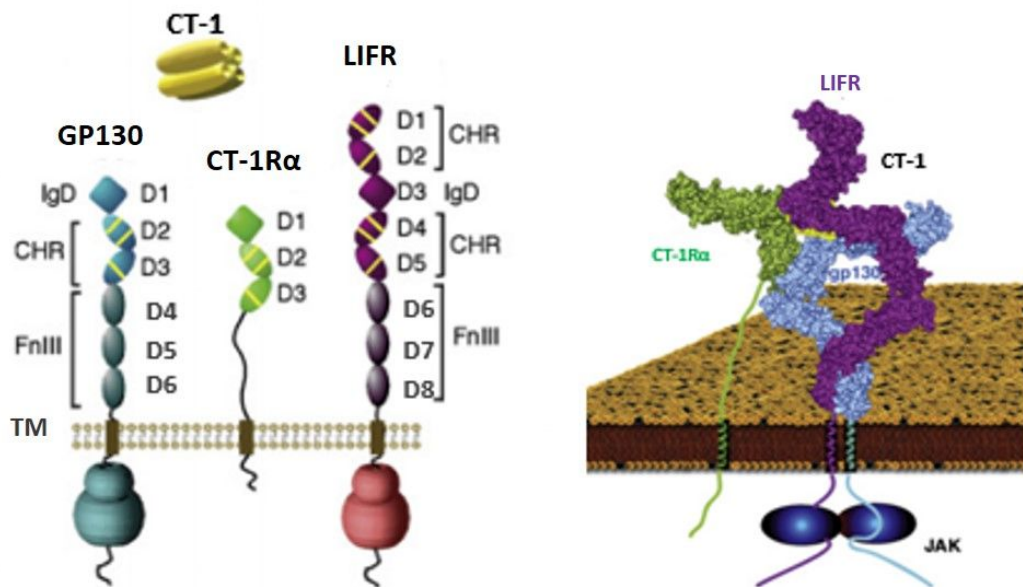


Figura 4. Unión de la CT-1 a un complejo trimérico de receptores que activa la cascada de señalización, formado por los receptores GP130, CT-1Rα y LIFRβ. (Modificada de (Skiniotis et al, 2008)). CHR: regiones homólogas de unión a citoquina, CT-1: cardiotrofina-1, D: dominio, FNIII: fibronectina tipo III, GP130: glicoproteína 130, IgD: dominio Ig, JAK: janus quinasa, LIFR: receptor del factor inhibidor de leucemia, TM: transmembrana.

GP130

Forma parte del receptor y se encarga de iniciar el mecanismo de acción (Fischer & Hilfiker-Kleiner, 2008).

Consta de (Figura 4):

- Dominio extracelular: dividido en seis dominios diferentes: un dominio *Ig-like* (D1); dominio CHR (regiones homólogas de unión a la citoquina) que comprende dos dominios fibronectina tipo III (FNIII) (D2-D3); tres dominios FNIII adicionales (D4-D6). La unión del ligando a la subunidad del receptor GP130 tiene lugar a través de los dominios D1-D3. Los dominios D4-D6 no juegan un papel importante en el reconocimiento del ligando, pero son necesarios para su señalización.
- Dominio transmembrana (TM).

- Región citoplasmática: necesaria para la unión a JAK 1 y 2 y la transducción de señales al interior celular (Skiniotis et al, 2008).

Receptor del factor LIF (LIFR β) o glicoproteína 190 (GP190)

Es la subunidad transductora de la señal al interior celular; no es específica de CT-1, es compartida por receptores de otras citoquinas de esta familia. Su estructura se diferencia de la de GP130 en que tiene dos dominios CHR (D1-D2 y D4-D5) añadidos al dominio Ig y tres dominios FNIII (D6-D7-D8) (figura 4) (Pennica et al, 1996b).

CT-1R α

CT-1R α , también denominado GP80R debido a que su peso molecular es de 80 kDa, es la subunidad α específica de la citoquina y carece de capacidad de enviar señales al citoplasma (Robledo et al, 1997). La presencia de este receptor adicional específico para CT-1 fue descubierto en células neuronales (Pennica et al, 1996a). Confiere una alta potencia trófica en la señalización de las motoneuronas; sin embargo, se cree que este componente adicional no es requerido en otro tipo de células como por ejemplo en los cardiomiocitos (García-Cenador et al, 2013a; Lopez-Yoldi et al, 2015).

4.2.1. Activación del complejo receptor

Tras la unión de CT-1, se produce la fosforilación de los residuos tirosina de GP130 y LIFR β , lo que indica que la señalización de CT-1 tiene lugar a través del heterodímero GP130/LIFR β . Esta activación de GP130 tiene lugar manera secuencial. Al interactuar CT-1 con su receptor específico (CT-1R α), el complejo binario formado (CT-1/CT-1R α) es competente para unirse a GP130 formando un complejo trimolecular intermedio sin capacidad de señalización.

Este complejo trimolecular promueve la heterodimerización de GP130, LIFR y CT-1R α (Wollert et al, 1996) provocando cambios bioquímicos en el interior de la célula que inducen una serie de señales intracelulares que dan lugar a la activación de distintas cascadas de señalización.

4.3. Vías de señalización y su implicación

La unión de CT-1 a GP130 desencadena la activación de tres vías de señalización: JAK/STAT, MAPK/ERK1/2 y PI3K/AKT (figura 5).

- **JAK/STAT (Janus quinasa/Transductor de señal y activador de transcripción)**

Se trata de una vía de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo que tiene lugar con gran rapidez. La activación de esta vía se inicia por la unión de CT-1 a sus receptores y depende de la activación de las proteínas intracelulares janus quinasa (JAK-1, JAK-2 y Tyk2) y del grupo de factores de transcripción citosólico (STAT1, STAT3, STAT5).

Tras la unión de CT-1 a su receptor, tiene lugar un cambio conformacional en este, permitiendo la aproximación de las JAKS, lo que da lugar a su transactivación (fosforilación recíproca en residuos tirosina). Las JAKS, una vez activadas van a fosforilar tanto al receptor (en su dominio intracelular) como a las STATs. Esta fosforilación induce el reclutamiento del factor de transcripción STAT3 que se unirá mediante su dominio SH2 a los residuos de fosfotirosina de GP130 (Hendry & John, 2004).

En ausencia de estimulación, las STATs se encuentran transcripcionalmente inactivas, latentes en el citoplasma. Tras ser fosforiladas por las JAKS mediante la fosforilación de sus residuos tirosinas conservados (en el caso de STAT3 en la tirosina 705 y en la Ser 727), se produce la dimerización con otros STATs formando homo o heterodímeros a través de sus dominios SH2. De este modo, cuando STAT1 o STAT3 se unen a los receptores (LIFR β o GP130) que han sido fosforilados en residuos tirosina, son fosforilados y forman dímeros STAT1-STAT1, STAT1-STAT3 o STAT3-STAT3. Estos dímeros se comportan como factores de transcripción, ya que se translocan al núcleo para unirse a promotores específicos en el ADN genómico, y estimulan la transcripción de diferentes genes. Una vez desfosforilados se inactivan y vuelven al citoplasma (Bhattacharya et al, 2005).

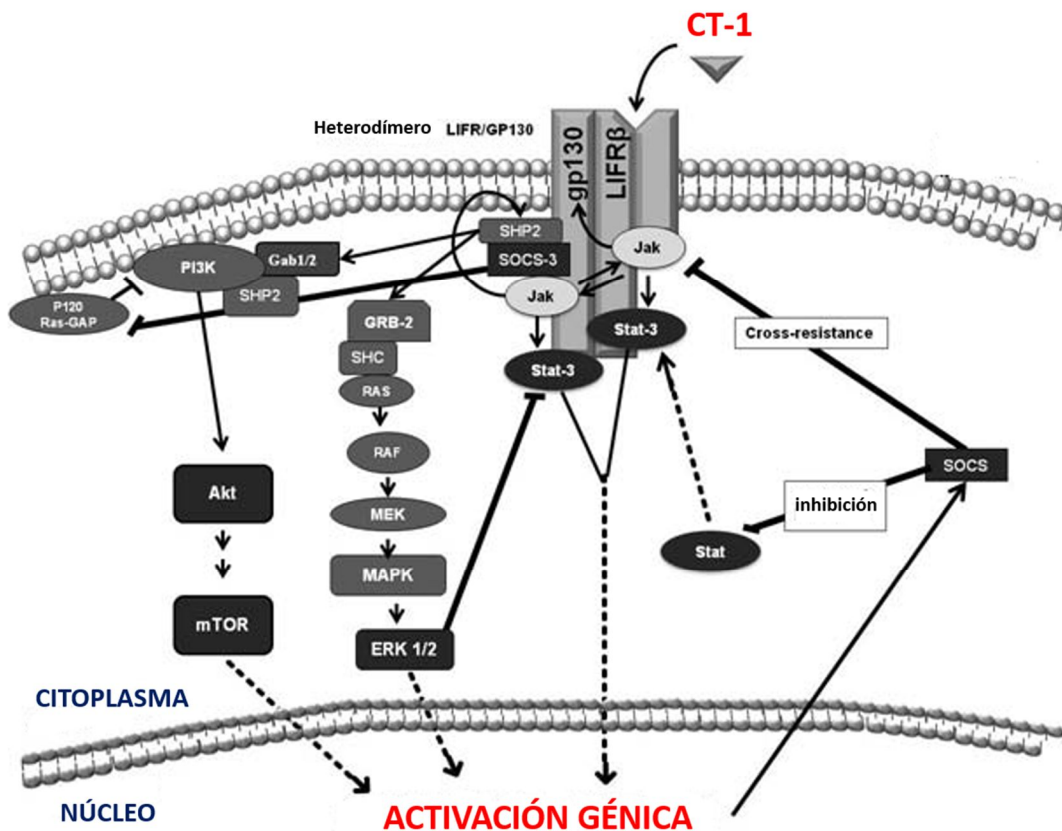


Figura 5. Vías de señalización intracelulares activadas por la CT-1. (Modificada de (García-Cenador et al, 2013a)). AKT: proteína quinasa B, CT-1: cardiotrofina-1, ERK1/2: proteína quinasa regulada por señales extracelulares, Gab1/2: proteína de unión asociada a GRB2, GP130: glicoproteína 130, GRB2: proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2, JAK: janus quinasa, LIFR: receptor del factor inhibidor de leucemia, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MEK: MAP quinasa/ERK1/2, mTOR: diana mecánica de rapamicina, PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, Ras: rat sarcoma, SHC: proteína adaptadora de la señalización, SHP2: proteína tirosina-fosfatasa 2C, SOCS: supresores de señalización de citoquinas, STAT: transductor de señal y activador de transcripción.

El reclutamiento de un único grupo de STAT para cada familia de receptores de citoquinas supone un hecho importante para definir la especificidad de la respuesta biológica. Mientras que algunos receptores de citoquinas tienen sólo un punto de unión para STAT, otros poseen más de un sitio de anclaje. La presencia de más de un sitio de unión permite que dos moléculas de STAT puedan ser activadas simultáneamente facilitando la dimerización. Las JAKS son las que proporcionan el sitio de unión para las STAT (Fujitani et al, 1997).

Es importante destacar las vías de regulación de la vía JAK/STAT, ya que su falta de regulación puede ser clave en la patogénesis de distintas enfermedades. Existen 3 familias principales de reguladores negativos de esta vía de señalización: proteína fosfatasa de residuos

tirosina (PTPs), familia de supresores de señalización de citoquinas (SOCS) y proteína inhibidora de las STATs (PIAS).

La activación de la vía JAK/STAT está implicada en la regulación de la inflamación, apoptosis, estrés oxidativo y proliferación celular (Garcia-Cenador et al, 2013a) mediante la transducción de señales de protección contra la respuesta inflamatoria (Chen et al, 2007), protección frente a la isquemia (Negoro et al, 2000) y frente al estrés oxidativo (Negoro et al, 2001) y promoviendo la angiogénesis.

La activación de esta vía influye en la regulación de la inflamación: dependiendo de la citoquina que la active, o de las STATs que participen, puede promover una respuesta inflamatoria o antiinflamatoria. Los efectos de IL-6 están mediados por los homodímeros p-STAT3/p-STAT3 o los heterodímeros p-STAT3/p-STAT1. Se ha comprobado que si la activación de STAT3 a través de IL-6 es mantenida, puede activar la transcripción de genes antiinflamatorios como IL-10 (Murray, 2007).

Además, la señalización mediada por STAT3 está involucrada en una respuesta antiapoptótica a través de la síntesis de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (linfoma de células B 2) y Bcl-xl (linfoma extra-grande de células B) (Bhattacharya et al, 2005); también se ha visto que la disminución de la activación de caspasa-3 observada en un modelo animal de daño hepático estaba asociada con una disminución de la activación de STAT3 (Marques et al, 2007), lo que pone de manifiesto la importancia de esta vía en la regulación de la apoptosis.

Por otra parte, la activación de dicha vía también participa en la hipertrofia de miocardio e hígado y en la activación de genes en respuesta a factores de crecimiento que aumentan la proliferación celular (Garcia-Cenador et al, 2013a).

- **ERK1/2 (proteína quinasa regulada por señales extracelulares)**

Otra de las vías que puede activar la CT-1 tras la unión a sus receptores es la vía de señalización p42/44 MAPK, también conocida como ERK1/2 (Tian et al, 2004). La estimulación celular que da lugar a la fosforilación de GP130, tras la unión de CT-1 a GP130, también induce la unión de la tirosina fosfatasa SHP2 provocando la activación secuencial de SHP2, Ras, Raf, MAP quinasa/ERK1/2 (MEK) y ERK1/2.

La vía MAPK es directamente responsable de la fosforilación y activación de NF-IL6 (factor nuclear IL-6), un factor que participa en la señal de traducción de citoquinas (Nakajima et al, 1993).

Existen cuatro grupos de MAPK: ERK (ERK1/2), p38, JNK y ERK5. Una vez translocadas al interior del núcleo, activan factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en una gran variedad de procesos celulares como son diferenciación celular, motilidad, proliferación y apoptosis. ERK1/2 se ha relacionado fundamentalmente con proliferación, diferenciación y supervivencia, y JNK y p38 con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque también pueden mediar proliferación. La señalización a través de ERK1/2 favorece la supervivencia celular evitando la apoptosis inducida por la fosforilación de Bad, que con frecuencia libera Bcl-xl en el citosol, pudiendo ejercer así sus efectos antiapoptóticos (Fang & Richardson, 2005).

- **PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3 quinasa/Proteína quinasa B)**

Otra de las vías que activa la unión de CT-1 a sus receptores es la vía PI3K-AKT.

Tras la unión de CT-1 al receptor, éste se activa y fosforila PI3K, dando lugar a un rápido incremento de los niveles de su actividad. La activación de AKT por PI3K causa la fosforilación de diversos sustratos involucrados en crecimiento celular, supervivencia, proliferación y apoptosis (Scheid et al, 2002).

Está sobradamente descrita la implicación de esta vía en la inhibición de la señal apoptótica, y de este modo, los sustratos de AKT incluyen la inactivación de mediadores proapoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, p53) y la activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y mTOR). Esta vía puede ser activada por un gran número de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento.

Bad es un miembro de la familia de Bcl-2 y es un regulador importante de la señal de supervivencia. Bad inactivo dimeriza con las proteínas Bcl-x o Bcl-2 neutralizando su actividad antiapoptótica. La fosforilación de Bad producida por la activación de AKT conlleva la liberación de Bcl-2 o Bcl-xL que suprimen la vía de apoptosis. Por tanto, la fosforilación de BAD supone la supresión de la vía de apoptosis (Kuwahara et al, 2000).

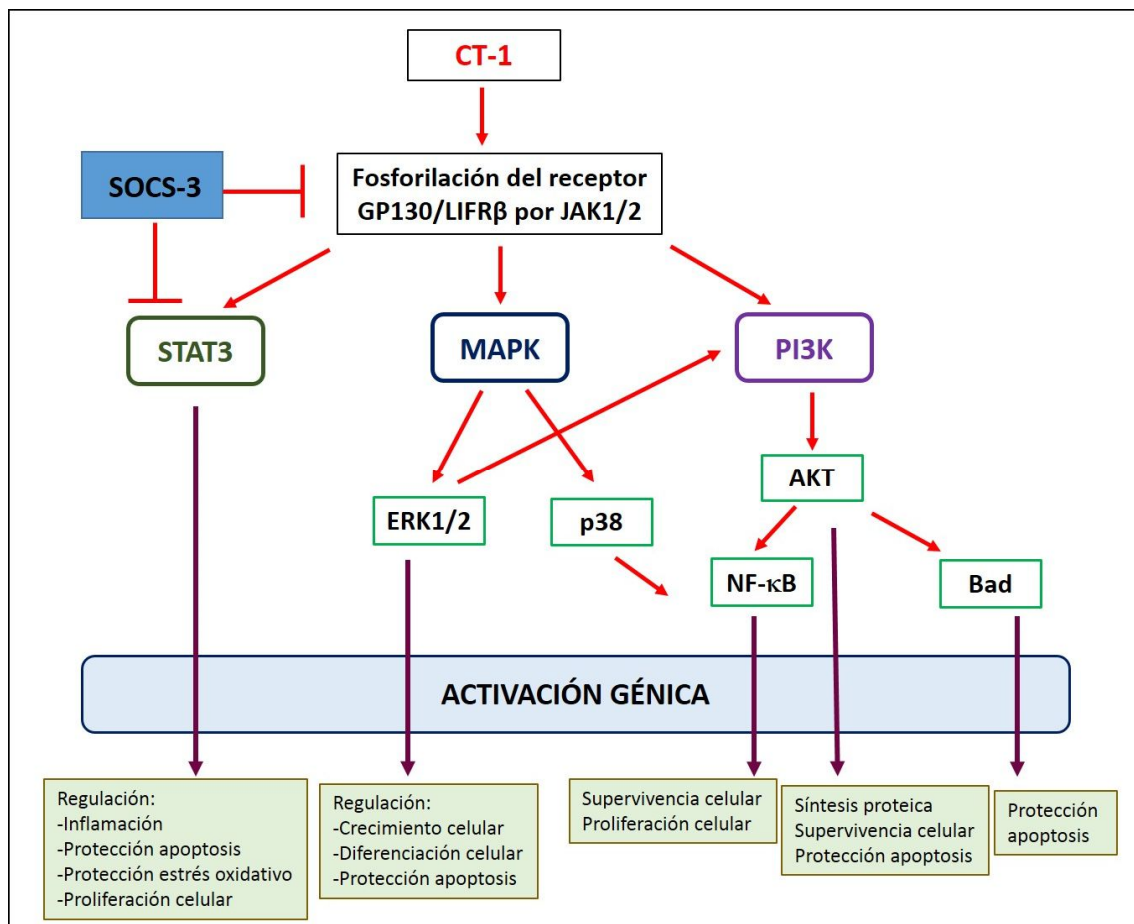


Figura 6. Principales efectos producidos por la activación de las vías de señalización de la CT-1. AKT: Proteína quinasa B, Bad: agonista de muerte celular asociado a Bcl-2, CT-1: cardiotrofina-1, ERK1/2: proteína quinasa regulada por señales extracelulares, GP130: glicoproteína 130, JAK: janus quinasa, LIFR β : subunidad β del receptor del factor inhibidor de leucemia, MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos, NF- κ B: factor de transcripción nuclear- κ B, p38: proteína quinasa 14 activada por mitógenos, PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, SOCS-3: supresor de señalización de citoquinas 3, STAT3: transductor de señal y activador de transcripción 3.

También se ha relacionado la activación de esta vía con la patogénesis de distintas enfermedades entre las que se incluye la fibrosis renal (Grande et al, 2010a) y el cáncer (Franke et al, 2003).

Por otro lado, la CT-1 activa NF- κ B en cardiomiocitos, monocitos y células endoteliales de la vena umbilical (García-Cenador et al, 2013a), sin embargo, en modelos experimentales *in vivo* de daño cardíaco (Takahashi et al, 2005) o renal (García-Cenador et al, 2013b) se ha demostrado que la administración de CT-1 disminuye la actividad de NF- κ B; por lo que no hay consenso sobre la acción de CT-1 sobre NF- κ B.

Tal y como se observa en la figura 6, es probable que los efectos de CT-1 se originen por una combinación de todas estas rutas descritas.

4.4. Efectos de la cardiotrofina-1

Como se ha detallado anteriormente, la CT-1 presenta una gran variedad de funciones a través de distintas vías de señalización y a veces con efectos opuestos.

La mayoría de los efectos descritos de la CT-1 son efectos protectores, sin embargo en algunos órganos la CT-1 tiene tanto efectos protectores como patológicos, y estos efectos opuestos podrían ser dependientes de la dosis y del tiempo de exposición (García-Cenador et al, 2013b).

Así, un estudio ha demostrado que la exposición crónica a niveles muy elevados de CT-1 está asociada a fibrosis cardiaca, renal y vascular (Lopez-Andres et al, 2012); en otro estudio se ha demostrado que la administración crónica de CT-1 podría acelerar la disfunción contráctil en cardiomiocitos mientras que la administración aguda de dosis fisiológicas está asociada con una preservación de esta función contráctil (Zolk et al, 2005). Estos efectos perjudiciales sólo aparecen cuando se mantienen niveles elevados de CT-1 en plasma ya sea por sobreproducción natural o cuando es administrada a altas cantidades, y no se han observado tras la administración de dosis bajas (García-Cenador et al, 2013a).

Aunque muchos de sus efectos se han descrito en el corazón, se ha llevado a cabo una extensa investigación sobre su papel en otros órganos como el riñón, hígado o sistema nervioso (García-Cenador et al, 2013a; Lopez-Yoldi et al, 2015).

4.4.1. Principales mecanismos protectores de la CT-1

El efecto protector que ejerce la CT-1 en distintos órganos podría ser explicado por su papel en la proliferación celular y apoptosis, inflamación, estrés oxidativo y regulación del metabolismo celular.

- **Inflamación**

La administración de CT-1 disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α o IL-1 β), de otros factores implicados en la respuesta inflamatoria como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), moléculas de adhesión o marcadores de macrófagos y disminuye la

acumulación de neutrófilos en distintos modelos experimentales tanto en corazón (Benigni et al, 1996), hígado (Aguilar-Melero et al, 2013), riñón (Garcia-Cenador et al, 2013b) o pulmón (Pulido et al, 1999). Por el contrario, en dos estudios *in vitro* en células endoteliales se ha observado que la administración de CT-1 produce un aumento en la migración y adhesión celular, debida en parte al aumento de actividad de NF- κ B (Fritzenwanger et al, 2008; Ichiki et al, 2008).

CT-1 induce la síntesis de IL-6 en células endoteliales, epiteliales y monocitos. Se han descrito distintos procesos en los que niveles elevados de IL-6 pueden tener efecto protector en el daño celular (Jung et al, 2011; Mauer et al, 2015). Además se ha demostrado que el aumento de IL-6 debido a la administración de CT-1 juega un papel antiinflamatorio y protector en un modelo de nefropatía inducida por gentamicina (Quiros et al, 2016) o tras isquemia/reperfusión (Garcia-Cenador et al, 2013b).

La activación de NF- κ B puede dar lugar tanto a efectos proapoptóticos como antiapoptóticos ya que la traslocación de p65 al núcleo puede inducir la expresión de genes pro o antiapoptóticos (Barnes & Karin, 1997; Ghosh & Hayden, 2008), pero también genes como TNF- α , causando apoptosis en las células endoteliales (Xu et al, 2011). La activación de NF- κ B también puede mediar efectos pro o antiinflamatorios (Sanz et al, 2010). De este modo se observó que aunque en cardiomiocitos el efecto antiapoptótico de la CT-1 estaba asociado con una activación de NF- κ B (Craig et al, 2001), en un modelo de daño renal tras isquemia/reperfusión este efecto antiapoptótico y antiinflamatorio estaba asociado con una disminución de la activación de NF- κ B (Garcia-Cenador et al, 2013b).

- **Proliferación y apoptosis**

La apoptosis juega un papel fundamental en el daño tanto isquémico como no isquémico en diversos órganos, entre los que se incluye el corazón, hígado, riñón y el sistema nervioso.

Parte de los efectos protectores observados en el hígado y en el corazón se deben a un aumento de la proliferación celular tras el daño producido en estos órganos (Freed et al, 2005; Yang et al, 2008b).

Se ha demostrado el efecto antiapoptótico de la CT-1 en diferentes modelos de daño tisular en corazón (Ruixing et al, 2004; Ruixing et al, 2007), neuronas (Peng et al, 2010), células

de músculo liso vascular (Zhou et al, 2003), hígado (Aguilar-Melero et al, 2013; Iniguez et al, 2006) y riñón (Garcia-Cenador et al, 2013b; Quiros et al, 2013).

Como se ha descrito anteriormente, las vías de PI3K/AKT, JAK/STAT, ERK1/2 y la regulación de la activación de NF- κ B son las principales rutas por las que la CT-1 ejerce su efecto antiapoptótico.

- **Estrés oxidativo**

Un mecanismo por el que la CT-1 puede ejercer sus efectos protectores en distintos órganos como el corazón, hígado, riñón y sistema nervioso es mediante la disminución del estrés oxidativo (Garcia-Cenador et al, 2013a).

El mecanismo por el que la CT-1 ejerce esta función se basa en que la activación de la vía de señalización GP130/STAT3 aumenta la expresión de superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) también conocida como SOD2, una enzima que transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, que resulta menos dañino (Negoro et al, 2001).

- **Metabolismo energético**

Se ha descrito que la CT-1 tiene un papel regulador en el metabolismo energético mediado por la activación de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (Moreno-Aliaga et al, 2011).

Estudios realizados en hígado y tejido adiposo muestran que la administración de CT-1 induce una disminución de la lipogénesis y un aumento de la oxidación de ácidos grasos. También, la CT-1 puede regular el metabolismo de la glucosa y aumentar la sensibilidad a la insulina (Lopez-Yoldi et al, 2015).

En estudios en pacientes se ha observado que individuos con sobrepeso u obesidad tienen niveles más bajos de CT-1 en plasma que aquellos con peso normal (Hung et al, 2015).

4.4.2. Efectos de la CT-1 en el sistema cardiovascular

En el corazón la CT-1 es sintetizada principalmente por cardiomiocitos y secretada hacia la circulación periférica (Asai et al, 2000).

Se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* que la CT-1 participa en el desarrollo cardiaco. Además la CT-1 está involucrada en diferentes funciones: protege el miocardio, induce efectos hemodinámicos (causa hipotensión sistémica dosis dependiente (Jin et al, 1998)) y tiene propiedades endocrinas (estimula la secreción del péptido natrurético tipo A y tipo B (Hamanaka et al, 2000)). La CT-1 también está involucrada en patologías cardiovasculares como hipertensión, enfermedades valvulares, fallo cardíaco y enfermedades de arterias coronarias (Latchman, 1999), y la administración crónica de CT-1 produce hipertrofia cardiaca (Freed et al, 2003b).

Efectos cardioprotectores

Los efectos protectores de la CT-1 se descubrieron hace aproximadamente dos décadas. El primer estudio demostraba que la administración de CT-1 produce una mejora en el daño originado en cardiomiocitos tras isquemia/reperfusión aumentando su supervivencia y disminuyendo la apoptosis (Stephanou et al, 1998). Desde entonces, diversos estudios experimentales han confirmado el papel protector de la CT-1 como factor de supervivencia cardiaca y promotor de la proliferación de cardiomiocitos tanto *in vivo* (Jin et al, 1996) como *in vitro* (Brar et al, 2001a; Liao et al, 2002).

Se ha observado un aumento de la expresión de CT-1 en diversas situaciones fisiopatológicas de hipoxia cardiaca, entre las que se incluyen angina de pecho, infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca, donde la CT-1 parece ejercer un efecto protector en dichos procesos (Freed et al, 2003a).

Durante el infarto de miocardio aumenta la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) (Berg et al, 2005) y se ha descrito que la hipoxia y los RLO generados podrían regular la expresión de CT-1; a su vez, la CT-1 activa las vías de señalización MAPKs y PI3K a través de los RLO (Ateghang et al, 2006).

Estudios en modelos experimentales de infarto de miocardio revelan que la expresión de CT-1 está aumentada en la zona del infarto así como se observa una elevada expresión de CT-1 en la zona de miocardio viable en la fase crónica de restauración del daño (Freed et al, 2003a). Se ha descrito en modelos de ratas con isquemia de miocardio que la CT-1 juega un papel muy importante en la reparación del tejido y su cicatrización (Freed et al, 2005).

Los efectos antiapoptóticos de la CT-1 que se llevan a cabo en este proceso requieren la activación de ERK1/2 (Brar et al, 2001a; Liao et al, 2002). Los efectos cardioprotectores de la CT-1 también están asociados con otros mediadores moleculares, incluyendo activación de proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90) (Stephanou et al, 1998), inducción del eje PI3K/AKT/Bad (Kuwahara et al, 2000), activación de p38MAPK y NF- κ B (Craig et al, 2000) y reducción del estrés oxidativo vía MnSOD (Lopez-Diez et al, 2005). La activación de la vía JAK/STAT protege a los cardiomiocitos frente al daño por isquemia/reperfusión reduciendo la producción de RLO (Oshima et al, 2005); sin embargo, STAT3 no participa en el proceso antiapoptótico llevado a cabo por CT-1 en cardiomiocitos (He-nan et al, 2009).

El primer efecto descrito de la CT-1 sobre los cardiomiocitos fue el hipertrófico (Pennica et al, 1995a); sin embargo los mecanismos exactos por los que lleva a cabo esta función no están muy claros. La activación de la vía JAK/STAT fue considerada responsable de este efecto hipertrófico (Railson et al, 2002; Tian et al, 2004). También hay estudios que implican la vía MEK5/ERK en esta respuesta hipertrófica (Takahashi et al, 2005). Además se ha descrito que los efectos hipertróficos de la CT-1 en las células cardíacas son en parte dependientes de la síntesis de hsp56 a través de la activación de JAK/STAT, MEK/ERK y PI3K/AKT (Jamshidi et al, 2004). ERK1/2 inhibe la fosforilación de STAT3 pudiendo actuar como regulador negativo en la respuesta hipertrófica inducida por CT-1 (Tian et al, 2004). En otro estudio reciente se ha descrito GATA 4 (miembro de los factores de transcripción zinc finger GATA) como un inductor de la hipertrofia cardíaca inducida por CT-1 (He-nan et al, 2009); también se le ha atribuido a GATA 4 un papel en la regulación de la apoptosis y supervivencia de cardiomiocitos a través de la fosforilación de ERK1/2 (Kitta et al, 2003; Oka et al, 2006).

Como se resume en la figura 7 la CT-1 utiliza vías divergentes para la regulación de hipertrofia y supervivencia.

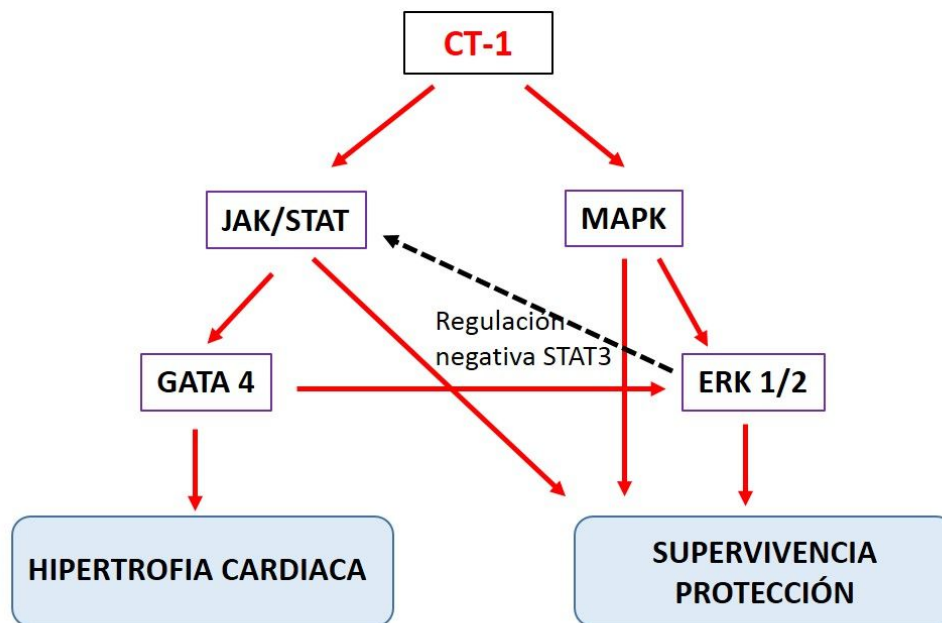


Figura 7. Vías de señalización mediante las cuales la CT-1 podría llevar a cabo sus efectos en hipertrofia y supervivencia. MAPK/ERK juega un papel esencial en la función de supervivencia de la CT-1. La CT-1 media sus efectos antiapoptóticos por GATA 4 y por otras vías que tienen sus efectos a través de ERK1/2. Las vías de señalización STAT3 y ERK tienen diferentes papeles en procesos hipertróficos y antiapoptóticos mediados por CT-1. CT-1: cardiotrofina-1, ERK1/2: proteína quinasa regulada por señales extracelulares, GATA: factor de transcripción de eritrocitos, JAK: janus quinasa, MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos, STAT: transductor de señal y activación de transcripción.

También se ha descrito un aumento de expresión de CT-1 en los ventrículos de ratas genéticamente hipertensas (Ishikawa et al, 1999). En humanos, se han observado niveles elevados de CT-1 en pacientes con fallo cardíaco (Talwar & Choudhary, 2003) y en enfermedad cardíaca hipertensiva. Mientras que algunos estudios han mostrado una asociación entre la CT-1 circulante y la estructura y función ventricular (Gonzalez et al, 2005), otros estudios no han podido confirmarlo (Zile et al, 2011).

4.4.3. Efectos de la CT-1 en el hígado

En el hígado se expresa el ARNm de CT-1 tanto en hepatocitos como en células no parenquimales (Marques et al, 2007). Diversos estudios han mostrado que la CT-1 es un factor esencial en la defensa del hígado frente a diversos daños debido mayoritariamente a su función antiapoptótica e inductora de reparación celular (García-Cenador et al, 2013a; Lopez-Yoldi et al, 2015). Además, la exposición a agentes pro-oxidantes causa una liberación de CT-1 por parte de los hepatocitos.

Los ratones CT-1^{-/-} tienen mayor susceptibilidad frente al daño producido por isquemia/reperfusión y por un estímulo apoptótico que los ratones control (Iniguez et al, 2006; Marques et al, 2007). En el estudio de Marqués y colaboradores se muestra que los ratones CT-1^{-/-} son más sensibles a la muerte por apoptosis mediada por Fas que los ratones control, debido en parte a la deficiente activación de STAT3 y al inadecuado control de la actividad calpaína durante los procesos apoptóticos (Marques et al, 2007). Por tanto, la CT-1 endógena parece tener un papel protector natural contra la apoptosis y la isquemia/reperfusión, pudiendo tener un potencial terapéutico importante.

De acuerdo a estos resultados, se ha mostrado que la administración de CT-1 protege frente al daño producido por isquemia/reperfusión (Iniguez et al, 2006), frente al fracaso hepático fulminante producido por galactosamina (Ho et al, 2006), y frente a la hepatitis de origen vírico (Tunon et al, 2011). La administración de un adenovirus que expresa CT-1 en ratas con trasplante de hígado mejora la función del hígado y la supervivencia de los injertos debido a una disminución de la apoptosis mediante la activación de las vías de señalización ERK1/2, AKT y STAT3 (Song et al, 2008). La CT-1 mejora la regeneración de hígados cirróticos a través del aumento de la angiogénesis y la proliferación celular (Yang et al, 2008b).

En las células hepáticas, la CT-1 activa vías de señalización esenciales para ejercer su acción protectora y antiapoptótica como son STAT3, ERK y AKT. Estos datos indican que la CT-1 podría ser evaluada como molécula hepatoprotectora en situaciones de daño hepático agudo. Recientemente, se ha indicado que la administración de CT-1 elimina la esteatosis de ratones con enfermedad hepática grasa no alcohólica, y dicho efecto está mediado por la activación de AMPK, supresión de lipogénesis y estimulación de oxidación de ácidos grasos (Castano et al, 2014).

4.4.4. Efecto de la CT-1 en el sistema nervioso

La CT-1 juega un papel fundamental en el desarrollo del tejido neural y en la protección del sistema nervioso maduro frente a una gran variedad de daños y disfunciones (Lopez-Yoldi et al, 2015).

Se trata de la única citoquina de la familia de IL-6 que puede ser detectada en el plexo coroideo en ratas y en el plexo coroideo y líquido cefalorraquídeo en humanos (Gard et al, 2004). Presenta efectos potentes aumentando la supervivencia de las neuronas tanto *in vivo* como *in*

vitro (Middleton et al, 2000; Peng et al, 2010). La administración de CT-1 muestra efectos miotróficos y neurotróficos en modelos experimentales de daño espontáneo de motoneuronas en ratones (Bordet et al, 2001; Mitsumoto et al, 2001). La administración de CT-1 protege del daño cerebral por isquemia en ratones *in vivo* y reduce la apoptosis neuronal mediante la disminución de la actividad de las caspasas 3 y 8 de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), posiblemente a través de la activación de JAK/STAT3, NF- κ B, ERK1/2 y AKT (Feng et al, 2003; Peng et al, 2010).

Además, los fenotipos que se han encontrado para los ratones deficientes de CT-1 son: pérdida de motoneuronas en la edad postnatal, reducción del número de motoneuronas durante el desarrollo (Bordet et al, 2001) y reducción de la fuerza muscular (Oppenheim et al, 2001).

4.4.5. Efectos de la CT-1 en el riñón

Se ha descrito la expresión de ARNm de CT-1 en riñones de rata, ratón y humanos.

En estudios recientes en ratas se ha observado que la administración de CT-1 previene frente a la toxicidad renal inducida por contrastes iodados (Quiros et al, 2013) y por gentamicina (Quiros et al, 2016) así como previene el daño tras isquemia/reperfusión (García-Cenador et al 2013), lo que sugiere el potencial terapéutico de CT-1 como protector renal.

En el modelo experimental de daño renal inducido por isquemia/reperfusión se observó que la administración de CT-1 mejora la función renal y supervivencia. Estos efectos son mediados por una disminución del estrés oxidativo, disminución de la infiltración de macrófagos y de expresión moléculas de adhesión, disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL1 β e interferón gamma, IFN- γ) y de la apoptosis debida a un descenso en la activación de NF- κ B (García-Cenador et al, 2013b).

En un modelo experimental de nefropatía inducida por contrastes yodados, la administración de CT-1 previene la reducción de la filtración glomerular, reduce la expresión en tejido renal de marcadores de daño renal (N-acetylglucosaminidasa o NAG, molécula de daño renal-1 o KIM-1 y PAI-1), disminuye la apoptosis mediante reducción de actividad de caspasa-3, y reduce la proliferación celular y el estrés oxidativo, característicos del fallo renal agudo inducido por contraste (Quiros et al, 2013).

Por otra parte, la administración de CT-1 junto con gentamicina reduce la mayoría de las manifestaciones descritas del fallo renal agudo inducido por este antibiótico (Quiros et al, 2016).

En un estudio en pacientes se ha encontrado una correlación positiva de los niveles plasmáticos de CT-1 con indicadores de enfermedad renal subclínica como son microalbuminuria y el cociente albumina/creatinina urinaria. Aunque no se observó correlación entre los niveles plasmáticos de CT-1 y los niveles de creatinina plasmática ni la filtración glomerular, se observó que pacientes hipertensos y diabéticos con daño renal tienen niveles más altos de CT-1 en plasma que aquellos pacientes diabéticos e hipertensos sin daño renal (Gamella-Pozuelo et al, 2015).

Aunque un estudio ha descrito que la exposición crónica a niveles elevados de CT-1 en ratas sanas inducía fibrosis renal (Lopez-Andres et al, 2012), estos efectos perjudiciales de la CT-1 sólo aparecen cuando los niveles elevados de CT-1 son mantenidos durante largos periodos de tiempo, y ninguno de esos efectos se han observado cuando esta citoquina se administra durante periodos cortos de tiempo o a dosis bajas (Garcia-Cenador et al, 2013a).

Con estos estudios se puede sugerir que los niveles de CT-1 podrían aumentar con el daño renal actuando como una protección natural frente a éste, ya que en estudios *in vivo* se ha observado que la administración de CT-1 posee efectos protectores frente al daño renal (Quiros et al, 2013; Quiros et al, 2016; Garcia-Cenador et al 2013).

4.4.6. Efectos de la CT-1 en otros órganos

- Pulmón

CT-1 está presente en el pulmón humano adulto y se expresa en las células del músculo liso bronquial, tanto en humano adulto como en feto (Zhou et al, 2003).

La administración de CT-1 en un modelo de daño pulmonar agudo inducido por endotoxina previene la acumulación neutrofílica pulmonar y posee propiedades antiinflamatorias (Pulido et al, 1999). Además, en un modelo de hipertensión con hipoxia pulmonar crónica, la administración de CT-1 protege la función endotelial de la arteria pulmonar, disminuye la presión arterial pulmonar y atenúa la hipertrofia ventricular derecha (Nomura et al, 2003).

- Tejido adiposo

CT-1 se expresa en tejido adiposo y se ha demostrado que es un potente regulador de la señalización en adipocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Zvonic et al, 2004).

En algunos estudios recientes se ha observado el posible efecto antiobesidad de esta citoquina. La administración de CT-1 a ratones obesos provoca una disminución del peso corporal como consecuencia de la disminución de depósitos grasos así como corrige la resistencia a la insulina (Lopez-Yoldi et al, 2014). Los mismos investigadores han observado que la administración de CT-1 *in vitro* e *in vivo* modula la producción de adipocinas que participan en la regulación del peso corporal, del metabolismo y la inflamación (Lopez-Yoldi et al, 2016).

- Retina

La CT-1 promueve la supervivencia de los fotorreceptores; probablemente las células de Müller median este efecto. Los mismos autores sugieren que la liberación prolongada de CT-1 es esencial para la supervivencia de los fotorreceptores a largo plazo (Song et al, 2003).

- Hueso

CT-1 se expresa en los osteoclastos diferenciados y es capaz de aumentar la actividad y mineralización de los osteoblastos tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo esencial para la resorción ósea normal y capaz de estimular la formación del hueso (Walker et al, 2008).

- Endotelio

CT-1 se expresa en células vasculares endoteliales y estimula la síntesis de endotelina-1 a través del receptor GP130 (Jougasaki et al, 2002). En cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana, la estimulación con CT-1 aumenta de manera dosis dependiente la expresión de MCP1, y parece que están involucradas las vías de señalización JAK2/STAT3 y NF- κ B (Fritzenwanger et al, 2006). Otro estudio en células endoteliales aórticas humanas demuestra que la CT-1 promueve la adhesión de monocitos y migración mediante la estimulación de ICAM-1 y MCP-1 a través de mecanismos que involucran las vías de señalización ERK1/2, p38, PI3K/AKT y NF- κ B (Ichiki et al, 2008).

4.4.7. Otros factores que regulan la expresión de CT-1

Angiotensina II induce la expresión de CT-1 en fibroblastos cardiacos (Sano et al, 2000), siendo mayor la expresión de ARNm de CT-1 en fibroblastos que en cardiomiocitos. A su vez, CT-1 aumenta la expresión de ARNm de angiotensinógeno mediante la activación de STAT3 en miocitos cardiacos; el aumento del angiotensinógeno y la producción de angiotensina II contribuye junto con la CT-1 para inducir hipertrofia cardiaca (Fukuzawa et al, 2000). Por otra parte, la noradrenalina aumenta la expresión del ARNm de CT-1 en miocitos cardiacos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Funamoto et al, 2000); la urocortina aumenta los niveles de expresión de CT-1 tanto del ARNm como de la proteína (Janjua et al, 2003). También se ha visto que FGF-2 aumenta la regulación de CT-1 en cardiomiocitos y causa hipertrofia post-infarto del miocardio (Jiang et al, 2007).

Objetivos

La administración de CT-1 ejerce importantes efectos citoprotectores mediante la modulación de distintos mecanismos como son la supervivencia, apoptosis, estrés oxidativo e inflamación. Aunque la mayoría de los estudios sobre su efecto se han llevado a cabo en corazón, hígado y sistema nervioso, también se ha descrito que su administración en riñón tiene efectos protectores, fundamentalmente antiapoptóticos y antiinflamatorios, en modelos experimentales de nefrotoxicidad por contrastes iodados y gentamicina y tras isquemia/reperfusión. Sin embargo, no se ha estudiado el papel de la CT-1 en la fibrosis renal y en el daño glomerular.

Nuestra hipótesis propone que la CT-1 endógena puede ejercer un mecanismo protector frente al daño renal, y por ello, la administración exógena de CT-1 disminuiría el daño renal producido tanto en la fibrosis renal como en las enfermedades glomerulares.

Por tanto, nuestro objetivo general es estudiar el papel modulador de la CT-1 en modelos experimentales de fibrosis renal y glomerulonefritis *in vivo*, así como su papel en células epiteliales tubulares, miofibroblastos y podocitos *in vitro*. Este objetivo general se subdivide en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio del papel de la CT-1 endógena y su administración exógena en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial mediante un modelo de fibrosis renal experimental inducida por obstrucción ureteral unilateral en animales deficientes de CT-1 y sus respectivos controles.

2. Estudio del papel de la CT-1 en cultivos primarios de miofibroblastos renales en tres procesos directamente relacionados con la fibrosis: síntesis de proteínas de MEC, proliferación celular y migración.

3. Estudio del papel de la CT-1 en la hipertrofia celular de células epiteliales tubulares en cultivo.

4. Estudio del papel de la CT-1 en procesos implicados en la enfermedad glomerular (inflamación, glomerulosclerosis, fibrosis intersticial y distribución de podocitos) mediante un modelo de glomerulonefritis inducido por administración de suero nefrotóxico (SNT) *in vivo*.

5. Estudio del papel de la CT-1 en la migración, proliferación y morfología del citoesqueleto de podocitos maduros inmortalizados.

Métodos

1. Materiales

Todos los reactivos, productos, materiales y aparatos utilizados para la realización de este trabajo así como las casas comerciales correspondientes están recogidos en las tablas 8, 9 y 10, que se encuentran al final de la sección de métodos.

2. Ratones homocigotos de CT-1

Los ratones homocigotos CT-1^{-/-} fueron amablemente cedidos por el grupo de investigación del Dr. Michael Sendtner (Departamento de Neurología, Universidad de Würzburg, Alemania). Estos ratones se generaron mediante inserción de un cassette NeoR por recombinación homóloga. Posteriormente se cruzaron con hembras C57BL/6J obteniéndose ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} (Oppenheim et al, 2001). Los ratones machos CT-1^{-/-} los cruzamos con hembras C57BL/6J, se extrajeron los embriones y se transfirieron a una hembra pseudopreñada obteniéndose crías heterocigotas; finalmente, mediante el cruce de estas crías heterocigotas se obtuvo en nuestro laboratorio la línea de ratones CT-1^{-/-} y CT-1^{+/+}.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones machos CT-1^{-/-} de 3-4 meses de edad, con un peso de unos 25-30 gramos; como controles se utilizaron sus hermanos de camada CT-1^{+/+}. El genotipo de cada animal se analizó mediante el análisis por reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) a partir del ADN aislado de la cola.

2.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, en un animalario bajo barrera libre de patógenos. Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial y los principios que describen el cuidado y la utilización de los animales de experimentación estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RD1201/2005 y RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y en otros fines científicos.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar, con la siguiente composición: almidón (34,8% del total), proteína bruta (20,2%), cenizas brutas (5,5%), materias grasas brutas (5%), lisina (1%), calcio (0,9%), fósforo (0,6%), metionina (0,6%), sodio (0,28%), vitamina A (15 UI/g), vitamina D3 (2,2 UI/g) y vitamina E (70 UI/g). Para la preparación de esta dieta estándar, se utilizaron los siguientes ingredientes: cereales, subproductos de molinería, harinas o tortas oleaginosas, harina de carne, compuestos minerales y corrector vitamínico mineral.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo.

2.2. Genotipado de los ratones

Como ya se ha mencionado, el genotipo de los ratones se determinó mediante PCR. Para ello, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en tampón de lisis (Tris 50 nM, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, ditiotretitol o DTT 1 mM y espermidina 0,5 mM) al que se añadieron 250 ng/ μ L de proteinasa K, durante 24 horas a 55 °C. El sobrenadante de esta digestión contiene el ADN genómico, que se almacenó a -20 °C. Con 0,5 μ L de ADN se procedió a amplificar mediante PCR una región específica del cassette NeoR introducido en los ratones CT-1^{-/-} así como un fragmento del gen de CT-1. Para ello se utilizaron unos cebadores de PCR que amplifican específicamente un fragmento del cassette introducido o un fragmento del gen de CT-1 en cada caso (Tabla 2), ADN polimerasa, dNTP y el tampón de reacción.

Tabla 2. Cebadores para genotipado y condiciones de PCR

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Tª de anillamiento	Longitud amplicón (pb)
CT-1	AGCAAGTGGATCTCTATGAGCTG TGACTCCATGGTCCTTTGGC	58	454
Cassette NeoR	AGCCGATTGTCTGTTGTGCC GACGGTGATAGGGGCTTGTC	58	630

El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa al 1% utilizando un marcador específico de 1 kb. El producto de amplificación del fragmento del cassette introducido aparece a 630 pares de bases (pb) y el producto de amplificación del fragmento de gen de CT-1 aparece a 454 pb. De este modo, cuando el producto de PCR tiene 454 pb, la muestra corresponde a ratones CT-1^{+/+}, cuando el producto de PCR tiene 630 pb la muestra corresponde a ratones CT-1^{-/-} y cuando el producto de PCR tiene 454 y 630 pb, la muestra corresponde a animales CT-1^{+/-} tal como se muestra en la figura 8.

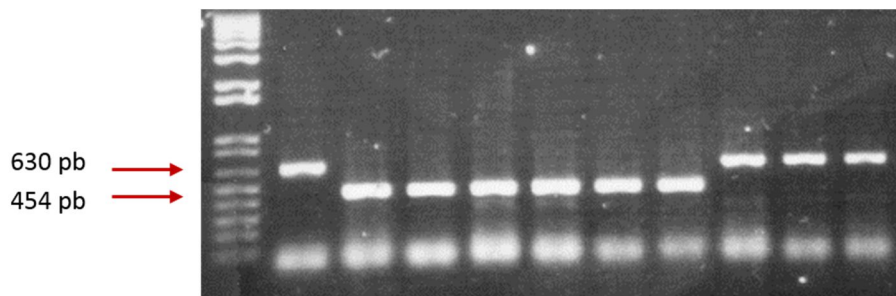


Figura 8. Genotipado de los ratones. Imagen de un gel de agarosa con genotipaje de ratones CT-1^{+/+} (banda a 454 pb) y de ratones CT-1^{-/-} (banda a 630 pb). CT-1: cardiotrofina-1, pb: pares de bases.

3. Técnicas experimentales *in vivo*

3.1. Obstrucción ureteral unilateral (OUU)

La técnica de OUU es un modelo experimental de fibrosis tubulointersticial que replica las características fisiopatológicas de esta enfermedad: infiltración de células inflamatorias, apoptosis de células tubulares, proliferación de miofibroblastos y excesiva acumulación de MEC que da lugar a fibrosis tubulointersticial (Chevalier et al, 2009). Por lo tanto, con esta técnica evaluamos el proceso inflamatorio y daño tubular temprano tras 3 días de OUU y la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de UUO.

3.1.1. Técnica quirúrgica

Para los procedimientos quirúrgicos se utilizó material del fabricante Fine Scientific Tools (F.S.T.). Se utilizó anestesia inhalatoria: isofluorano 2% en oxígeno al 4% para inducir la anestesia y del 1,5 al 2% para mantener a los animales anestesiados.

Antes de llevar a cabo la cirugía, se administró una dosis del analgésico buprenorfina (0,15 mg/kg p.c., vía subcutánea) para que terminado el procedimiento quirúrgico, ya estuviese ejerciendo sus efectos.

Una vez anestesiado el ratón se abrió el abdomen mediante un corte de aproximadamente 1 cm en la piel de la zona ventral; posteriormente se llevó a cabo un corte en la capa muscular siguiendo la línea alba para evitar el sangrado. Tras retirar hacia un lateral las vísceras del ratón se localizó el riñón y el uréter izquierdo. Se realizó una ligadura de este uréter de doble nudo, con seda 5/0 no reabsorbible, en dos puntos separados 0,3 cm entre si, para conseguir una obstrucción total del uréter. A continuación, se introdujeron las vísceras en el interior del ratón con suero salino para humedecerlas. Finalmente se cerró la incisión de la capa muscular mediante una sutura continua con seda 5/0 reabsorbible y la herida de la piel con una sutura discontinua con seda 5/0 no reabsorbible y se desinfectó la zona con solución yodada. Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas.

Posteriormente se extrajeron los dos riñones; el riñón izquierdo u obstruido (O), y el derecho o no obstruido (NO).

3.1.2. Diseño experimental

Con el modelo experimental de OUU analizamos tanto el efecto de la CT-1 endógena como su administración exógena tras 3 días de OUU (para evaluar el proceso inflamatorio y daño tubular temprano) y tras 15 días de OUU (para evaluar la fibrosis tubulointersticial ya establecida); para ello realizamos 6 diseños experimentales.

- Diseño experimental 1: para evaluar el efecto de la CT-1 endógena en la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de OUU. Utilizamos dos grupos de animales (figura 9):
 - Grupo CT-1^{+/+}: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se sacrificaron 14 días después de la OUU (n=6).
 - Grupo CT-1^{-/-}: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se sacrificaron 14 días después de la OUU (n=6).

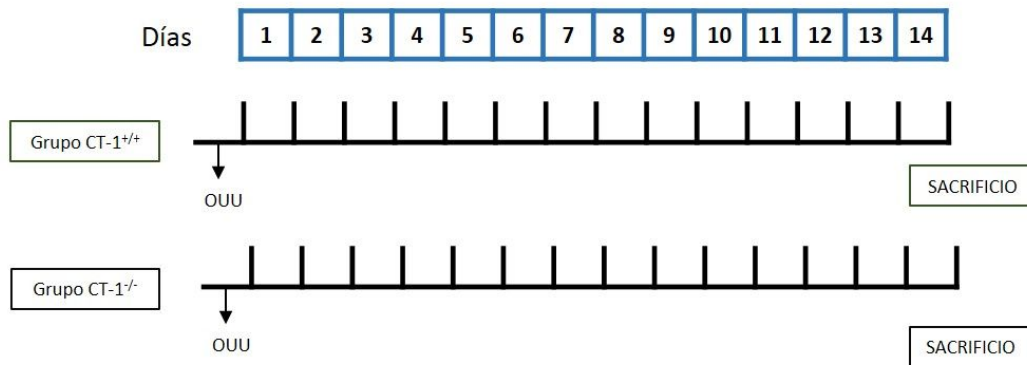


Figura 9. Esquema diseño experimental 1. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral.

- Diseño experimental 2: para evaluar el efecto de la CT-1 endógena en el proceso inflamatorio y daño tubular temprano tras 3 días de OUU. Utilizamos 2 grupos de animales (figura 10):
 - Grupo CT-1^{+/+}: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se sacrificaron 3 días después de la OUU (n=6).
 - Grupo CT-1^{-/-}: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se sacrificaron 3 días después de la OUU (n=6).

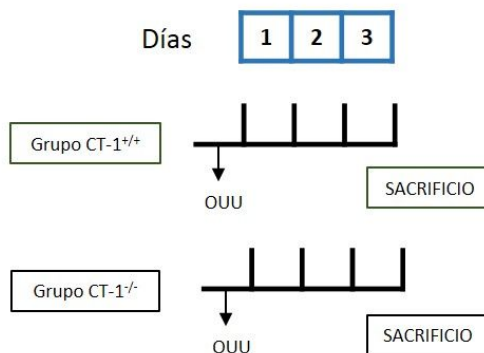


Figura 10. Esquema diseño experimental 2. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral.

- Diseño experimental 3: para evaluar el efecto del tratamiento con CT-1 en la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de OUU en ratones CT-1^{+/+} (figura 11). Utilizamos 3 grupos de animales:

- Grupo CT-1^{+/+}: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró el vehículo (suero salino al 0,9%) por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=6); actuaron como grupo control del experimento.
- Grupo CT-1 100 µg/kg: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 100 µg/kg p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=5).
- Grupo CT-1 400 µg/kg: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 400 µg/kg p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=4).

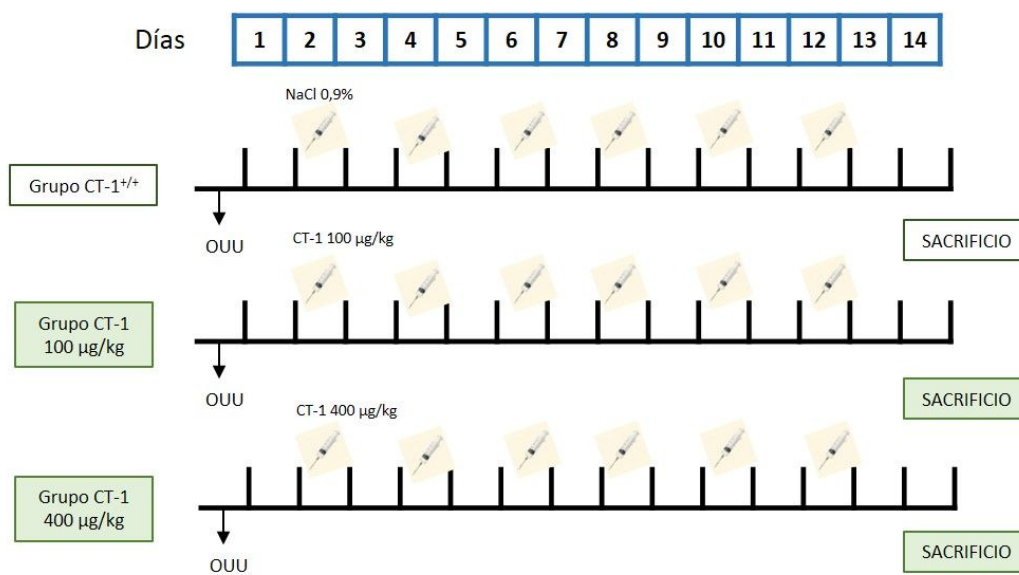


Figura 11. Esquema diseño experimental 3. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral

- Diseño experimental 4: para evaluar el efecto del tratamiento con CT-1 en el proceso inflamatorio y daño tubular temprano tras 3 días de OUU en ratones CT-1^{+/+} (figura 12). Utilizamos los siguientes grupos de animales:

- Grupo CT-1^{+/+}: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró el vehículo (suero salino al 0,9%) por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=6); actuaron como grupo control del experimento.
- Grupo CT-1 100 µg/kg: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 100 µg/kg p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=5).
- Grupo CT-1 400 µg/kg: ratones machos CT-1^{+/+} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 400 µg/kg p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=6).

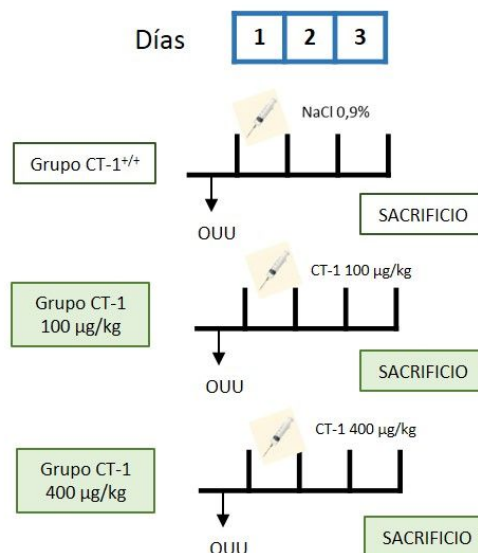


Figura 12. Esquema diseño experimental 4. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral.

- Diseño experimental 5: para evaluar el efecto de la suplementación de los niveles de CT-1 (mediante administración exógena de CT-1) en la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de OUU en ratones CT-1^{-/-}. Utilizamos 3 grupos de animales (figura 13):
 - Grupo CT-1^{-/-}: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró el vehículo (suero salino al 0,9%) por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=6); actuaron como grupo control del experimento.

- Grupo CT-1 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=5).
- Grupo CT-1 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene cada dos días después de la OUU (n=5).

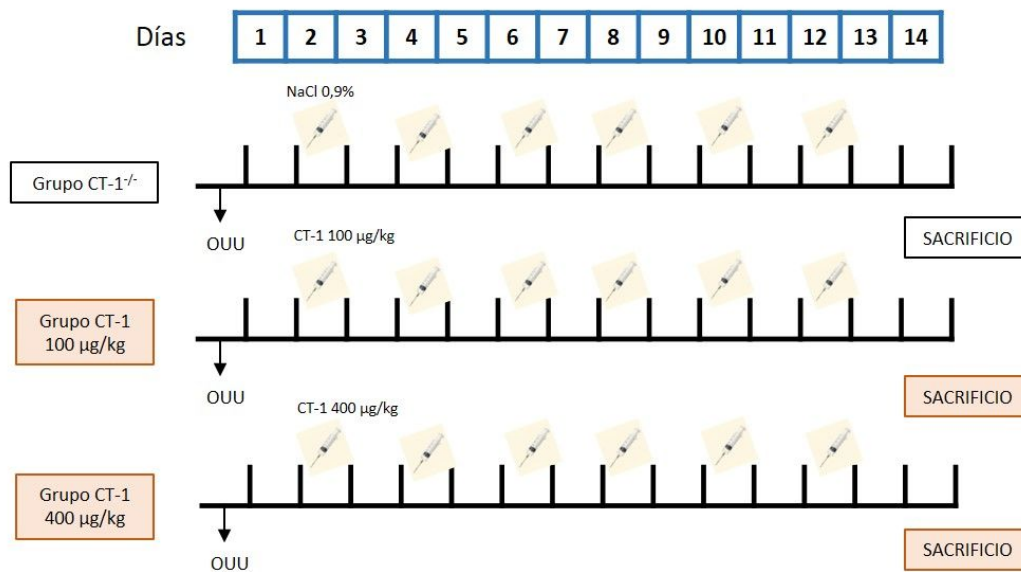


Figura 13. Esquema diseño experimental 5. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral

- Diseño experimental 6: para evaluar el efecto de la suplementación de los niveles de CT-1 (mediante administración exógena de CT-1) en el proceso inflamatorio y daño tubular inicial tras 3 días de OUU en ratones CT-1^{-/-} (figura 14). Utilizamos los siguientes grupos:
 - Grupo CT-1^{-/-}: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró el vehículo (suero salino al 0,9%) por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=6); actuaron como grupo control del experimento.
 - Grupo CT-1 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=5).

- Grupo CT-1 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$: ratones machos CT-1^{-/-} a los que se les practicó OUU y se les administró CT-1 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene el día después de la OUU (n=6).

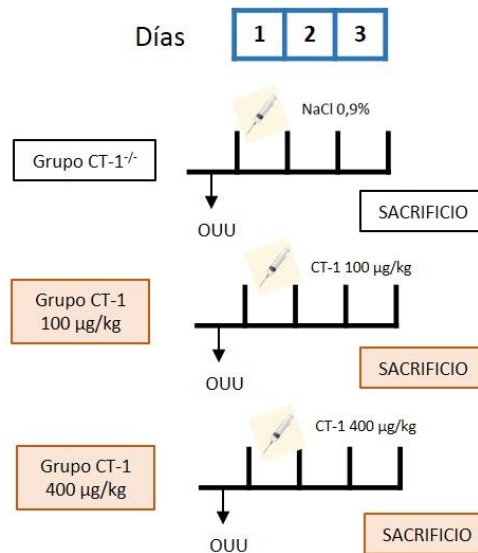


Figura 14. Esquema diseño experimental 6. CT-1: cardiotrofina-1, OUU: obstrucción ureteral unilateral.

La CT-1 recombinante de ratón se disolvió según las especificaciones del fabricante y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las dosis de CT-1 fueron seleccionadas en base a estudios previos en los que se muestran efectos renoprotectores de la administración exógena de CT-1 (García-Cenador et al, 2013b; Quiros et al, 2016; Quiros et al, 2013).

3.2. Glomerulonefritis inducida por suero nefrotóxico (SNT)

Este modelo experimental de glomerulonefritis origina un daño en las células glomerulares, formación de semilunas así como una marcada inflamación y fibrosis (Tam et al, 1999), replicando algunas de las características patológicas de la glomerulonefritis humana crescéntica (Pippin et al, 2009). Este modelo ha sido usado en diversos estudios de esta enfermedad (Khan et al, 2005; Vasilopoulou et al, 2016).

3.2.1. Técnica experimental

Para llevar a cabo el modelo experimental de glomerulonefritis, se preinmunizaron los ratones con una inyección subcutánea de IgG de oveja 10 mg/mL con adyuvante completo de Freud (ACF). El ACF forma una emulsión con el antígeno permitiendo que éste se libere lentamente e incorpora una suspensión de micobacterias muertas que atraen macrófagos al lugar de la inyección favoreciendo la respuesta inmunitaria. Para la preparación de esta mezcla se añadieron por cada ratón 200 μ L de IgG de oveja, 600 μ L de suero salino y 800 μ L de ACF, se mezclaron hasta que se consiguió que una gota de este preparado no se disolviera en agua. Se realizaron dos inyecciones subcutáneas con aguja 25G de 100 μ L de esta mezcla en el costado del animal. 5 días después de esta preinmunización se inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola 250 μ L de SNT de oveja, proporcionado por el grupo del Dr. Michael G. Robson (Centro de Transplantes, King's College de Londres, Reino Unido) (Brown et al, 2006).

3.2.2. Diseño experimental

Con este modelo de glomerulonefritis inducida por SNT evaluamos la expresión de CT-1 en distintos estadios de la enfermedad y el efecto de la administración exógena de CT-1 en la progresión de la enfermedad; para ello hemos llevado a cabo dos diseños experimentales:

- Diseño experimental 1: para evaluar la expresión de CT-1 en los distintos estadios de la enfermedad. Utilizamos los siguientes grupos (figura 15):
 - Grupo control: ratones machos con fondo genético C57BL/6J sanos, que se utilizaron como controles (n=6).
 - Grupo 7 días SNT: ratones machos C57BL/6J que se sacrificaron 7 después de la administración i.v. del SNT (n=6).
 - Grupo 21 días SNT: ratones machos C57BL/6J que se sacrificaron 21 días después de la administración i.v. del SNT (n=5).

El día del sacrificio de los ratones de los 3 grupos experimentales se recogieron los dos riñones; previamente habíamos recogido plasma y orina tras 24 horas en jaulas metabólicas.



Figura 15. Esquema diseño experimental 1 modelo glomerulonefritis. ACF: adyuvante completo de Freud, i.v.: intravenoso, s.c.: subcutáneo, SNT: suero nefrotóxico.

- Diseño experimental 2: para evaluar el efecto de la administración de CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis tras 21 días de la administración del SNT. Utilizamos los siguientes grupos (figura 16):
 - Grupo control: ratones machos C57BL/6J sanos que actuaron como controles (n=6).
 - Grupo SNT: ratones machos C57BL/6J a los que se les administró el vehículo (suero salino al 0,9%) vía i.v. en la vena dorsal del pene los días 9, 13 y 16 después de la administración vía i.v. del SNT (n=9).
 - Grupo SNT+ CT-1 400 µg/kg: ratones machos C57BL/6J a los que se les administró CT-1 400 µg/kg p.c. por vía i.v. en la vena dorsal del pene los días 9, 13 y 16 después de la administración vía i.v. del SNT (n=8).

A los dos grupos de ratones a los que se les indujo la glomerulonefritis se les recogió orina y plasma 7 días después de la administración del SNT para medir la albuminuria y separar los ratones en dos grupos (grupo SNT y grupo SNT+ CT-1 400 µg/kg) con valores de albuminuria semejantes y por tanto con un grado de daño glomerular semejante. Así mismo se les recogió orina y plasma el día antes de la inyección subcutánea de la mezcla de ACF e IgG de oveja y el día del sacrificio se les recogieron los dos riñones, plasma y orina de 24 horas.

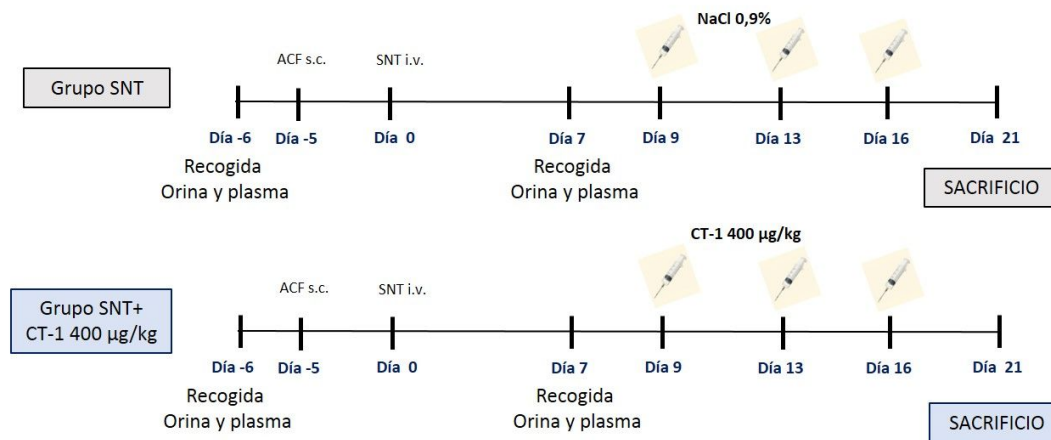


Figura 16. Esquema diseño experimental 2 modelo glomerulonefritis. ACF: adyuvante completo de Freud, i.v.: intravenoso, s.c.: subcutáneo, SNT: suero nefrotóxico.

3.3. Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas

Durante el desarrollo del modelo experimental de glomerulonefritis se utilizaron jaulas metabólicas individuales para la recogida de la orina de 24 horas de los animales. Estas jaulas están diseñadas para separar de forma efectiva la orina de las heces del animal en tubos externos a la jaula (Kurien et al, 2004) ya que el habitáculo en el que se encuentran los animales presenta un suelo de rejilla permitiendo la caída de heces y orina y su posterior separación. Los animales disponen de comida y bebida ad libitum. Antes de la recogida de la orina se debe añadir aceite mineral al tubo colector para evitar la evaporación de la orina y azida sódica al 0,1% para evitar una posible contaminación bacteriana de la muestra.

Tras la recogida de la orina, ésta debe ser procesada para eliminar el aceite mineral y otros elementos (resto de comida, pelos del animal...) con los que se haya podido contaminar la muestra. Para ello, se centrifugó a 2000 g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se alicuotó y conservó a -80 °C para su conservación hasta su análisis.

3.4. Recogida de sangre y plasma

La extracción de sangre se realizó en la vena safena lateral, por lo que previamente a esta extracción se rasuró la zona baja de la extremidad para visualizar la vena. La recogida de sangre se llevó a cabo por un método que permite trabajar con el animal despierto. Se introdujo

el animal en un inmovilizador apropiado que permite coger un pliegue de piel entre la cola y el muslo. Se punzó la vena con una aguja de 25G y se recogió la sangre en un capilar heparinizado. Su contenido fue depositado en tubos tipo eppendorf y estos fueron centrifugados a 7000 g, 4 °C durante 4 minutos para la obtención del plasma libre de restos celulares. El plasma fue conservado a -20 °C para su posterior análisis.

3.5. Perfusión y recogida de órganos

La perfusión con NaCl 0,9% es la sustitución de la sangre en los órganos del animal por suero salino con el fin de limpiar los tejidos de células sanguíneas que puedan interferir con su posterior análisis histológico. Para llevarlo a cabo se anestesió a los animales con pentobarbital 0,01 mg/Kg vía i.p. La perfusión se realizó pinchando con una aguja 25G en el ventrículo izquierdo conectándose a un sistema de perfusión de suero salino heparinizado. Tras la perfusión, la descapsulación y recogida de los riñones debe de ser rápida para evitar la degradación de ARN. En el modelo experimental de glomerulonefritis, el riñón izquierdo se dividió por la mitad, en un plano frontal respecto a cómo se dispone anatómicamente y se incluyó en formaldehído 3,7% pH 7 para estudios histológicos y el otro riñón fue ultracongelado en nitrógeno líquido y conservado a -80 °C para su posterior análisis por diferentes técnicas moleculares. En el modelo experimental de OUU, cada riñón (izquierdo u obstruido y derecho o no obstruido) se dividió a la mitad incluyendo una mitad en formaldehído 3,7% pH 7 y empaquetando y conservando la otra mitad a -80 °C para su análisis por diferentes técnicas moleculares.

4. Determinaciones bioquímicas

4.1. Determinación de la creatinina plasmática y urinaria

Las concentraciones de creatinina plasmática y urinaria se determinaron en el grupo del profesor Neil Dalton del Evelina London Children's Hospital (King's College de Londres, Reino Unido). Se midieron mediante espectrometría de masas por electropulverización con dilución isotópica (Greenberg et al, 2012).

El aclaramiento de creatinina (mL/min por gramo de peso corporal) fue derivado de la fórmula creatinina urinaria x volumen de orina x 1440 min⁻¹ x creatinina plasmática⁻¹ x peso corporal (g)⁻¹ (Dessapt-Baradez et al, 2014).

4.2. Determinación de la urea plasmática

Para la determinación de la concentración de urea plasmática se utilizó el kit comercial “*Quantichrom Urea Assay Kit*”. Este kit se basa en el método colorimétrico propuesto por Jung y colaboradores (Jung et al, 1975), que describe la reacción que se produce entre la urea, y dos moléculas, el ortoftalaldehído y el N-naptileno diamida para dar lugar a un compuesto coloreado cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de urea. Siguiendo las indicaciones del kit comercial, se pipetearon 5 µL de las muestras plasma en una placa de 96 pocillos y de la recta estándar de urea (0-50 mg/dL urea). Se añadieron 200 µL de la mezcla de reactivos A-B del kit comercial (proporción 1:1) a cada pocillo y se incubó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia de los pocillos en un lector de placas a 520 nm. Tras calcular la recta estándar, se extrapolaron la concentración de urea de cada una de las muestras de plasma analizadas. Para calcular el valor de los compuestos nitrogenados en sangre (BUN, del inglés *blood urea nitrogen*) en mg/dL se dividió la concentración de urea en mg/dL entre 2,14, tal como especifica el fabricante.

5. Estudio histológico

Los riñones destinados a la realización de los estudios histológicos se fijaron con formaldehído tamponado al 3,7% durante al menos 24 horas. Después se deshidrataron en etanol de concentración creciente desde 50% hasta 100% para permitir que la parafina pueda penetrar posteriormente en el tejido ya que no es miscible con el agua. Se sumergió el tejido en xileno, para sustituir el alcohol en el tejido deshidratado y por tanto favorecer la penetración de la parafina en el siguiente paso. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina en una estufa a 60 °C durante 24 horas y se obtuvieron bloques, que se cortaron con un microtomo en secciones transversales de 5 µm de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar en la estufa durante 24 horas. Antes de realizar las diferentes tinciones, se desparafinizan los cortes de tejido con xileno y se rehidratan haciéndolos pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta finalizar con una solución 100% de agua destilada.

5.1. Tinción hematoxilina-eosina (HE)

Esta técnica histológica permite el estudio de la estructura morfológica de las células que conforman el tejido. La hematoxilina tiene afinidad por los ácidos, por lo que se une a los ácidos nucleicos y por tanto tiñe de azul los núcleos celulares. La eosina, debido a su afinidad por los compuestos básicos tiñe de color rosado el citoplasma de la célula.

Para llevar a cabo la tinción se sumergió el riñón desparafinado e hidratado en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, se lavaron los restos de colorante con agua y se sumergió en eosina durante 30 segundos. Por último, se deshidrató nuevamente el tejido con etanoles en distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de la deshidratación, se añadió el medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos.

Cuando el medio de montaje se secó, se codificaron los portaobjetos para hacer un estudio ciego y se hicieron fotos con una cámara digital conectada a un microscopio óptico. Para ello, se utilizó el software *DP Controller*. Además de una descripción de las fotos tomadas, se realizó una valoración semicuantitativa del grado de daño de las mismas mediante la determinación de un *índice de daño histológico*. Para ello, se tomaron en cada riñón 10 fotos de la zona cortical de manera aleatoria y representativa, con un aumento 400X. Cada una de estas fotos se dividió en 10 secciones. A cada una de estas secciones, se le dio un valor de 0 a 3 de acuerdo al siguiente criterio:

- Valor 0: Histología normal.
- Valor 1: Hinchamiento de células tubulares, pérdida de borde en cepillo, vacuolización, presencia de material hialino, pérdida de núcleos en el perímetro de los túbulos renales o dilatación tubular en un tercio de la sección.
- Valor 2: Mismas características que el valor 1, pero entre uno y dos tercios de la sección.
- Valor 3: Mismas características que el valor 1, pero en más de dos tercios de la sección.

Los valores de las secciones se sumaron de manera que cada foto tenía un valor total situado entre 0 y 30. El *índice de daño histológico* para un riñón dado se determinó mediante el promedio de los valores de las 10 fotos tomadas.

5.2. Tinción con ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS)

Esta técnica histológica permite la detección de polisacáridos en tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. La modificación química del tejido consiste en la oxidación mediante el ácido peryódico de los enlaces entre los carbonos próximos que contienen grupos hidroxilos. Esto provoca la formación de grupos aldehídos que son reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combina con ellos para dar un color rojizo brillante. Los núcleos se tiñen de color azul-violeta. Esta técnica la hemos utilizado para valorar la morfología de los glomérulos en los riñones del modelo experimental de glomerulonefritis.

Para llevar a cabo la tinción se sumergió el riñón deparafinado e hidratado en ácido peryódico durante 5 minutos, se lavó con agua y se sumergió en ácido de Schiff durante 15 minutos, tras 3 lavados con agua de 10 minutos cada uno se sumergió en hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, y se lavaron los restos de colorante con agua. Por último, se deshidrató nuevamente el tejido con etanoles en distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de la deshidratación, se añadió el medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos y se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico.

5.3. Tinción de Rojo Sirio

Para la valoración de la fibrosis renal mediante análisis de imagen, las preparaciones se tiñeron con Rojo Sirio, cromógeno específico para el tejido conectivo. Los cortes se desparafinizaron, hidrataron y a continuación, se lavaron durante 10 minutos con agua corriente. Para preparar la solución de Rojo Sirio se mezclaron 10 mL de Rojo Sirio con 90 mL de una solución saturada de ácido pícrico (para garantizar la saturación es conveniente que queden restos de ácido pícrico sin disolver) y se dejó reposar durante 48 horas, efectuándose posteriormente la tinción con la solución de Rojo Sirio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se mantuvieron durante 5 días en etanol absoluto, se aclararon y se montaron del mismo modo que con la hematoxilina y eosina. Es necesario esperar unas 48 horas antes de manipular la preparación.

Para realizar los estudios de análisis de fibrosis, los portaobjetos se codificaron para un estudio ciego. Se realizaron al microscopio óptico 15 fotos de la zona de la corteza renal de cada muestra y se cuantificó la fibrosis con el programa *Image-Pro Plus*.

5.4. Tinción con tricrómico de Masson

Esta tinción persigue resaltar fibras colágenas del tejido conjuntivo, tiñendo además el resto de estructuras tisulares. Además del colorante nuclear (la hematoxilina férrica de Weigert), utiliza el colorante aniónico fucsina ácida, un colorante rojizo como el Ponceau de xilidina o ácido fosfotúngstico y un colorante aniónico que tiñe las fibras de colágeno que puede ser azul de anilina o light green. Los cortes se desparafinizaron e hidrataron. Se mantuvieron durante una noche en líquido de Bouin (750 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico (al 1-2% en agua destilada), 250 mL de formalina concentrada (40% de formaldehído con un 60% de metanol) y 50 mL de ácido acético glacial, pH 2,2). Se lavaron los cortes con agua destilada hasta la desaparición del color amarillo. A continuación, se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert (0,5 g de hematoxilina cristalizada, 0,75 g de cloruro férrico, 1 mL de ácido acético glacial en 100 mL de agua) durante 10 minutos. De nuevo se lavaron las preparaciones con agua destilada y se tiñeron con la solución escarlata de Biebrich-fucsina ácida (90 mL de Escarlata de Biebrich al 1% en agua destilada, 10 mL de fucsina ácida en solución acuosa al 1%, 1 mL de ácido acético glacial) durante 2-5 minutos. Se lavaron con agua destilada y, durante 10 minutos, se tiñeron con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5%. Posteriormente, se tiñeron con solución de verde tenue (light green) al 2% (99 ml de agua destilada, 2 g de verde tenue SF amarillento (C.I. 42095) y 1 mL de ácido acético glacial). Los cortes así teñidos se lavaron y se diferenciaron con ácido acético al 1% durante 3-5 minutos. Después de la deshidratación, se montaron las preparaciones y se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico.

5.5. Inmunohistoquímica

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en cortes de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína a identificar y en su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas que permiten la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno. Tras la hidratación del tejido renal anteriormente descrito se llevó a cabo el desenmascaramiento del antígeno hirviendo las muestras en un buffer citrato a pH 6 durante 4 minutos a 100 °C en olla a presión y se dejó reposar 20 minutos. Después se incubó con peróxido de hidrógeno al 1,6% durante 10 minutos y se bloqueó el tejido renal con albúmina bovina sérica (BSA, del inglés *bovine serum albumine*) al 5% en PBS-TWEEN 20 (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente para saturar los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos y

se incubó el anticuerpo primario en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Después se realizó otro lavado con PBS-TWEEN, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés, *horseradish peroxidase*) en la solución de bloqueo durante 30 minutos y se lavó de nuevo con PBS. Inmediatamente después se añadió el cromógeno diaminobenzidina durante 10 minutos, y se lavaron con abundante agua corriente. Seguidamente se contrastaron ligeramente sumergiéndolos en hematoxilina unos segundos, aclarándolos rápidamente.

Por último, se deshidrataron y se montaron las preparaciones y se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico, donde se evaluó la expresión y localización de las proteínas de estudio y se obtuvieron imágenes representativas a diferentes aumentos.

Tabla 3. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
AcM de ratón anti- α -SMA A2547 (Sigma-Aldrich)	1:300	Anti-ratón	1:300
AcP de conejo anti-caspasa-3 activada 9661 (Cell Signaling)	1:200	Anti-conejo	1:300
AcM de rata anti-cardiotrofina-1 MAB438 (R&D system)	1:100	Anti-rata	1:300
AcP de conejo anti-colágeno IV ab19808 (Abcam)	1:100	Anti-conejo	1:300
AcM de rata anti-F4/80 MCA497R (Abd Serotec)	1:1000	Anti-rata	1:300
AcP de conejo anti-iNOS (N-20) Sc-650 (Santa Cruz biotechnologies)	1:50	Anti-conejo	1:300
AcP de conejo anti-LIFR Sc-659 (Santa Cruz biotechnologies)	1:100	Anti-conejo	1:300

AcM de conejo anti-vimentina clon EP21 1:100 Anti-conejo 1:300
AC-0024 (Cell Marque)

Para el estudio de la expresión de CT-1 en el diseño experimental 1 del modelo de glomerulonefritis inducido por SNT se realizó un score de la expresión de CT-1 alrededor del glomérulo. Para ello, los portaobjetos se codificaron para un estudio ciego, y se evaluaron 50 glomérulos de cada muestra. Se consideró score=0 sin tinción alrededor del glomérulo, score=1 tinción débil y score=2 tinción fuerte tal como se muestra en la figura 17. El score para una muestra dada se determinó mediante el promedio de los valores de los 50 glomérulos evaluados en la misma.

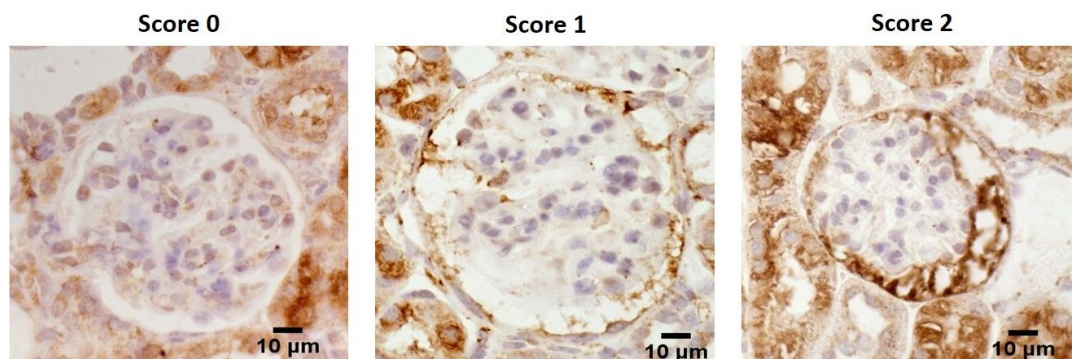


Figura 17. Imágenes representativas de los distintos scores de la tinción inmunohistoquímica de cardiotrofina-1. Magnificación original: 400X.

5.6. Inmunofluorescencia

Esta tinción, al igual que la técnica de inmunohistoquímica, se basa en la detección y localización de una determinada proteína en el tejido de estudio mediante un complejo formado por anticuerpos. A diferencia de la tinción de inmunohistoquímica donde se añade el cromógeno diaminobenzidina, en la inmunofluorescencia el anticuerpo secundario reconoce, por una parte, al anticuerpo primario, y por otra, se encuentra unido a un fluorocromo, capaz de emitir fluorescencia en el espectro visible tras ser excitado con diferentes longitudes de onda. Además, esta técnica permite estudiar múltiples proteínas en un mismo tejido de forma simultánea, gracias a la utilización de anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos diferentes. El

procedimiento a seguir es igual que el explicado anteriormente en el apartado 5.5 hasta el momento en el que se incubó con el anticuerpo primario en la solución de bloqueo a 4 °C durante toda la noche; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-TWEEN 20 al 0,1%, se incubó el anticuerpo secundario en la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó 3 veces con PBS 1X y se tiñeron los núcleos incubando los cubreobjetos en una solución acuosa 2 µM de Hoechst 33258 durante unos segundos. En último lugar se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando 10 µL de ProLong Gold Antifade. La tabla 4 muestra las condiciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados. Se esperó al menos una hora tras el montaje para poder observar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia. Se realizaron fotografías a diferentes aumentos y se obtuvieron imágenes representativas de cada grupo con un microscopio óptico de fluorescencia.

Tabla 4. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia de tejido

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución	Fluoróforo
AcM de ratón anti-α-SMA A2547 (Sigma-Aldrich)	1:100	Anti-ratón	1:200	CY3
AcM de rata anti-Cardiotrofina-1 MAB438 (R&D system)	1:50	Anti-rata	1:200	Alexa Fluor 488
AcP de conejo anti-GP130 3732 (cell signaling)	1:100	Anti-conejo	1:200	CY3
AcP de cobaya anti-nefrina GP-N2 (Progen)	1:75	Anti-cobaya	1:200	Alexa fluor 594
AcP de conejo anti-WT1 AP15857PU-S (Acris Antibodies)	1:100	Anti-conejo	1:200	Alexa fluor 594

5.7. TUNEL

Para identificar apoptosis utilizamos el ensayo enzimático TUNEL (del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) que detecta la fragmentación de ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas. Se utilizó el kit comercial “*In situ Cell Death Detection Kit*” que permite la detección y cuantificación de apoptosis de cada célula basado en el marcaje de hebras fragmentadas de ADN. La tinción con TUNEL se llevó a cabo en tejidos en parafina siguiendo las especificaciones del fabricante.

6. Técnica de ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall & Perlmann, 1971). Se utilizó un kit comercial de ELISA para detectar albumina en orina. La orina se recogió tal y como se ha explicado en el apartado 3.3. El inmunoensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se incubó el anticuerpo de captura en la placa de ELISA proporcionada por el fabricante durante 1 hora, se lavaron los pocillos 3 veces con la solución de lavado, posteriormente se incubó con la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados se pipetearon 100 μL de las muestras a analizar, de la recta patrón y de los controles. Posteriormente se produjo una incubación de 1 hora con el conjugado de anticuerpo de albumina y la enzima HRP (100 μL) que se une específicamente a la albumina. Finalmente, tras varios lavados este complejo de unión se detectó al añadir en cada pocillo 100 μL de un sustrato colorimétrico para la enzima HRP. Tras 15 minutos de incubación, se añadieron 50 μL de un reactivo específico necesario para parar la reacción. El color producido por la acción de dicha enzima en el sustrato fue medido en un lector de placas de ELISA a 450 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la albumina contenida en las muestras de estudio. Para calcular la cantidad de albúmina en orina se tuvo en cuenta el volumen de orina recogido en 24 horas.

Mediante ensayo de ELISA también se midió la cantidad de RhoA y Cdc42 activadas en lisados celulares. Descrito posteriormente en el apartado 8.11.1

7. Análisis de la expresión de Colágeno total

Para el análisis de la expresión de colágeno total en tejido renal se utilizó el kit comercial “*Soluble Collagen Assay Sircol*”. Este ensayo se basa en una reacción colorimétrica para detectar el colágeno soluble total en muestras de tejido o células. En nuestro estudio fue utilizado para detectar colágeno total en tejido renal tras 15 días de OUU. Se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: se pesaron 10 mg de tejido y se incubó a 4 °C durante toda la noche con pepsina 0,1 mg/mL en ácido acético 0,5 M para formar una solución transparente. Tras esta incubación el pellet recogido con 100 µL del agente ácido neutralizante y 200 µL del agente de concentración se volvió a incubar a 4 °C durante toda la noche para aislar y concentrar el colágeno. Tras esta concentración del colágeno y quedarnos con el pellet obtenido, se añadió tanto a las muestras de estudio como a la recta patrón 1 mL de *Sircol Dye Reagent* que contiene Rojo Sirio y ácido pícrico y que se une específicamente a la cadena alfa del colágeno fibrilar (tipo I, II, III, V y XI) y se incubó durante 30 minutos en agitación suave. Después de una centrifugación de 10 minutos a 15000 g y quedarnos con el pellet se añadieron 750 µL de *Ice-cold acid SALT wash reagent*. Posteriormente se llevó a cabo otra centrifugación de 10 minutos y 15000 g y se añadió al pellet 250 µL del agente básico que contiene hidróxido sódico y libera el *Sircol Dye* del complejo formado con el colágeno. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas de ELISA, siendo la intensidad de color directamente proporcional al colágeno contenido en las muestras de estudio. Los datos se representaron en µg de colágeno/mg de tejido.

8. Métodos de cultivo de celular

Todas las manipulaciones con cultivos celulares se realizaron en campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48 y utilizando material estéril. Los cultivos se mantuvieron en un incubador en atmósfera húmeda, a 37 °C con CO₂ al 5%. Las microfotografías de células en cultivo se tomaron con una cámara acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases.

8.1. Cultivo primario de miofibroblastos renales de ratón

Analizamos la expresión de CT-1 y sus receptores (GP130 y LIFR) en miofibroblastos renales, así como la producción de MEC y las vías de señalización implicadas que pudieran

explicar los resultados obtenidos *in vivo* con el modelo de OUU tanto en ratones CT-1^{+/+} como deficientes de CT-1.

Para ello se realizaron cultivos primarios de miofibroblastos renales procedentes de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} siguiendo el método descrito previamente (Munoz-Felix et al, 2014a) con algunas modificaciones.

Debido a que tras la OUU se produce un aumento en el número de fibroblastos activados (Ucero et al, 2014) los riñones se extrajeron de 4 ratones CT-1^{+/+} y 4 ratones CT-1^{-/-} tras 3 días de OUU. Después de su sacrificio por dislocación cervical y tras abrir la caja torácica, los riñones se lavaron en NaCl 0,9% y posteriormente en medio de cultivo HAM'S-F12 estéril y frío suplementado con 500 U/mL de penicilina/estreptomicina. Ya en campana de flujo laminar, se procedió a descapsular los riñones utilizando guantes estériles. Los riñones se trituraron con dos bisturís, y el tejido triturado se trató con una solución de colagenasa tipo IA 0,45 mg/L en HAM'S F-12 y se incubó durante 40 minutos a 37 °C en agitación en un baño húmedo. Se paró la digestión con colagenasa añadiendo el triple de volumen de medio DMEM frío suplementado con 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM y suero bobino fetal (SBF) al 10%. El sobrenadante de esta solución se centrifugó a 600 g durante 3 minutos, se resuspendió el pellet con el "medio de miofibroblastos" DMEM suplementado con 100 U/ml penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM y SBF al 10%. La suspensión celular se sembró en placas de 100 mm.

➤ **Mantenimiento de las miofibroblastos renales**

Estas células presentan el aspecto típico de miofibroblastos en cultivo con numerosos miofilamentos en su superficie y un núcleo redondeado (Kaissling & Le Hir, 2008). En la figura 18 se pueden ver estas células en cultivo.

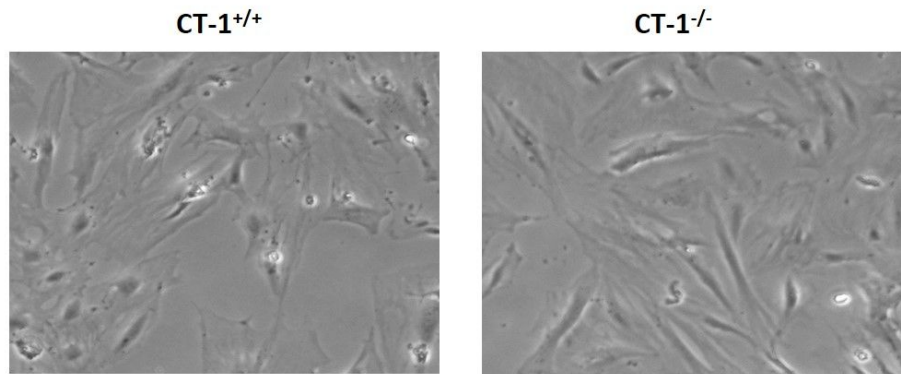


Figura 18. Miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} en cultivo. CT-1: cardiotrofina-1. Magnificación original: 200X.

Al día siguiente de realizar el cultivo se les cambió el medio y se hicieron pases 1:5 o 1:10 sembrando las células en placas de 60 mm. Se utilizó el “medio de miofibroblastos” indicado hasta el pase 3, donde al llegar al 80-90% de confluencia se deplectaron de SBF: se retiró el medio y se añadió medio DMEM suplementado con 100 U/ml penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM y SBF al 0,5% durante 24 horas. Posteriormente se trataron con TGF- β 1 1 ng/mL, CT-1 40 ng/mL o se mantuvieron en medio con 0,5% de SBF (condiciones basales) según el experimento realizado.

Para la caracterización de las células, en todos los cultivos primarios de miofibroblastos se realizaron inmunofluorescencias (según el método que se describe en el apartado 8.6) de α -SMA (figura 19) como han realizado otros autores previamente (Munoz-Felix et al, 2014a; Sharpe et al, 2000).

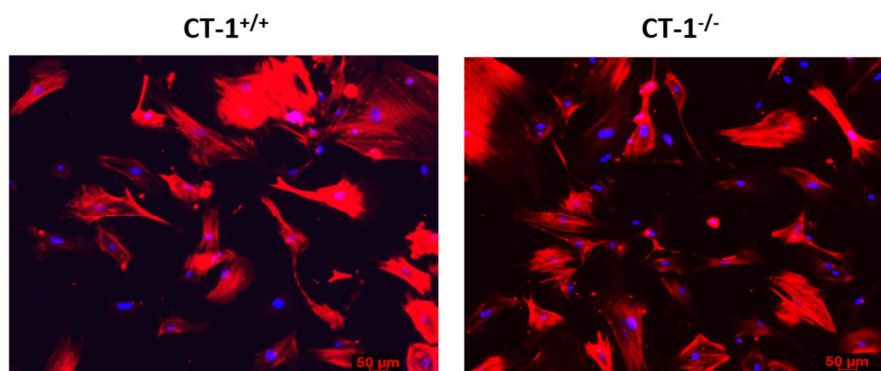


Figura 19. Expresión de α -SMA en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Microfotografías: inmunofluorescencia de α -SMA. α -SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1. Magnificación original: 50X; barra= 50 μ m.

8.2. Cultivo primario de células epiteliales de túbulo proximal de ratón

En las células epiteliales tubulares renales evaluamos la expresión de CT-1 y sus receptores (GP130 y LIFR), y analizamos el posible efecto hipertrófico y promotor de supervivencia de la CT-1 observado previamente *in vitro* (Pennica et al, 1996c; Railson et al, 2000).

Para ello, realizamos cultivos primarios de células epiteliales tubulares procedentes de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} según un método descrito previamente (Sharpe & Dockrell, 2012) con ciertas modificaciones.

Se practicó la dislocación cervical a 4 animales CT-1^{+/+} y 4 CT-1^{-/-}, tras lo que se abrió la caja torácica y se extrajeron los riñones, que se pasaron a medio de cultivo de lavado, HAM's-F-12 suplementado con 100 U/mL penicilina/estreptomicina, estéril y frío. A partir de este momento se trabajó en campana de flujo laminar. Se descapsularon los riñones y con dos bisturís se separó la corteza de la médula y se trituró la corteza. El tejido triturado se cortó en láminas usando un microtomo, posteriormente se pasó a una solución 1,5 mg/mL de colagenasa tipo IA en HAM's-F-12 y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en agitación en un baño húmedo. Se paró la digestión con colagenasa añadiendo 3 veces el volumen que teníamos de HAM's F-12 frío. A continuación, se pasó el triturado por un tamiz de 250 μ m de poro y un colador estéril. El homogenizado obtenido se centrifugó a 400 g durante 2 minutos, el pellet obtenido se resuspendió en HAM's F-12 frío, este proceso se repitió 2 veces más. Después de esta última

centrifugación se resuspendió el pellet en una preparación de Percoll al 50% y Krebs 2x al 50% (NaCl 112,7 mM, KCl 3,3 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,2 mM, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, CaCl_2 0,5mM) y se centrifugó en una ultracentrífuga a 35000 g durante 30 minutos a 4 °C. Al terminar la centrifugación aparecen 4 bandas, siendo la banda 4 los túbulos proximales, que se recogieron y se lavaron 2 veces con HAM's F-12 frío para eliminar el Percoll; para ello se centrifugó a 400 g durante 2 minutos, 2 veces. En el ultimo lavado se resuspendió el pellet en el "medio de células epiteliales" (ADVANCED DMEM-F12 suplementado con HEPES 12,5 mM, L-glutamina 2,5 mM, 100 U/mL penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales al 1%, hidrocortisona al 1%, Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) al 1%, EGF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y SBF al 10%). La suspensión celular se sembró en placas de 100 mm.

➤ **Mantenimiento de las células epiteliales tubulares**

Estas células presentan el aspecto típico de células epiteliales que crecen en colonias y con forma ovalada, en la figura 20 se pueden ver estas células en cultivo.

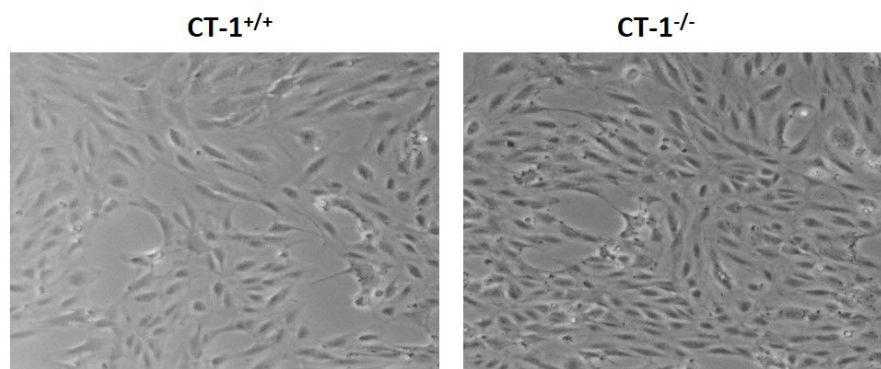


Figura 20. Células epiteliales tubulares renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} en cultivo. CT-1: cardiotrofina-1. Magnificación original: 100X.

El primer cambio de medio de cultivo se llevó a cabo al cuarto día de realizar el cultivo; cuando las células alcanzaron la confluencia se hicieron pases 1:5 o 1:10 sembrándolas en placas de 60 mm. Se utilizó el "medio de células epiteliales" indicado hasta el pase 3, donde al llegar al 80-90% de confluencia se deplectaron de SBF: se retiró el medio y se añadió "medio de células epiteliales" con SBF al 0,5% durante 24 horas. Posteriormente se trataron con CT-1 40 ng/mL,

S3I-201 50 μM o se mantuvieron en medio con 0,5% de SBF (condiciones basales) según el experimento realizado.

Todos los cultivos primarios de células epiteliales se caracterizaron mediante inmunofluorescencia (según el método que se describe en el apartado 8.6) de marcadores típicos de células epiteliales (e-cadherina y pancitoqueratina), como se ha descrito previamente (figura 21) (Chevalier, 2006; Sharpe & Dockrell, 2012).

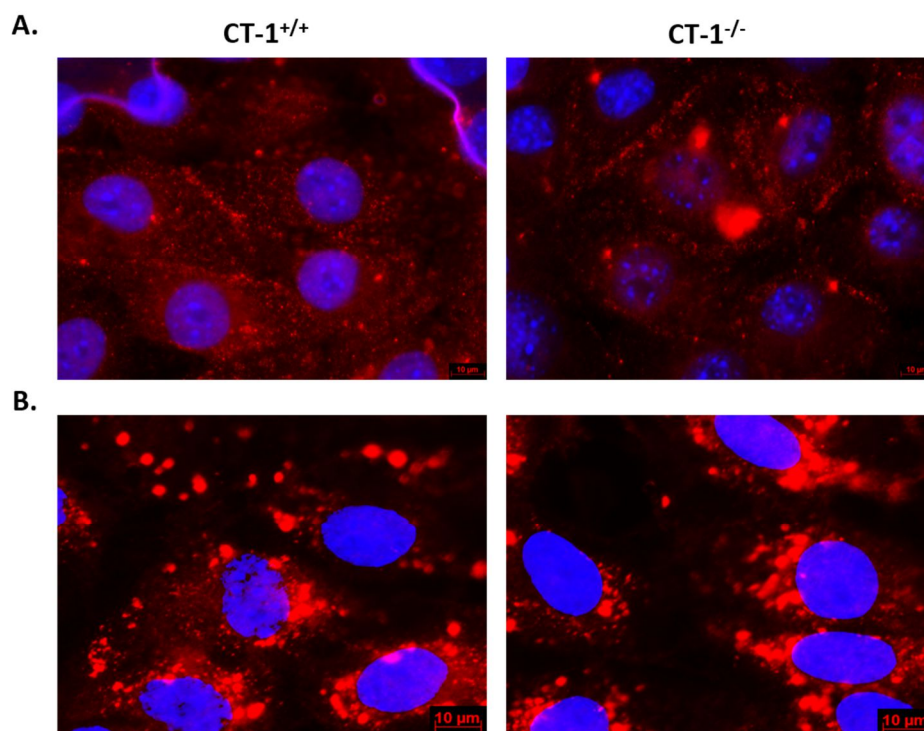


Figura 21. Expresión de pancitoqueratina y e-cadherina en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Microfotografías: inmunofluorescencia de pancitoqueratina (A) (magnificación original: 1000X) y e-cadherina (B) (magnificación original: 630X); barra= 10 μm . CT-1: cardiotrofina-1.

8.3. Cultivo primario de podocitos glomerulares

Analizamos la expresión de CT-1 y sus receptores GP130 y LIFR en podocitos glomerulares procedentes de ratones con fondo genético C57BL/6J según un método descrito previamente (Long et al, 2013; Vasilopoulou et al, 2016). Para ello se necesita un aislamiento previo de los glomérulos.

➤ **Aislamiento de los glomérulos**

Se perfundieron 4 ratones de fondo genético C57BL/6J con una solución con “dynabeads”. La perfusión se realizó siguiendo el siguiente procedimiento: después de resuspender los dynabeads mediante vortex durante 2 minutos y posteriores lavados utilizando un imán DinaMag-2 con PBS al 0,1% BSA se incubó toda la noche en agitación con una solución de Tris 0,2 M pH 8,5 con BSA al 0,5% para activar los dynabeads. Tras la incubación, se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos y usando el imán se lavaron 3 veces con PBS. Se resuspendió en agua destilada y se añadió PBS. Siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.5 de perfusión, se perfundió a cada ratón con 40 mL de esta solución disuelta en PBS. Seguidamente se extrajeron los riñones y ya en campana de flujo laminar y en condiciones estériles se descapsularon y se trituraron con la ayuda de un bisturí. El tejido triturado se digirió con una solución de PBS con 1 mg/mL de colagenasa tipo IA y 200 U/mL de ADNasa a 37 °C en baño húmedo en agitación durante 30 minutos. Pasado este tiempo se pasó el tejido digerido por un filtro estéril de 100 µm de tamaño de poro. El filtrado se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Se resuspendió el pellet en PBS y se recogieron los glomérulos utilizando el imán y lavando 3 veces con PBS. Los glomérulos recogidos con este método están descapsulados.

➤ **Cultivo primario de podocitos**

Se resuspendieron los glomérulos obtenidos en “medio de podocitos” DMEM/F12 suplementado con 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-Glutamina, 1% ITS y 10% SBF y se sembraron en placas de 100 mm cubiertas con matrigel. Los podocitos empezaron a crecer entre el tercer y quinto día; el día 7 se llevó a cabo la separación de los podocitos (figura 22). Se añadió 2 mL de tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,02%) y “medio de podocitos” para desactivar la tripsina, se filtró la suspensión celular en un filtro estéril de 40 µm de poro, por lo que los glomérulos se quedaron en el filtro y los podocitos pasaron a través del poro. Se centrifugó a 600 g durante 5 minutos, se resuspendió el pellet en medio de podocitos y se sembraron en placas de 100 mm cubiertas con matrigel.



Figura 22. Glomérulos en cultivo. Crecimiento de los podocitos tras 1, 4 y 7 días de ser resuspendidos los glomérulos. Magnificación original: 100X.

➤ **Mantenimiento de podocitos glomerulares**

Se hicieron pases 1:5 o 1:10 en placas de 100 mm con cobertura de matrigel. En todo momento se utilizó el “medio de podocitos” indicado anteriormente. Se trabajó con células entre pases 3 y 6. Para la caracterización de los podocitos, en todos los cultivos primarios se realizaron inmunofluorescencias de marcadores específicos como nestina y nefrina, según el método que se describe en el apartado 8.6 (figura 23).

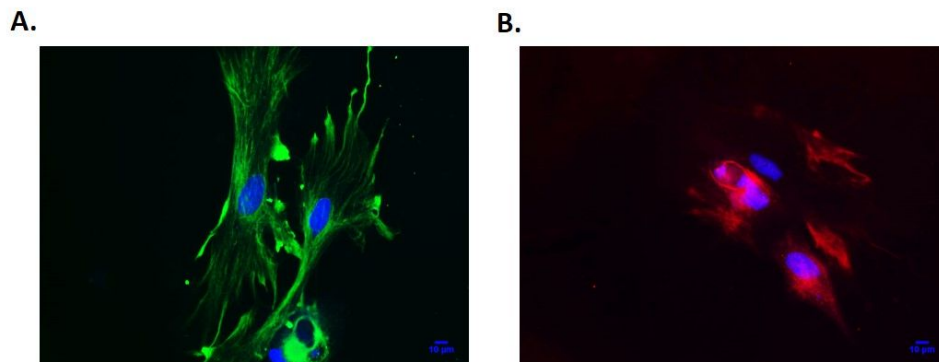


Figura 23. Expresión de nestina y nefrina en podocitos glomerulares en cultivo primario. Microfotografías: inmunofluorescencia de nestina (A) y nefrina (B). Magnificación original: 200X; barra= 10 µm.

8.4. Línea celular inmortalizada de podocitos de ratón

Hemos utilizado además una línea celular inmortalizada de podocitos de ratón, que fue generada por el grupo de investigación de Peter Mundel (Mundel et al, 1997b) a partir de un cultivo primario de glomérulos aislados de ratones transgénicos H-2K^b-tsA58 (Mundel et al, 1997a). De los 10 clones obtenidos se seleccionaron aquellos en los que todas sus células expresaban WT1 (del inglés, *Wilms Tumor 1*). Estas células pueden ser cultivadas de dos formas: a 33 °C y suplementadas con IFN- γ (condiciones permisivas) donde mantienen una morfología epitelial y proliferativa, y a 37 °C y sin IFN- γ (condiciones no permisivas) donde disminuye la proliferación y se diferencian con una morfología arborizada y un fenotipo con pedicelos similar al que tienen las células *in vivo* (Mundel et al, 1997b).

➤ **Mantenimiento de las células inmortalizadas de podocitos de ratón**

Estas células se cultivaron en placas cubiertas con matrigel al 1%. Para su proliferación se cultivaron a 33 °C con medio RPMI suplementado con 1% penicilina/estreptomicina, IFN- γ 10 U/ μ L y 10% SBF (condiciones permisivas), el medio de cultivo se cambió cada 48 horas y cuando estuvieron confluentes se hicieron pases en dilución 1:5 o 1:10. Para inducir la diferenciación a podocitos maduros se incubaron a 37 °C con RPMI suplementado con 1% penicilina/estreptomicina y 10% SBF (condiciones no permisivas), se mantuvieron en estas condiciones durante 14 días hasta que adquirieron el fenotipo típico de podocitos con pedicelos cambiando el medio cada 48 horas y haciendo pases 1:2 cuando estuvieron confluentes. Los experimentos en estas células se llevaron a cabo 14 días después de su diferenciación siguiendo siempre en las condiciones no permisivas. En la figura 24 se pueden ver estas células en las condiciones permisivas y no permisivas.

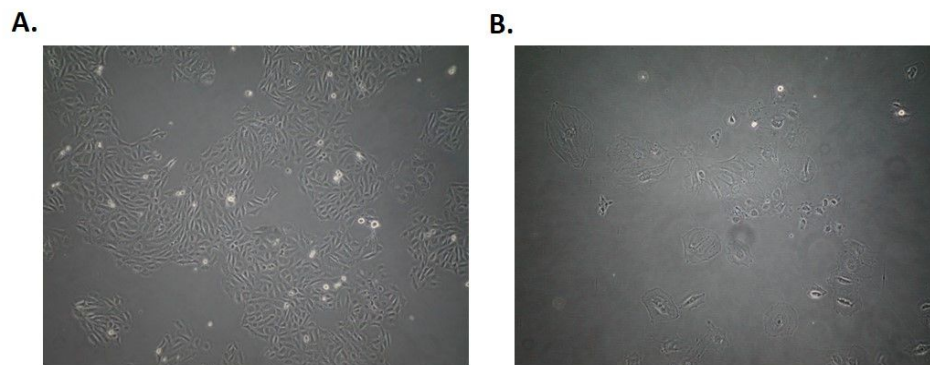


Figura 24. Podocitos inmortalizados en cultivo. A. Podocitos no diferenciados en condiciones permisivas (33 °C + INF- γ). B. Podocitos diferenciados tras 14 días en condiciones no permisivas (37 °C). INF- γ : interferón gamma. Magnificación original: 100X.

8.5. Técnicas básicas de cultivos celulares

8.5.1. Recuento celular

Después de tripsinizar las células, una muestra de la suspensión celular se mezcló en proporción 1:1 con azul de trypan, que es capaz de penetrar a través de la membrana de células muertas o dañadas, pero no de células vivas, que se observan refringentes sobre el fondo azul del medio. A continuación, 10 μ L de esta mezcla se depositaron en una cámara de contaje y se introdujo en el contador electrónico *Countess® Automated Cell Counter*. Este contador es capaz de discriminar las células viables de las no viables, suministrando valores en número de células por mililitro. El recuento se hizo siempre por duplicado.

8.5.2. Tripsinización celular

Todas las células con las que trabajamos son adherentes, por lo que para su mantenimiento se transfirieron al material de trabajo adecuado (placas Petri, cubreobjetos, etc).

Se utilizó la técnica de la tripsinización celular para despegar del plástico a las células adheridas y volverlas a sembrar en otro soporte. Después de retirar el medio y lavar con PBS, se añadió tripsina-EDTA para romper los enlaces de cationes bivalentes que unen las células a la superficie de la placa, o a la cobertura de matrigel en su caso. La acción de la tripsina se detuvo aproximadamente a los 3 minutos con medio de cultivo frío, por saturación de sustrato, y a continuación las células se transfirieron a un tubo estéril. La suspensión celular se centrifugó a

600 g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo, dependiendo de su posterior utilización.

Si el experimento lo requería, en este punto se procedió al recuento celular

8.5.3. Congelación y descongelación de las células

Para el mantenimiento de las líneas celulares, las células inmortalizadas de podocitos de ratón se congelaron en distintos pases. En el caso de las células de cultivo primario de miofibroblastos se congelaron en pase 1 y las células de cultivo primario de podocitos se congelaron en pase 2.

Para congelar las células, primero se tripsinizaron de la forma explicada anteriormente. Las células se resuspendieron en 2 mL de medio frío con SBF al 20% y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%. Para cada línea se utilizó su medio de cultivo específico. La suspensión celular resultante se pasó a un vial de crioconservación que se almacenó dentro de un recipiente relleno de isopropanol, en el que la temperatura va disminuyendo lenta y gradualmente siguiendo un gradiente de 1 °C por minuto cuando se introduce en un ultracongelador a -80 °C. Después de 24 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. En el caso de la línea celular de podocitos inmortalizada y de los podocitos de cultivo primario se congeló 1 placa de 100 mm llena por cada criovial y en el caso de los miofibroblastos de cultivo primario 3 placas de 60 mm por cada criovial.

Para su descongelación, se introdujeron los viales en un baño de agua a 37 °C y, una vez descongelados, se transfirió rápidamente el contenido a 10 mL del medio de cultivo específico de cada línea celular para diluir rápidamente el DMSO. Se centrifugó la suspensión celular a 600 g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo y se sembraron las células en una placa de cultivo.

8.6. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia de células en cultivo

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal estériles. Una vez alcanzada la confluencia adecuada, se lavaron con PBS 1X. A continuación, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% y, tras un lavado con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos. Los cubreobjetos se incubaron con solución de bloqueo,

consistente en BSA al 2% en PBS. Las células se incubaron con anticuerpo primario durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubaron 45 minutos con anticuerpo secundario fluorescente. Los anticuerpos se prepararon a la concentración indicada en la Tabla 5. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó 3 veces con PBS 1X y se tiñeron los núcleos incubando los cubreobjetos en una solución acuosa 2 μ M de Hoechst 33258. En último lugar se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando 10 μ L de ProLong Gold Antifade. Analizamos las preparaciones en un microscopio óptico de fluorescencia.

Tabla 5. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia en células en cultivo

Ac primario	Dilución	Ac secundario	Dilución	Fluoróforo
AcM de ratón anti- α -SMA A2547 (Sigma-Aldrich)	1:100	Anti-ratón	1:300	CY3
AcM de rata anti-cardiotrofina-1 MAB438 (R&D system)	1:100	Anti-rata	1:300	Alexa Fluor 488 o CY3
Ac de ratón anti-e-cadherina 610182 (Pharmingen)	1:100	Anti-ratón	1:300	CY3
AcP de conejo anti-GP130 3732 (cell signaling)	1:100	Anti-conejo	1:300	CY3
AcP de conejo anti-LIFR Sc-659 (cell signaling)	1:100	Anti-conejo	1:300	CY3
AcP de cobaya anti-nefrina GP-N2 (Progen)	1:75	Anti-cobaya	1:300	CY3
AcP de pollo anti-nestina NB100-1604 (Novus biologicals)	1:200	Anti-pollo	1:300	Alexa Fluor 488
AcM de ratón anti-pancitoqueratina Sc-17843 (Santa Cruz)	1:50	Anti-ratón	1:300	CY3

8.7. Silenciamiento génico mediante transfección con ARNsi

Para evaluar el efecto de la ausencia de CT-1 en los podocitos celulares inmortalizados, después de su diferenciación en podocitos maduros se transfectaron con ARNsi contra CT-1 utilizando lipofectamina como agente de transfección consiguiendo un silenciamiento en la expresión de dicho gen. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en placas cubiertas con matrigel se añadió medio Opti-MEM (25%) seguido de ARNsi contra CT-1 10 μ M y de lipofectamina RNAiMAX (0,165%), se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se añadieron la cantidad de células requeridas para cada experimento (ensayo de proliferación, migración o morfología del citoesqueleto) con un volumen del 75% respecto del volumen total (con Opti-MEM, lipofectamina y ARNsi). A este grupo se les denominó ARNsi CT-1.

En cada experimento se incluyeron los siguientes controles:

- Células no trasfectadas: contiene medio Opti-MEM y la suspensión celular. Denominadas NT.
- Células expuestas al agente de transfección sin adición del ARNsi: contienen Opti-MEM, lipofectamina y la suspensión celular. Denominadas LP.
- Células trasfectadas con un ARNsi-control, se trata de una secuencia de ARN que no tiene ningún gen blanco: contiene medio Opti-MEM, lipofectamina, ARNsi-control y la suspensión celular. Denominadas ARNsi-control.

Las células se incubaron a 37 °C hasta un máximo de 72 horas; en cada grupo experimental se evaluó la eficacia de la reducción de expresión de CT-1 mediante qPCR de CT-1 (explicado en apartado 11.5).

8.8. Ensayo de hipertrofia celular

Los estudios de hipertrofia celular se llevaron a cabo calculando el cociente proteína/ADN y mediante inmunofluorescencia de faloidina que nos permite medir el área total de la célula.

8.8.1. Cociente proteína/ADN

El cociente proteína/ADN se ha utilizado por otros autores para analizar hipertrofia celular en células epiteliales tubulares (Liu & Preisig, 2002), considerando que un mayor cociente proteína/ADN se corresponde con un aumento del tamaño celular.

Para ello se sembraron por triplicado 10^6 células en placas de 6 pocillos, y al día siguiente se deplectaron de SBF, lavándolas con PBS 1X y añadiendo “medio de células epiteliales” con SBF al 0,5% durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se estimularon con CT-1 40 ng/mL o se les añadió medio con SBF al 0,5% durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS 1X; resuspendidas en PBS 1X se contaron tal como se ha explicado en el apartado 8.5.1. De cada pocillo se separaron en un tubo eppendorf 5×10^5 células para medir concentración de proteínas (tal como se explica en el apartado 9.2) y en otro tubo eppendorf 5×10^5 células para extraer ADN y medir su concentración.

En los experimentos en los que además se estimularon las células con S3I-201, inhibidor de la fosforilación de STAT3, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: tras las 24 horas de depleción de SBF, a las placas del grupo “S3I-201 50 μ M” se les añadió S3I-201 50 μ M, a las placas del grupo “S3I-201+CT-1” se les añadió S3I-201 50 μ M y a las 2 horas se les añadió CT-1 40 ng/mL, a las placas del grupo “CT-1 40 ng/mL” se les añadió CT-1 40 ng/mL añadiendo 2 μ L de DMSO/mL de medio ya que es el vehículo en el que está disuelto el S3I-201 y a las placas del grupo control “0,5% SBF” se les cambió el medio añadiendo 2 μ L DMSO/mL medio; tras 48 horas se siguió con el mismo procedimiento que ya se ha mencionado.

Para la extracción de ADN, se incubaron los tubos eppendorf con 100 μ L de tampón de lisis (Tris pH 7,5 1 M; EDTA pH 8 0,5 M; NaCl 5 M; DTT 1 mM; espermidina 0,5 mM; H₂O) suplementado con 25 μ L de proteinasa K por 1 mL de tampón de lisis a 55 °C durante toda la noche en baño seco. Posteriormente se hirvieron las muestras a 100 °C durante 2 minutos para inactivar la proteinasa K, y después de que se enfriara se añadió 1 μ L de ARNasa (100 μ g/mL) a cada tubo y se incubó en baño seco a 37 °C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos y se cuantificó el ADN (que aparece en el sobrenadante) con el Nanodrop ND-1000.

8.8.2. Inmunofluorescencia de faloidina

Otra valoración del tamaño celular se llevó a cabo visualizando los filamentos de actina de las células mediante inmunofluorescencia con faloidina.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal estériles. Una vez alcanzada la confluencia adecuada (en este caso será poca confluencia, para ver las células aisladamente), se lavaron con PBS 1X. A continuación, se fijaron las células con PFA al 4% y, tras un lavado con PBS, se permeabilizaron las células incubando con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos. Los cubreobjetos se incubaron con solución de bloqueo, consistente en BSA al 2%. A continuación, las células se incubaron con faloidina AlexaFluor 594 durante 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se tiñeron los núcleos incubando los cubreobjetos en una solución acuosa 2 μM de Hoechst 33258 durante unos segundos. En último lugar se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando 10 μL de ProLong Gold Antifade. Analizamos las preparaciones en un microscopio óptico de fluorescencia. Se realizaron 30 fotografías de cada portaobjetos y con el software *Fiji* se midió el área celular de cada célula. Se calculó la media del área celular de las 30 células fotografiadas de cada portaobjetos.

8.9. Ensayos de proliferación celular

Los estudios de proliferación celular se realizaron mediante el método del “MTT”, que se basa en la relación directa (en un determinado rango lineal) entre la cantidad de células metabólicamente activas (viables) existentes en un cultivo, y la cantidad de formazán (sustancia de color morado azulado) que producen cuando se incuban con el sustrato amarillento MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Mosmann, 1983). El viraje de color del medio de cultivo del amarillo -debido a la sal de tetrazolio- al morado -debido a los cristales de formazán- por parte de las células que producen NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) o NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) (cofactores necesarios en esta reacción de reducción), se cuantifica espectrofotométricamente mediante la determinación de la absorbancia a 595 nm.

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: se sembraron el mismo número de células (12×10^4) por pocillo en 500 μL de medio de cultivo en placas de 24 pocillos. Con las células epiteliales y miofibroblastos se realizó una depleción de SBF 24 horas antes de añadir CT-1 o el medio de cultivo correspondiente según el experimento.

En el caso de los podocitos en los que se evaluó el efecto del silenciamiento de CT-1 se realizó la transfección con ARNsi contra CT-1 según se ha explicado en el apartado 8.7.

Finalizado el tiempo de tratamiento o de transfección en cada caso se añadieron al medio de cultivo, en condiciones estériles, 50 μL de MTT (5 mg/mL en solución salina tamponada de PBS preparado según las especificaciones del fabricante). Tras 4 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de 5% de CO_2 y 95% aire, durante las que las células vivas pudieron transformar el MTT a formazán, se añadieron 500 μL de 10% dodecil sulfato sódico (SDS) en HCl 0,01 M, para disolver en el medio de cultivo los cristales de formazán producidos. Todo ello se incubó durante la noche a 37 °C en las mismas condiciones atmosféricas anteriormente descritas. A la mañana siguiente se cuantificó la absorbancia a 595 nm con un lector de placas. Un mayor número de células metabólicamente activas se corresponde con una mayor cantidad de cristales de formazán y, por lo tanto, con una mayor absorbancia.

8.10. Ensayo de migración mediante cierre de herida o scratch

El ensayo de cierre de herida permite determinar la cantidad de células que migran cuando se desplazan a través de una “herida”, “scratch” o región sin células en el soporte en el que están sembradas.

Se sembró un número de células inmortalizadas de podocitos (8×10^4) y de miofibroblastos de cultivo primario (10^5) en placas de 6 pocillos, de tal forma que alcanzaran la confluencia el día de realizar la herida, por pocillo y por duplicado. En el caso de los miofibroblastos se deplectaron de SBF, lavando con PBS y añadiendo medio con 0,5% SBF el día antes de realizar la herida. En los podocitos se realizaron dos experimentos diferentes; uno para evaluar el efecto de la ausencia de la expresión de CT-1, por lo que 48 horas antes de realizar la herida se llevó a cabo la transfección con ARNsi-CT-1 tal como se ha explicado en el apartado 8.7.; y otro para analizar el efecto de la estimulación con CT-1 40 ng/mL añadida justo después de realizar la herida, este experimento de estimulación con CT-1 40 ng/mL también se llevó a cabo en el caso de los miofibroblastos.

Con la ayuda de una punta de pipeta de 200 μL se practicaron 4 scratches, 2 horizontales y 2 verticales, en la monocapa de células. Se lavaron los restos celulares con medio y se incubaron las células con medio fresco o con medio con CT-1 40 ng/mL según el experimento realizado.

Con la ayuda de una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases, se tomaron fotos de 4 regiones por cada pocillo, cada 10 minutos durante 24 horas. Las células se mantuvieron en todo momento en una atmósfera a 37 °C, y CO₂ al 5%.

Se analizaron las fotografías iniciales de cada región, y aquellas correspondientes a un tiempo en el que no se hubiese cerrado completamente ningún scratch, en el caso de los miofibroblastos a las 6 y 12 y 24 horas, y en el caso de los podocitos a las 6 y 24 horas. Se contó el número de células que migraban dentro de la herida en cada una de las cuatro regiones fotografiadas.

8.11. Estudio de la morfología del citoesqueleto de podocitos

Analizamos el efecto de modular los niveles de CT-1 (mediante silenciamiento o estimulación con CT-1) en la morfología del citoesqueleto de la línea celular inmortalizada de podocitos tras 14 días de diferenciación a podocitos maduros.

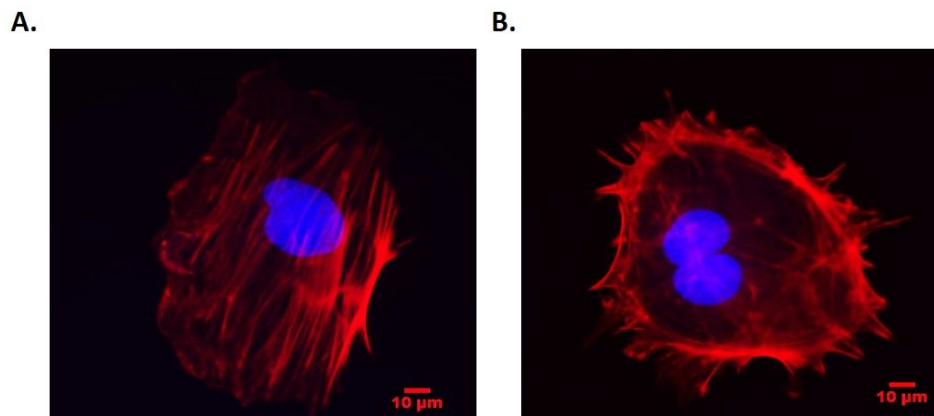


Figura 25. Distribución de filamentos de actina en podocitos maduros inmortalizados. Microfotografías: inmunofluorescencia de faloidina. Imágenes representativas de la distribución de los filamentos de actina en fibras citoplasmáticas de estrés (A) o con una distribución cortical (B). Magnificación original: 200X.

Evaluamos el tamaño celular siguiendo el mismo procedimiento de tinción con faloidina explicado en el apartado 8.8.2.

Para el análisis de la organización del citoesqueleto cuantificamos en las células teñidas con faloidina la distribución de las fibras de actina de manera cortical o en fibras citoplasmáticas

de estrés tal como se muestra en la figura 25 y como se ha llevado a cabo en otros estudios (Vasilopoulou et al, 2016).

Se diseñaron dos grupos experimentales:

Grupo 1: para evaluar el efecto de la ausencia de expresión de CT-1, se sembraron 15×10^3 células en cada cubreobjetos por duplicado de cada grupo experimental (células NT, células LP, células ARNsi-control y células ARNsi-CT-1) y se llevó a cabo una transfección con ARNsi contra CT-1 como se ha explicado en el apartado 8.7. Tras 48 horas de transfección se fijaron las células y se realizó la inmunofluorescencia de faloidina como se ha explicado en el apartado 8.8.2. Se realizaron 30 fotografías de cada cubreobjetos en un microscopio óptico de fluorescencia, se cuantificó la distribución de las fibras de actina y se midió el área celular con el software *Fiji*.

Grupo 2: para evaluar el efecto de la estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 24 horas, se sembraron 15×10^3 células en cada cubreobjetos por duplicado de cada grupo experimental (células controles, células estimuladas con CT-1). Al día siguiente se estimularon con CT-1 40 ng/mL o se les renovó el medio de cultivo y tras 24 horas se fijaron las células y se realizó la inmunofluorescencia de faloidina así como su cuantificación del mismo modo que en el grupo 1 explicado previamente.

8.11.1. Ensayo de actividad de RhoA y Cdc42

La activación de RhoA y Cdc42 regula el citoesqueleto de actina y la migración celular de los podocitos (Raftopoulou & Hall, 2004). Evaluamos la actividad de RhoA y Cdc42 en podocitos maduros tras 48 horas de transfección con ARNsi contra CT-1 y tras 24 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Se sembraron 8×10^4 células por pocillo por duplicado y se llevó a cabo mediante la utilización de dos kits de ELISA colorimétricos “*RhoA G-LISA Activation Assay Kit*” y “*Cdc42 G-LISA Activation Assay kit*” siguiendo las indicaciones del fabricante para la obtención del lisado celular y el posterior ensayo colorimétrico.

Cada kit contiene en los pocillos de la placa una proteína que se une a Rho-GTP o a Cdc42-GTP en cada caso. De este modo la Rho-GTP activa o Cdc42-GTP activa que se encuentra en el lisado celular se une al pocillo de la placa mientras que la Rho-GDP inactiva y la Cdc42-GDP inactiva se eliminan durante los lavados. La proteína RhoA o Cdc42 activa unida es detectada con un anticuerpo específico antiRhoA o antiCdc42. Posteriormente se produce una unión

específica con un anticuerpo conjugado con la enzima HRP, y tras añadir un sustrato colorimétrico para la enzima HRP se produce una reacción enzimática. El color producido por la acción de dicha enzima en el sustrato fue medido en un lector de placas de ELISA a 490 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la cantidad de RhoA o Cdc42 activada.

9. Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot

La técnica de western blot (Gallagher et al, 2004) permite la identificación y localización de proteínas de un extracto celular o de tejido. Se basa en la separación de proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida en función de su peso molecular y su posterior transferencia a una membrana. En dicha membrana las proteínas son reconocidas mediante anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) y anticuerpos secundarios, que reaccionan con los anticuerpos primarios y están conjugados con la enzima HRP que, al reaccionar con su sustrato, produce una reacción fácilmente detectable y relativamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

9.1. Obtención de extractos de proteínas de tejidos y células

Para la extracción de proteínas tisulares se pulverizaron los tejidos en hielo seco y se pesaron 20-30 mg del pulverizado. Se lisó el tejido con 1 mL de tampón de lisis por 100 mg de tejido: Tris base 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10% e IGEPAL CA-630 al 1% en frío al que se le añadieron inhibidores de proteasas (aprotinina 1 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 100 mM) e inhibidores de fosfatasas (NaF 0,5 M y Na_3VO_4 100 mM). Con la ayuda de un politrón Ultra-turrax T8 se procedió a la homogenización de las muestras.

Para la obtención de extractos proteicos totales de células en cultivo, se trabajó con las células en un estado de semiconfluencia (aproximadamente un 90%). Las placas con las células en cultivo se colocaron sobre hielo para ralentizar la degradación celular. Se lavaron con PBS 1X frío y se lisaron con el tampón de lisis frío (Tris-HCl pH 7,5 mM, NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10% e IGEPAL CA-630) suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas anteriormente indicados. Se lisó la muestra con el uso de rascadores.

En ambos casos, el lisado celular se centrifugó a 14600 g a 4 °C durante 20 minutos. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante (extracto de proteínas) y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

9.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas, se utilizó el kit comercial colorimétrico “*DC™ Protein Assay*”, basado en el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Para las muestras de tejido, se hizo previamente una dilución 1:20 de la muestra en tampón de lisis. Se hizo reaccionar una muestra (5 µL) por triplicado de cada uno de los extractos proteicos, así como de cada uno de los puntos de una recta patrón de BSA de concentraciones conocidas (0-1 mg/mL) en una placa de 96 pocillos, con los reactivos del kit (25 µL de la mezcla de reactivos A+S y 200 µL de reactivo B). Se midió la absorbancia del producto de reacción a 720 nm en un lector de placas de ELISA y se analizaron los resultados con el programa *Gen 5.0*. A partir de la recta patrón de concentraciones conocidas de BSA se extrapolaron las concentraciones de proteínas de las muestras.

9.3. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes y reductoras con el fin de deshacer su estructura tridimensional. Para ello se añadió el tampón de carga Laemmli (Tris 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,0005%; pH 6,8) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos (Laemmli, 1970). Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida o SDS-PAGE (del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) con distinto porcentaje de poliacrilamida según el tamaño de la proteína a analizar. Se utilizaron geles preparados en nuestro laboratorio (Tris base 0,4 M, pH 8,8, persulfato de amonio (APS) al 0,1%, TEMED al 0,08% y acrilamida diluida al porcentaje requerido) o geles comerciales. La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®III donde el gel se encuentra sumergido en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3, SDS al 0,1%). En otro pocillo del gel se cargó un marcador de proteínas de pesos moleculares conocidos. El SDS por su capacidad de unirse a las proteínas, enmascara su carga positiva, de tal manera que las proteínas cargadas negativamente se desplazan hacia el polo positivo separándose únicamente por su peso molecular.

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés, *polyvinylidene fluoridide*). La transferencia se llevó a cabo mediante el método húmedo en la cubeta Mini PROTEAN®III donde el gel y la membrana están sumergidos en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 92 mM, metanol al 20%). El gel se encuentra en el polo negativo y la membrana en el polo positivo, y debido al campo eléctrico formado las proteínas migran hacia el polo positivo y quedan atrapadas en la membrana.

9.4. Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Una vez finalizada la transferencia, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por proteínas. Para ello se incubó la membrana con tampón de bloqueo, BSA en tampón de lavado (Tween-20 al 0,1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5); la concentración de BSA depende de la proteína estudiada, variando entre el 3 y 5%, durante 2 horas en agitación. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante al menos 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG conjugada con la enzima HRP, capaz de reconocer una región específica del anticuerpo primario), diluido en tampón de lavado, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. La tabla 6 muestra los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y su dilución. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado.

Tabla 6. Condiciones de los anticuerpos utilizados para western blot

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
AcM de ratón anti- α -SMA A2547 (Sigma-Aldrich)	1:4000	Anti-ratón	1:10000
AcM de rata anti-cardiotrofina-1 MAB438 (R&D system)	1:1000	Anti-rata	1:10000
AcP de conejo anti-fibronectina AB2033 (Millipore)	1:1000	Anti-conejo	1:10000

AcP de cabra anti-CTGF (L-20) sc-14939 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-cabra	1:10000
AcP de conejo anti-colágeno I Ab755P (Chemicon)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcM de ratón anti-GAPDH AM4300 (Ambion)	1:50000	Anti-ratón	1:10000
AcP de conejo anti-caspasa-3 activada 9661 (Cell signaling)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de cabra anti-ICAM-1/CD54 AF796 (R&D Systems)	1:1000	Anti-cabra	1:10000
AcP de cabra anti-COX-2 (C-20) sc-1745 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-cabra	1:10000
AcM de cabra anti-p-NF-κB p65 3033 (Cell signaling)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de conejo anti-iNOS/NOS2 (N-20) sc-650 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de conejo anti-IκB-α (C-21) sc-371 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de conejo anti-PCNA 610664 (Pharmingen)	1:1000	Anti-ratón	1:10000
AcP de conejo anti-VCAM-1 (C-19) sc-1504 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-cabra	1:10000
AcP de conejo anti-pAKT (ser 473) 9271L (Cell signaling)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de conejo anti-AKT1/2 (H136) sc-8312 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-conejo	1:10000

AcM de conejo anti-p-STAT3 9145 (Cell signaling)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcP de conejo anti-STAT3 Ab7966 (Abcam)	1:1000	Anti-conejo	1:10000
AcM de ratón anti-pERK (E-4) sc-7383 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-ratón	1:10000
AcP de conejo anti-ERK (K-23) sc-94 (Santa Cruz biotechnologies)	1:1000	Anti-conejo	1:10000

9.5. Revelado

Para la detección de la señal ofrecida por el anticuerpo secundario, se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol potenciada con fosfo-iodofenol. Las membranas se incubaron durante 1 minuto en una solución ECL (Tris-HCl 1M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, p-iodofenol 2,2 mM) suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06%. La enzima HRP unida al anticuerpo secundario cataliza el H₂O₂ y libera O₂ que oxida el luminol. El luminol oxidado emite una señal de luminiscencia, que será mayor cuanto más proteína haya, puesto que unirá mayor cantidad de anticuerpo y habrá más catálisis enzimática en ese punto.

Esta señal impresionó en cámara oscura a una película de autorradiografía FUJIFILM que fue revelada mecánicamente (máquina de revelado Medical X Ray). Finalmente, se digitalizaron las películas utilizando el programa de tratamiento de imágenes *Adobe Photoshop 7.0*, y las imágenes resultantes se cuantificaron mediante el programa *Scion Image*.

10. Análisis de la actividad enzimática de metaloproteasas de matriz mediante zimograma

Se trata de una técnica electroforética que permite observar la actividad de diferentes enzimas. Se realizó con geles de poliacrilamida y gelatina mediante electroforesis en condiciones suaves (sin agentes reductores) para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas.

Para la obtención de las muestras, se lisaron 20 mg de tejido pulverizado con 0,2 mL de tampón de lisis: Tris base 20 mM, pH 7,5; NaCl 140 mM, glicerol 10% e IGEPAL CA-630 1% en frío. Con la ayuda de un politrón se homogeneizaron las muestras. Se centrifugó a 14600 g a 4 °C durante 20 minutos. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo del mismo modo que se ha explicado en el apartado 9.2.

➤ **Preparación de las muestras y electroforesis**

Las muestras se prepararon en condiciones no reductoras para evitar la pérdida de la actividad de las enzimas. Se añadió el tampón de carga (Tris 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%, y azul de bromofenol 0,0005%; pH 6,8). Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de gelatina bovina al 0,2%, SDS-PAGE 8%. Se utilizaron geles preparados en el laboratorio (Tris base 0,4 M, pH 8,8; APS 0,1%, TEMED 0,08%, acrilamida 8% y gelatina bovina 0,2%). La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®III donde el gel se encuentra sumergido en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH 8,3, SDS 0,1%,) a 80 mV y cubierto con hielo para evitar la activación de proteasas. En otro pocillo del gel se cargó el sobrenadante de células HT1080 como marcador, donde las dos bandas que aparecen corresponden a la MMP2 y MMP9 sin activar.

Tras la electroforesis, los geles se llevaron 3 veces con Tritón X100 2,5%.

➤ **Estimulación de las proteasas y tinción del gel**

Para activar las proteasas y que comiencen a degradar el gel, se incubaron los geles con Tris 50 mM pH 8, CaCl₂ 5 mM durante toda la noche a 37 °C y en agitación.

Posteriormente se llevó a cabo la tinción mediante la técnica de Azul de Coomassie: se incubaron los geles con solución de Coomassie blue: 50% metanol, 0,05% Coomassie brilliant blue G 250 y 10% ácido acético glacial, durante 4 horas en agitación suave. Se retiró esta solución y se incubó con la solución *destaining* (30% metanol, 10% ácido acético glacial) durante 1 hora agitando lentamente; se retiró esta solución y se añadió *destaining* fresco hasta que se observaron bandas azules sobre un fondo claro.

Las bandas que aparecen por debajo de las bandas de MMP2 o MMP9 sin activar corresponden a MMP2 o MMP9 activadas, respectivamente.

11. Análisis del nivel de expresión génica por qPCR

11.1. Extracción de ARN de tejido

Para la obtención de ARN de las muestras de tejido renal se utilizó el kit comercial “*NucleoSpin[®]RNA*”. Este método se basa en la separación del ARN mediante cromatografía de adsorción. Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos son solubles en soluciones acuosas ya que están recubiertos de una capa de moléculas de agua. Con la adición de iones caotrópicos se destruye esta estructura ordenada de moléculas de agua creándose un entorno hidrofóbico alrededor de los ácidos nucleicos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos son retenidos en la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

En primer lugar, se pulverizó el tejido y se lisó en el tampón RA1 del kit, suplementado con β -mercaptoetanol al 1%. El lisado se filtró por unas columnas específicas y se pasó a una columna capaz de retener los ácidos nucleicos en la membrana de sílica. Se incubó con ADNasa recombinante para eliminar el ADN que pudiera permanecer en la membrana de sílica. Se hicieron 3 lavados con tampones de lavado para eliminar sales, metabolitos y componentes macromoleculares y finalmente el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas permitiendo devolver la capa hidratante de agua alrededor de estos ácidos nucleicos y liberarlos así de la membrana en la que estaban retenidos.

El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se almacenó a -80 °C.

11.2. Extracción de ARN de células en cultivo

Se sembraron las células en placas de 35 mm y se dejó que alcanzaran un estado de semiconfluencia (aproximadamente el 90%). Cuando estuvieron listas, se empleó, al igual que en el caso anterior, el kit comercial “*NucleoSpin[®]RNA II*” para aislar el ARN. De igual modo, el ARN obtenido se cuantificó con el Nanodrop ND-1000 y se almacenó a -80 °C.

11.3. Obtención de ADNc

Para el análisis de la expresión génica necesitamos utilizar ADN como sustrato de la reacción. La obtención de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo mediante la técnica de transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, del inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*) que permite sintetizar ADNc a partir de ARN gracias a la enzima transcriptasa reversa.

Para sintetizar ADNc, se diluyeron 400 ng de ARN de cada muestra con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 16 μL . Se añadieron 4 μL de la iScript RT Supermix 5X, que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo(dT), random primers, inhibidor de ARNasas, estabilizadores de MgCl_2 y el tampón de reacción. Los 20 μL totales fueron incubados en un termociclador MyCycler a 25 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a 42 °C y 5 minutos finales a 85 °C. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C.

11.4. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores, se utilizó la base de genes del NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Mediante la herramienta *Primer-BLAST*, se seleccionó la pareja de cebadores que se consideró que mejor reunía los requisitos: porcentaje de pares GC en torno al 50%, longitud del amplicón en torno a 100 pb, y grado de autocomplementariedad bajo.

Se llevaron a cabo dos pruebas para verificar en cada caso el funcionamiento de la pareja de cebadores. En primer lugar, un gradiente de temperaturas consistente en una qPCR que utiliza diferentes temperaturas de anillamiento. Esta prueba nos permitió, por una parte, elegir la temperatura de anillamiento a la que mejor funcionasen nuestros cebadores, es decir, que tuviese un Ct más bajo (ver apartado 11.5). Por otro lado, el análisis de la curva de melting del producto de PCR nos permitió saber si se había amplificado un solo producto o había habido amplificaciones inespecíficas que por tanto invalidasen el uso de estos cebadores. Debido a la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de melting similar por su composición en pares de bases, llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenido en la anterior prueba. De este modo, pudimos comprobar que nuestra pareja de cebadores sólo ofrecía un producto de PCR.

Posteriormente, comprobamos la eficiencia de amplificación de nuestra pareja de cebadores, amplificando diluciones seriadas 1:3 de una muestra, y comprobando que el producto de PCR obtenido en cada muestra conservaba la proporción con respecto a la muestra sin diluir. Así, se elaboró una recta que enfrentaba el Ct con la dilución de la muestra. Se consideraron válidas rectas con un valor de R^2 superior a 0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía la reacción de PCR en cada muestra, o pendiente de la recta, debía estar entre el 90 y el 110%.

Un resultado positivo en ambas pruebas validaba nuestros cebadores para su uso.

Las parejas de cebadores utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Cebadores de diseño propio y condiciones de PCR

Gen	Secuencia de los cebadores (5'→3')	Tª de anillamiento
Colágeno I	GGAGAGAGCATGACCGATGGA GGTGGACATTAGGCGAGGAA	56
Cd68	GGGGCTCTTGGGAACTACAC GTACCGTCACAACCTCCCTG	60
IL-1β	GCCTGTGTTTTCTCCTTGC TGCTGCCTAATGTCCCCTG	59
Fibronectina	TGACAGTTGGGTCACCCTGTT GGTGTCTGGGTGACTTTCT	59
GP130	CGGCTCATATGGAAGGCACT CCCACCTTGTTTCTTGCTGC	56
LIFR	AGAAGTGAGGAATGCCACAA AACCCGAAAGTGTATGCAG	56
Rps13	GATGCTAAATCCGCCTGAT TAGAGCAGAGGCTGTGGATG	59
Hprt	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA GCAAATCAAAAGTCTGGGGA	60

11.5. PCR cuantitativa, qPCR o PCR a tiempo real

La técnica de PCR permite la amplificación de una determinada región de ADN gracias a la utilización de cebadores específicos que anillan a ambos flancos de dicha región y a la capacidad de una enzima ADN polimerasa para sintetizar ADN nuevo mediante la copia de la secuencia de dicha región gracias a la elongación de los cebadores (Bessman et al, 1958). Se denomina reacción en cadena porque esta copia se produce durante ciclos sucesivos, dando lugar a la amplificación exponencial del ADN (Mullis et al, 1986). Es posible realizarla tanto a partir de ADN genómico como de ADNc obtenido mediante la retrotranscripción del ARN. Además, nos permite monitorizar la cantidad de copias de ADN al final de cada ciclo de amplificación debido a la adición de un fluoróforo capaz de unirse al ADN cuando está en estado de doble hélice. Se requiere un software acoplado al termociclador para registrar la emisión de fluorescencia de cada muestra y generar una curva de amplificación sigmoidea.

Para llevar a cabo la reacción de PCR, en el caso de los cebadores caseros, se mezclaron 1 μL de ADNc, 10 μL de la Supermix iQTMSYBR[®]Green, 0,4 μL de cada cebador y 8,2 μL de H₂O mQ. Para el cebador comercial de CT-1 (primePCR assay qMmuCID0020747) se mezcló 1 μL de ADNc, 10 μL de la Supermix iQTMSYBR[®]Green, 1 μL del PrimePCR Assay y 8 μL de H₂O mQ. Se utilizó un termociclador iQTM 5 empleando el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización, etapa en la que se abre la doble hélice de ADN), 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica (unión de los cebadores a las hebras de ADN), 30 segundos a 72 °C (elongación). El termociclador detecta la señal fluorescente emitida, siendo ésta mayor cuanto más producto de PCR hay. Cuando el protocolo finaliza, se produce un aumento en la temperatura del termociclador de 70 °C a 90 °C que conlleva la desnaturalización del ADN y un decaimiento de la señal fluorescente, obteniendo la curva de melting o disociación del producto de PCR. Para confirmar que estamos amplificando un solo producto, esta curva debe ser única. El software establece una línea horizontal que corta a las curvas de amplificación de cada muestra cuando están en su fase exponencial, denominada línea de umbral. Posteriormente, a partir de los Ct de las muestras (ciclo de amplificación de cada muestra en el que la curva de amplificación en fase exponencial corta la línea de umbral) calcula los niveles de expresión relativos de las distintas muestras de estudio. Un Ct más bajo implica que en esa muestra se alcanza antes la fase exponencial de amplificación y por tanto hay una mayor cantidad de ADN del gen analizado.

Se utilizaron como *housekeeping* la expresión de los ARNm de rps13 (del inglés, *ribosomal protein S13*) y Hprt (del inglés, *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*).

12. Tratamiento de los datos y análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). En la experimentación *in vivo* se utilizaron al menos cuatro animales para cada grupo, y en la experimentación *in vitro* se hicieron como mínimo tres experimentos.

Se aplicó el test Kolmogorov-Smirnov a los conjuntos de datos para comprobar si su distribución era normal (se ajustaba a una campana de Gauss). En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos mientras que en caso negativo, se aplicó una transformación logarítmica de los valores obtenidos que dió lugar a su distribución normal. Para datos normales, se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre más de dos grupos de datos y el test estadístico t de student para determinar diferencias significativas entre dos grupos. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$. En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio del ANOVA, empleamos para las comparaciones “post hoc” el test de Dunnett para comparar cada grupo de estudio con el grupo control o el test de Turkey para comparar todos los grupos de estudio entre ellos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism 6.

Tabla 8. Relación de productos y reactivos utilizados

Reactivo / Producto	Referencia	Casa comercial
Ácido acético glacial	90062	Merck
Ácido acético	20104.243	Prolabo
ADN polimerasa	10.003	Biotoools
ADNasa	D5025	Sigma-Aldrich
ADVANCED DMEM-F12	12634	Thermo Fisher Scientific
Adyuvante completo de Freud (ACF)	F5881	Sigma-Aldrich
Agarosa	50000	Lonza
Aguja 25 gauges	9186158	Braun
Aminoácidos no esenciales	029K2390	Sigma-Aldrich
Aprotinina	A-1153	Sigma-Aldrich
APS (Persulfato de amonio)	A3678	Sigma-Aldrich
ARNasa	79254	Qiagen
ARNsi-CT-1	sc-39328	Santa Cruz Biotechnology
ARNsi-control	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology
Azida sódica	6688	Merck
Azul de bromofenol	B8026	Sigma-Aldrich
Azul de trypan	T10282	Thermo Fisher Scientific
Bisacrilamida	161-0107	Bio-Rad
BSA (albúmina sérica bovina)	A7906	Sigma-Aldrich
Buprex (buprenorfina)	-	RB Pharmaceuticals
CaCl ₂	C-7902	Sigma-Aldrich
Cebadores qPCR	-	Isogen Life Science
Cebadores comerciales qPCR	-	Bio-Rad
Cdc42 G-LISA Activation Assay	BK 127	Cytoskeleton
Colagenasa tipo IA	C-9891	Sigma-Aldrich
Coomasie brilliant blue G	27815	Sigma-Aldrich
Crioviales	5000-0020	Thermo Fisher Scientific
Cubreobjetos	200x200	Thermo Fisher Scientific
Cardiotrofina-1 recombinante de ratón	250-25	Prepotech
DCTM Protein Assay (Lowry)	5000112	Bio-Rad
Diaminobenzidina	D4293	Sigma-Aldrich
DMEM/F12	41966-054	Thermo Fisher Scientific
DMSO (dimetil sulfóxido)	154938	Sigma-Aldrich
dNTP	11277049001	Roche

Dolethal (pentobarbital)	-	Vetoquinol
DTT (ditiotreitól)	D0632	Sigma-Aldrich
Dynabeads® M-450	14011	Invitrogen
EDTA (etilendiaminotetracético)	E5134	Sigma-Aldrich
EGF	E-9644	Sigma-Aldrich
ELISA detection kit (Albúmina)	E90-134	Bethyl laboratories
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Espermidina	S0266	Sigma-Aldrich
Etanol	100983	Merck
Faloidina Alexa fluor 594	A12381	Invitrogen
FeCl₃	F-1734	Sigma-Aldrich
Filtros estériles	-	Corning
Formaldehido	344198	Calbiochem
Gelatina bovina	G-9391	Sigma-Aldrich
Geles criterion SFX	567-8093	Bio-rad
Glicerol	D4751	Sigma-Aldrich
Glicina	161-0724	Bio-Rad
H₂O₂	H-6520	Sigma-Aldrich
HAM's-F12	21765	Thermo Fisher Scientific
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Hematoxilina de Mayer	MHS16	Sigma-Aldrich
HEPES	H-4034	Sigma-Aldrich
Hidrocortisona	H-0396	Sigma-Aldrich
Hoechst 33258	H3569	Thermo Fisher Scientific
IGEPAL CA-630	I3021	Sigma-Aldrich
In situ Cell Detection Kit	11684809910	Roche
Inmunoglobulina G	I5131	Sigma-Aldrich
Insulina	I1882	Sigma-Aldrich
IFN-γ recombinante (interferón gamma)	PMC4031	Invitrogen
iScript RT Supermix	170-8841	Bio-Rad
Isoflurano IsoFlo	34009XN	Esteve
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
KCl	P9333	Sigma-Aldrich
KH₂PO₄	P5655	Sigma-Aldrich
Leupeptina	L-2023	Sigma-Aldrich
L-glutamina	G-8540	Sigma-Aldrich

Lipofectamina RNAiMAX	13778-075	Invitrogen
Luminol	A8511	Sigma-Aldrich
Marcador 1 kb	10787-018	Thermo Fisher Scientific
Marcador pesos moleculares <i>PageRuler™</i>	26616	Thermo Fisher Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Science Tools (F.S.T.)
Matrigel®	356237	Corning
Membranas de PVDF	66543	Pall Corporation
Metanol	34885	Sigma-Aldrich
MgSO ₄ ·7H ₂ O	121310	Probus
MTT (metil tetrazolio)	M5655	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₄	S-6508	Sigma-Aldrich
NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NaF	56776	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® RNA II	740.955	Macherey Nagel
Opti-MEM	31985-062	Invitrogen
PAS staining Kit	1016460001	Merck
p-iodofenol	I10201	Sigma-Aldrich
Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX	47410	Fuji Medical
Penicilina – Estreptomicina	15140-122	Thermo Fisher Scientific
Pepsina	P-7012	Sigma-Aldrich
Percoll	17-0891-02	Ge Healthcare
PFA (paraformaldehído)	P6148	Sigma-Aldrich
Pipetas de plástico de 5, 10 y 25 mL	-	Corning
Placas de cultivo	-	Corning
PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo)	P-1585	Sigma-Aldrich
PO ₄ H ₂ K	P-5655	Sigma-Aldrich
Portaobjetos	76x26	Thermo Fisher Scientific
ProLong® Gold Antifade	P36934	Thermo Fisher Scientific
Proteínasa K	03115879001	Roche
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	2000/80/16	Deltalab
QuantiChrom™ Urea Assay Kit	DIUR-500	Bioassay Systems
Rascadores de células	353086	Corning
RhoA G-LISA Activation Assay Kit	BK 124	Cytoskeleton
Rojo Sirio (Direct red 80)	365548	Sigma-Aldrich
RPMI	21875-034	GIBCO

SBF (suero bovino fetal)	10270-106	GIBCO
SDS (Dodecil sulfato sódico)	152002C	Bio-Rad
Selenio	S-9138	Sigma-Aldrich
Soluble Collagen Assay Sircol	S1000	Biocolor
Supermix IQ™SYBR® Green	170-8882	Bio-Rad
Sutura 5/0 no absorbible	CO765074	Braun
Sutura 5/0 reabsorbible	49552-24	Braun
S3I-201	SML0330	Sigma-Aldrich
Tamiz	0305801	CISA
TEMED (tetrametil-etilendiamina)	142093	PanReac
TGF-β1 recombinante humano	7754	R&D Systems
Trans-blot®turbo™	3622-42	Bio-Rad
Tripsina 0,25% - EDTA 0,02%	25200	Thermo Fisher Scientific
Tris base	443866G	Merck
Triton-X100	X100	Sigma-Aldrich
Tubos de plástico de 15 y 50 mL	-	Corning
Tubos de plástico de 2 mL	4092.7N	Deltalab
Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
Xileno	141769	Panreac
β-mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

Tabla 9. Relación de equipos y aparatos utilizados

Equipos / Aparatos	Casa comercial
Cámara digital Olympus DP70	Olympus
Campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48	Flow Laboratories
Cassette de revelado	Amersham
Centrífugas	Eppendorf
Countess® Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific
Equipo electroforesis PCR	Bio-Rad
Equipo de Western blot Mini-Protean®III	Bio-Rad
Escáner	Canon
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Imán DinaMag-2 para tubos de 2 mL	Thermo Fisher Scientific
Incubador de células Forma Scientific 3111	Thermo Fisher Scientific

Lector de placas ELISA E1x800	BioTek
Máquina anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Máquina de revelado Medical X Ray Processor	Kodak
Microscopio de contraste de fases 2 ELW 0.3	Nikon
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
Microscopio óptico Olympus BX51	Olympus
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific
Politrón Ultra-turrax T8	IKA Labortechnik
Termociclador iQTM 5	Bio-Rad
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad
Transiluminador GelDoc	Bio-Rad
Ultracentrifuga	Beckman
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific

Tabla 10. Relación de programas y softwares informáticos utilizados

Programas / Softwares informáticos	Casa comercial
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
DP Controller	Olympus
Fiji (Image j)	Fiji
GraphPad Prism 6	GraphPad
Gen 5.0	Bio-Tek
Image Pro Plus	Media Cybernetics
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Primer Blast	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
Scion Image	Scion Corporation

Resultados

1. Expresión de cardiotrofina-1 y sus receptores (GP130 y LIFR) en riñón de ratones

Con el objetivo de analizar el efecto de la CT-1 endógena y de la administración de CT-1 en distintos modelos experimentales de enfermedad renal, hemos comprobado que los riñones expresan CT-1 y sus receptores GP130 y LIFR mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia (figura 26), y mediante western blot (sección 2.1 de resultados). Tal y como se muestra en la figura 26 CT-1, GP130 y LIFR se expresan en riñón de ratón. Esta expresión se observa tanto en células tubulares como en células glomerulares. Hasta el momento sólo se conocía la expresión de ARNm de CT-1 en riñón, pero no de la proteína.

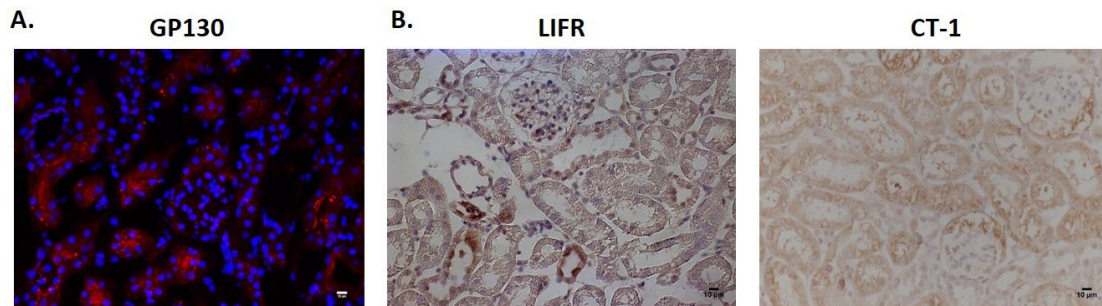


Figura 26. Expresión de cardiotrofina-1 y sus receptores en riñones de ratones. A. Inmunofluorescencia de GP130. B. Inmunohistoquímica de LIFR y CT-1. Magnificación: 400X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF.

2. Papel de la CT-1 endógena en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial

Para analizar el papel de la CT-1 endógena en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial utilizamos el modelo experimental de OUU, como se ha detallado en la sección de métodos 3.1. este modelo replica muchas de las características fisiopatológicas de esta enfermedad, como son: apoptosis de células tubulares, infiltración de células proinflamatorias, estrés oxidativo, proliferación de miofibroblastos y excesiva acumulación de MEC dando lugar a fibrosis tubulointersticial (Chevalier et al, 2009). Por lo tanto, con este modelo experimental evaluamos

el proceso inflamatorio y daño tubular inicial tras 3 días de OUU y la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de UUU.

2.1. Papel de la CT-1 endógena en la fibrosis tubulointersticial tras 15 días de OUU

Para este estudio, realizamos OUU durante 15 días a ratones macho CT-1^{-/-} de 3 meses de edad y a sus respectivos controles CT-1^{+/+}.

➤ Expresión de CT-1 en el modelo de OUU

Verificamos que los riñones de ratones CT-1^{-/-} no expresan CT-1 (figura 27).

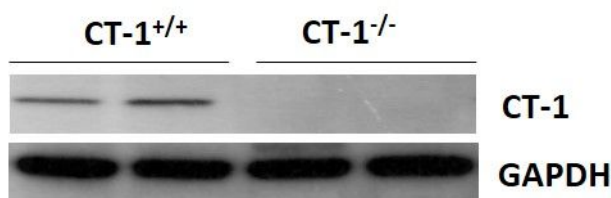


Figura 27. Expresión de CT-1 en riñones de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de CT-1. Se utilizó GAPDH como control de carga. CT-1: cardiotrofina-1.

A continuación, evaluamos si la nefropatía obstructiva modifica los niveles de expresión de CT-1. Mediante qPCR observamos una mayor expresión de los niveles de ARNm de CT-1 en los riñones O con respecto a los riñones NO tras 15 días de OUU (figura 28A). Mediante inmunohistoquímica observamos el mismo aumento en la expresión de la proteína, fundamentalmente en los túbulos (figura 28B). Estos resultados muestran que la OUU estimula la expresión de CT-1.

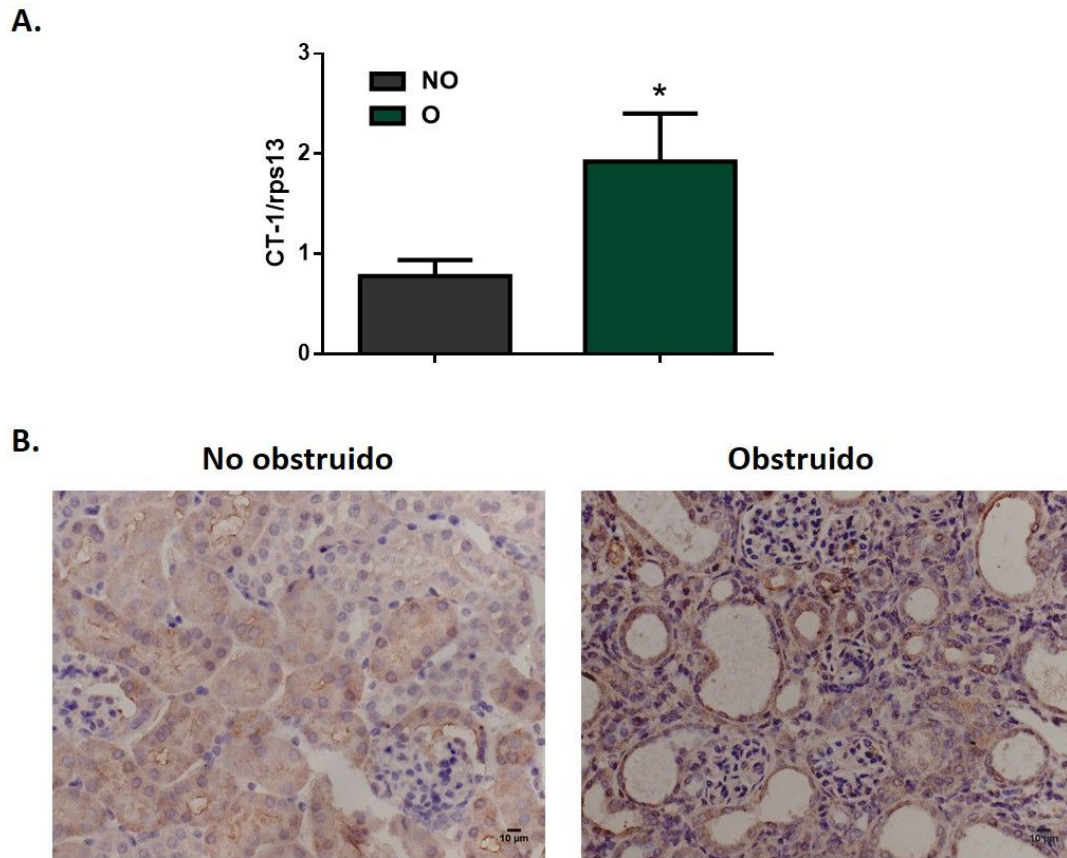


Figura 28. Análisis de la expresión de CT-1 en riñones NO y O de ratones CT-1^{+/+} tras 15 días de obstrucción. A. qPCR de los niveles de expresión de ARNm de CT-1 en riñones NO y O; se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media ± error estándar de la media. B. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de CT-1 en riñones NO y O. NO (n=6), O (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a NO. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos.

➤ **Efectos de la ausencia de CT-1 en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial**

Comprobamos que tras 15 días de OUU los riñones O procedentes tanto de ratones CT-1^{+/+} como de ratones CT-1^{-/-} muestran las características típicas de la nefropatía obstructiva: dilatación tubular, hidronefrosis y daño tubulointersticial; se puede observar una mayor cantidad de estas alteraciones en los riñones O de ratones CT-1^{-/-} que en los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 29).

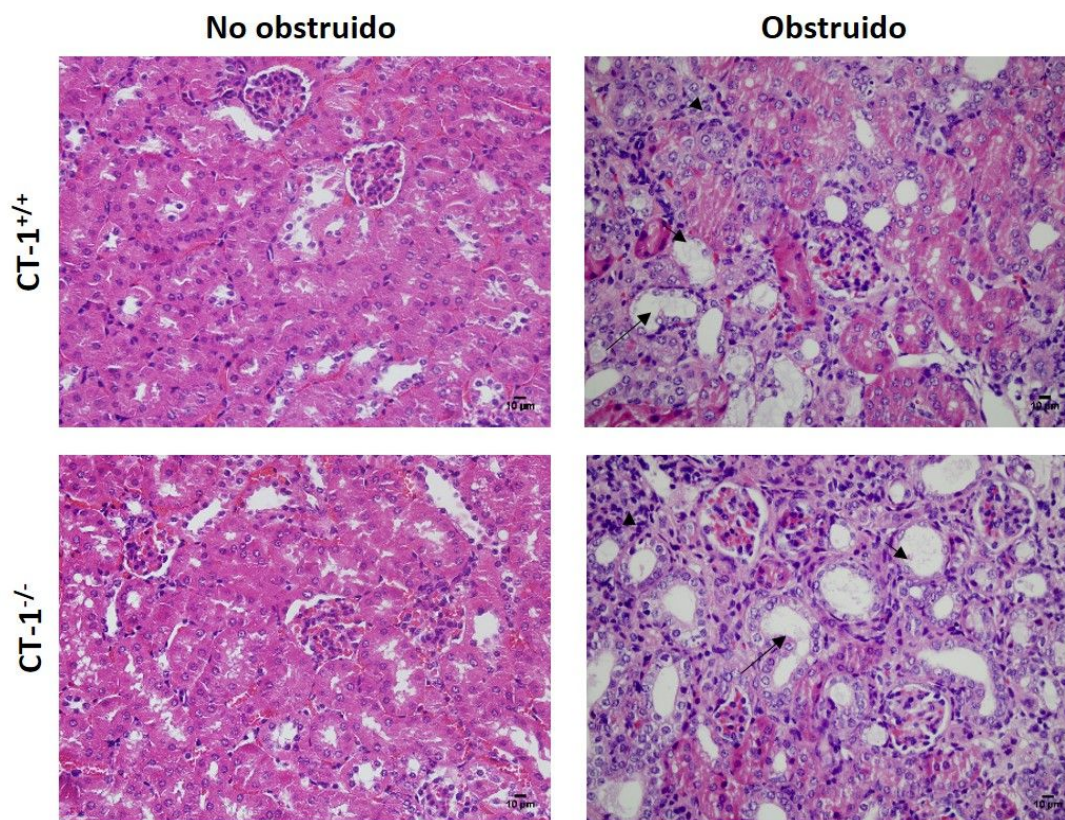


Figura 29. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina en riñones NO y riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} tras 15 días de obstrucción. Las flechas largas señalan dilatación tubular, las flechas cortas señalan atrofia tubular y las cabezas de las flechas marcan hiper celularidad. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos.

Para evaluar el grado de fibrosis renal, se realizó tinción con Rojo Sirio y tricrómico de Masson. La OUU induce un aumento de fibrosis (figuras 30-31) tanto en ratones CT-1^{+/+} como en CT-1^{-/-}, sin observarse diferencias entre los riñones NO de ambos grupos. Los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor tinción con Rojo Sirio y con tricrómico de Masson (Figuras 30-31). La fibrosis tubulointersticial evaluada por Rojo Sirio muestra que los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor área de fibrosis tubulointersticial que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 30B). La síntesis de colágeno total en los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} es mayor que en los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 31B). Además, hay una mayor expresión de ARNm de colágeno I en los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} que en los O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 32A).

Por último, observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} muestran una mayor expresión de fibronectina, CTGF y colágeno I que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 32B).

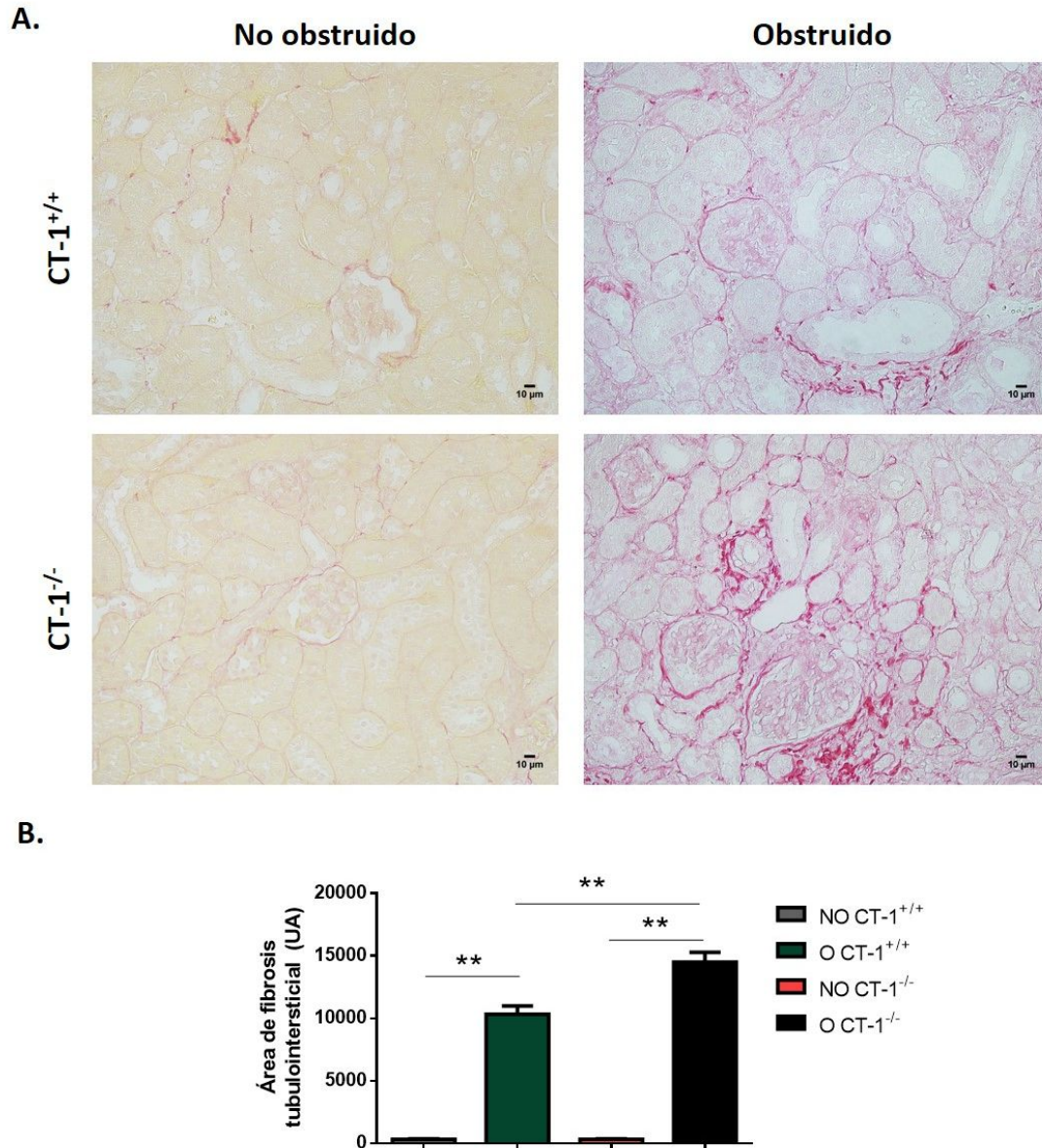


Figura 30. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial mediante tinción con Rojo Sirio tras 15 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de tinción con Rojo Sirio en riñones O y NO de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. B. Cuantificación del área de fibrosis tubulointersticial evaluada con la tinción de Rojo Sirio. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

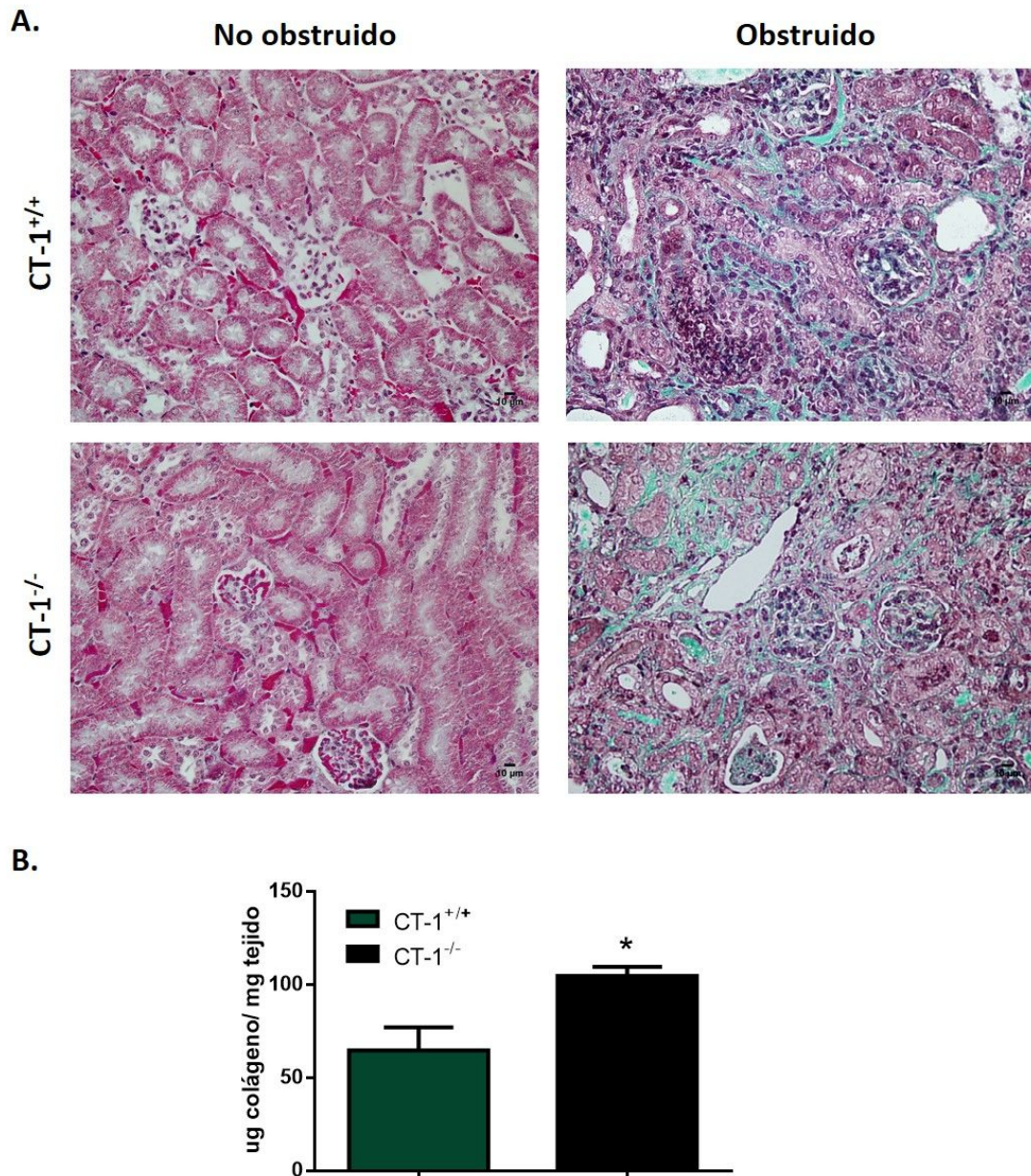


Figura 31. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción. Imágenes representativas de tinción con tricrómico de Masson en riñones O y NO de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. B. Síntesis de colágeno total en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos.

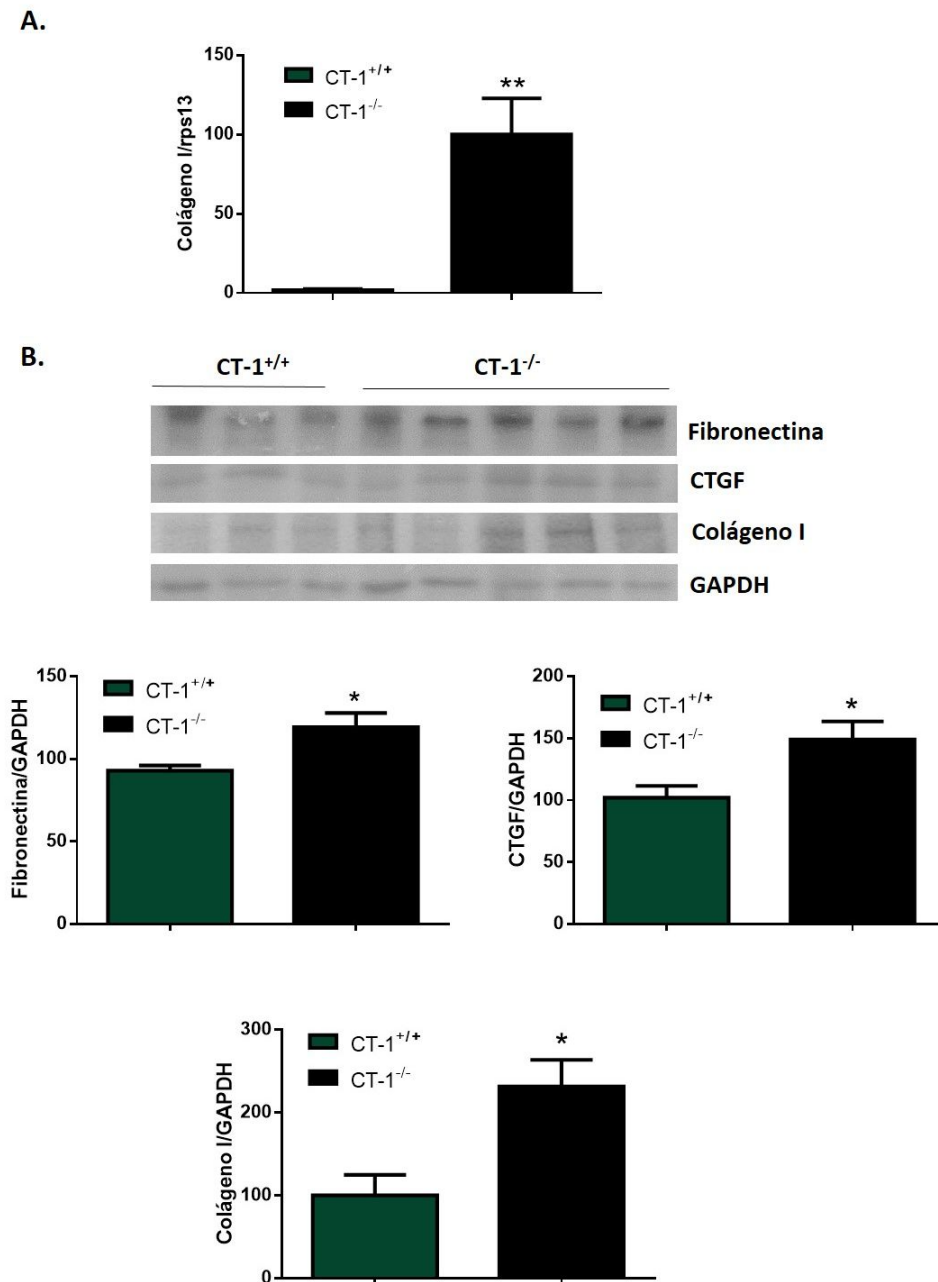


Figura 32. Análisis de la expresión de proteínas características de fibrosis tubulointerstitial tras 15 días de obstrucción. A. Análisis mediante qPCR de la expresión de los niveles de ARNm de colágeno I en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media \pm EEM. B. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de fibronectina, CTGF y colágeno I en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga; las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm EEM. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1, EEM: error estándar de la media, O: obstruidos.

Estos datos indican que la ausencia de CT-1 no afecta a la regulación de la producción de colágeno en los riñones NO, pero aumenta la respuesta fibrogénica inducida por la OUU. Estos resultados, junto con el aumento en la expresión de CT-1 observada tras la OUU sugieren que la CT-1 endógena tiene un papel protector en el desarrollo de la fibrosis renal.

➤ Expresión de fosfo-STAT3

Se ha demostrado en un modelo experimental en ratas que tras la OUU se produce un aumento de expresión de p-STAT3 (Kuratsune et al, 2007). En un estudio en ratones se observó que el aumento de p-STAT3 observado tras la OUU daba lugar a una disminución de la fibrosis renal mediante la activación de MMP2 (Koike et al, 2014). Además, se ha relacionado la activación de la vía de JAK/STAT con una disminución de fibrosis en corazón, riñón e hígado (Hilfiker-Kleiner et al, 2004; Koike et al, 2014; Plum et al, 2010).

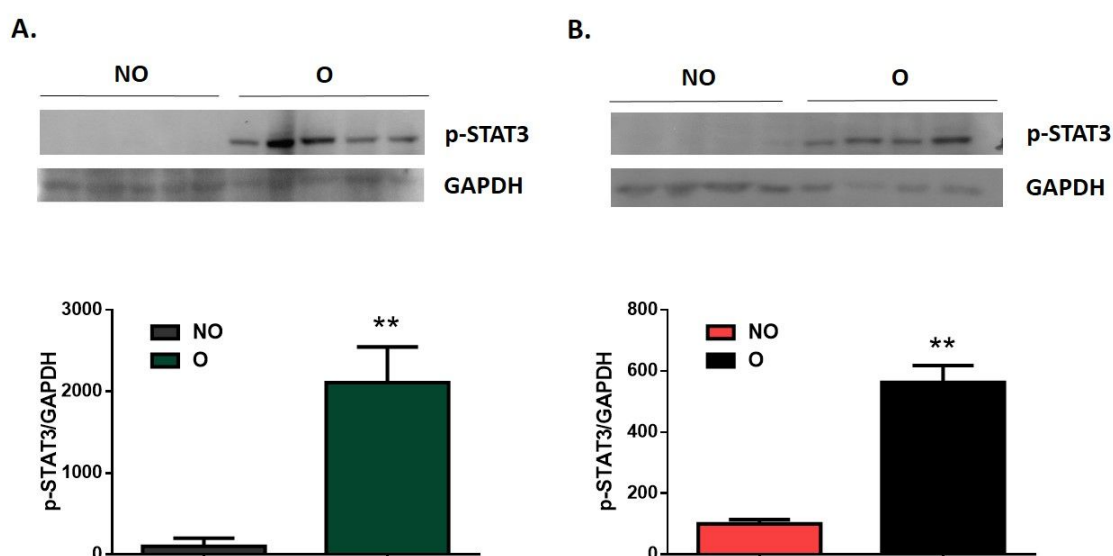


Figura 33. Análisis de la expresión de p-STAT3 tras 15 días de obstrucción. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de p-STAT3 en los riñones NO y O de ratones CT-1^{+/+} (A) y CT-1^{-/-} (B). Se utilizó GAPDH como control de carga; las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos representan las medias ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Test estadístico: T de Student. * p<0,05 ** p<0,01 con respecto a NO. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos.

Por tanto, evaluamos la expresión de p-STAT3 tras 15 días de OUU. Observamos que tras 15 días de OUU aumenta la expresión de p-STAT3 en los riñones O comparados con los NO tanto en ratones CT-1^{+/+} como en ratones CT-1^{-/-} (figura 33).

Así mismo, observamos una mayor expresión de p-STAT3 en los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} comparado con los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} (figura 34A). Mediante zimografía evaluamos la actividad de la MMP2 y observamos que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} muestran un ligero aumento de la actividad de MMP2 frente a los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} (figura 34B).

Por tanto, el menor grado de fibrosis tubulointersticial observado en los ratones CT-1^{+/+} comparado con los ratones CT-1^{-/-} tras la OUU podría ser debido en parte a la mayor fosforilación de STAT3 que origina una mayor actividad de MMP2 y por tanto una mayor degradación del exceso de MEC producido.

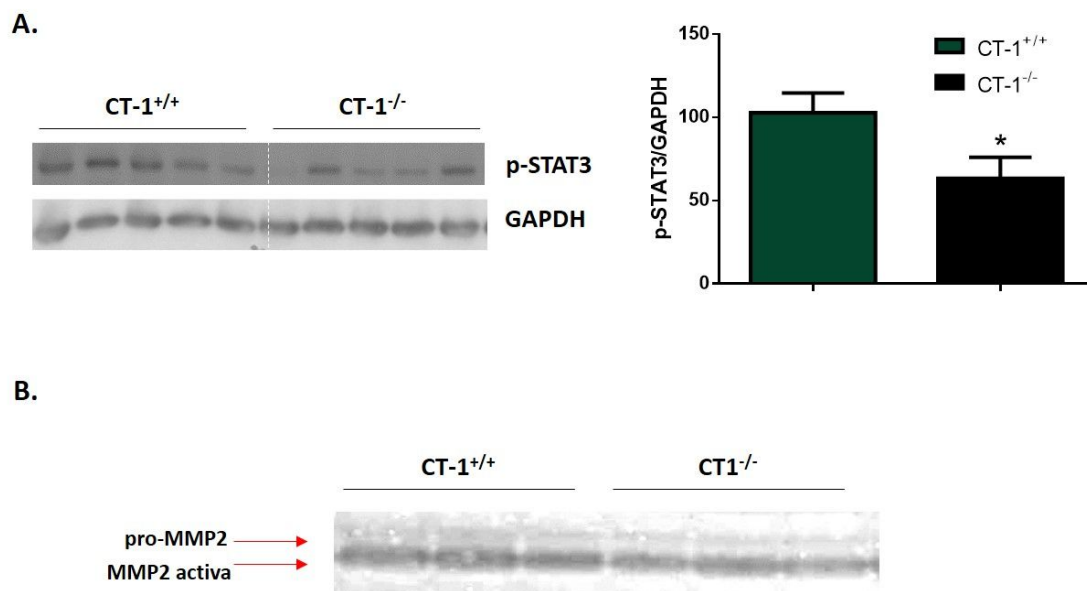


Figura 34. Análisis de la expresión de p-STAT3 y de la actividad de la MMP2 tras 15 días de obstrucción.

A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de p-STAT3 en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas del análisis por zimograma de gelatina de la actividad de la MMP2 en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1, MMP2: metaloproteasa-2, O: obstruidos.

2.2. Papel de la CT-1 endógena en las fases tempranas del daño tubulointersticial

Realizamos OUU durante 3 días a ratones macho CT-1^{-/-} de 3 meses de edad y a sus respectivos controles CT-1^{+/+}. Evaluamos el daño tubular y apoptosis celular, aumentos en el número de miofibroblastos y la respuesta inflamatoria, que son mecanismos que promueven el daño temprano en el modelo de OUU (Ucero et al, 2014).

➤ Expresión de los receptores de CT-1

Analizamos los niveles de expresión de ARNm de GP130 y LIFR en los riñones O y NO de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} tras 3 días de OUU. No se encuentran diferencias en los niveles de expresión de ARNm en ninguno de los dos receptores ni entre los riñones de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} ni diferencias tras la OUU (figura 35). Por lo tanto, ni la obstrucción ni la ausencia de CT-1 afecta a los niveles de expresión renal de estos receptores.

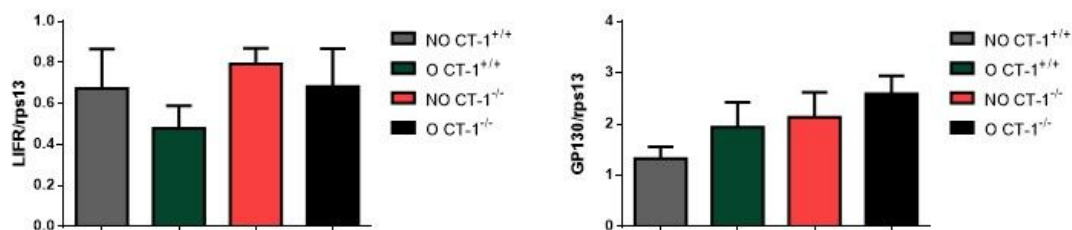


Figura 35. Análisis de la expresión de LIFR y de GP130 tras 3 días de obstrucción. qPCR de la expresión de ARNm de LIFR y GP130 en riñones O y NO de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF, NO: no obstruidos, O: obstruidos.

➤ Análisis histológico del daño tubular

Mediante tinción con HE estudiamos cambios en la corteza de los riñones NO y O tanto de los ratones CT-1^{-/-} como de los ratones CT-1^{+/+}.

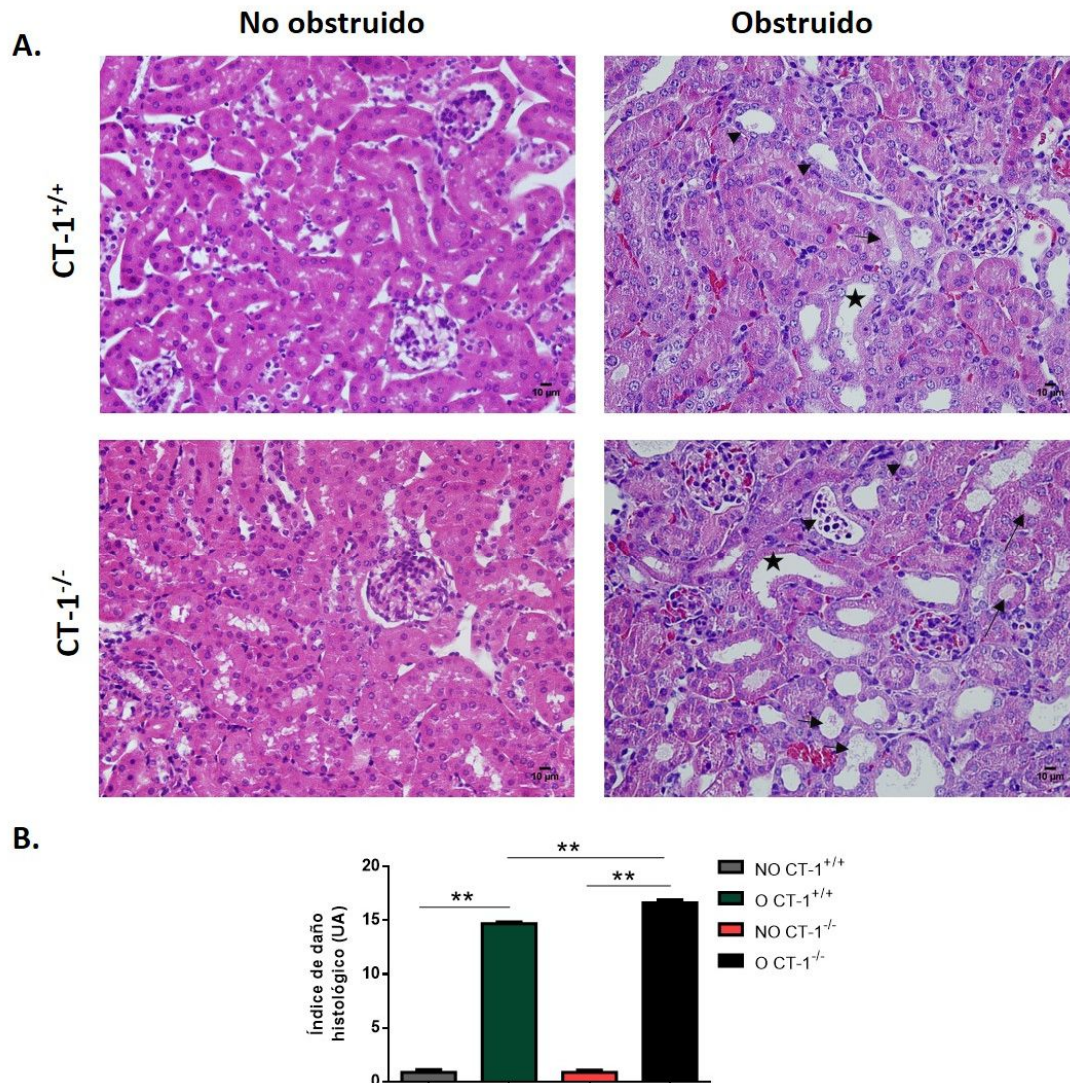


Figura 36. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de la corteza de riñones NO y riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. B. Índice del daño histológico en riñones NO y O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; los datos representan la media en UA \pm error estándar de la media. Las cabezas de las flechas señalan restos celulares, las flechas cortas señalan el inicio de depósitos hialinos, las flechas largas señalan tapones hialinos y las estrellas dilatación tubular. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

Tal y como se muestra en la figura 36, los riñones NO de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} presentan las características normales del parénquima renal. Los riñones O procedentes de ratones CT-1^{-/-} muestran un daño tubular más severo que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+}. Este daño tubular está caracterizado por un hinchamiento de las células tubulares, pérdida del borde en cepillo, pérdida de núcleos tubulares y dilatación tubular. Así mismo, la apoptosis

producida en las células tubulares da lugar a una liberación de restos celulares hacia el lumen tubular, y la acumulación de estos restos celulares produce la formación de cilindros de material hialino que puede provocar la formación de tapones hialinos que obstruyen los túbulos.

Cuantificamos el daño tubular en la corteza renal tal y como se ha explicado en la sección de métodos 5.1. El índice de daño histológico es mayor en los riñones O que en los riñones NO de cada grupo experimental. Además, se observa un mayor índice de daño histológico en los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} comparado con los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 36B).

➤ Apoptosis celular

La apoptosis es la principal forma de muerte celular observada en el modelo experimental de OUU (Ardura et al, 2008). Tras 1 día de OUU se observa muerte celular tubular que aumenta con el tiempo; la apoptosis tubular tanto en la corteza como en la médula tras 3 días de OUU es más evidente y contribuye a la resolución de la respuesta inflamatoria así como a la regulación del número de fibroblastos, y por tanto al desarrollo de la enfermedad (Misaki et al, 2009).

Además, la señalización mediada por STAT3 promueve la síntesis de proteínas antiapoptóticas (Bhattacharya et al, 2005). En dos estudios de daño hepático se ha descrito que ratones CT-1^{-/-} presentan un mayor grado de apoptosis que ratones CT-1^{+/+} debido en parte a la menor fosforilación de STAT3 observada en estos ratones CT-1^{-/-} (Iniguez et al, 2006; Marques et al, 2007).

Analizamos la apoptosis en los riñones O de ambos grupos mediante la expresión de caspasa-3 activada y la fragmentación de ADN evaluada con el ensayo TUNEL. La caspasa-3 activada es un marcador temprano de la apoptosis, que desempeña un papel importante en la fase de ejecución de este proceso. Mediante western blot observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor expresión de caspasa-3 activada que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 37A).

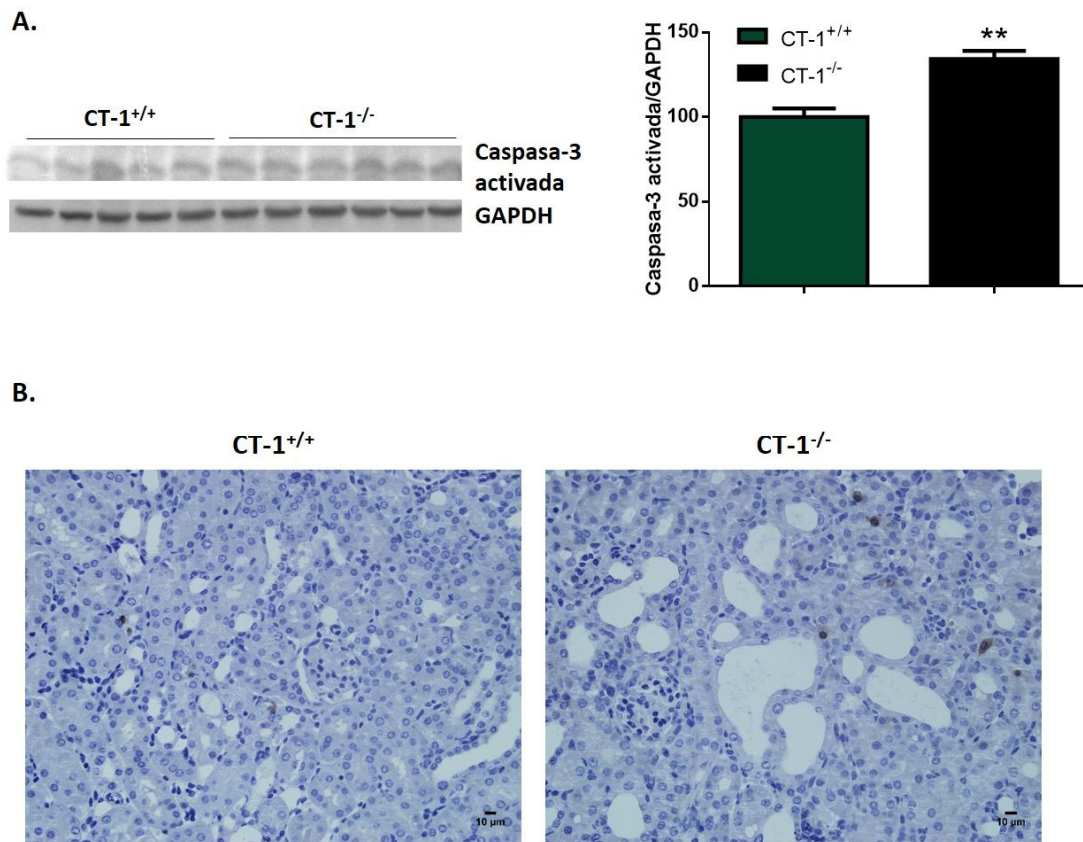


Figura 37. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción. A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 activada en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de inmunohistoquímica con caspasa-3 activada en la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. ** $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos.

La inmunohistoquímica también muestra un mayor número de células teñidas con caspasa-3 activada en los riñones O de ratones CT-1^{-/-} que en los O de ratones CT-1^{+/+} (figura 37B).

El ensayo enzimático TUNEL detecta la fragmentación de ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas. Observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor cantidad de células TUNEL positivas tanto en la corteza como en el área corticomedular que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 38). Por tanto, todos estos resultados muestran que la OUU provoca un mayor grado de apoptosis en los ratones CT-1^{-/-} que en los ratones CT-1^{+/+}.

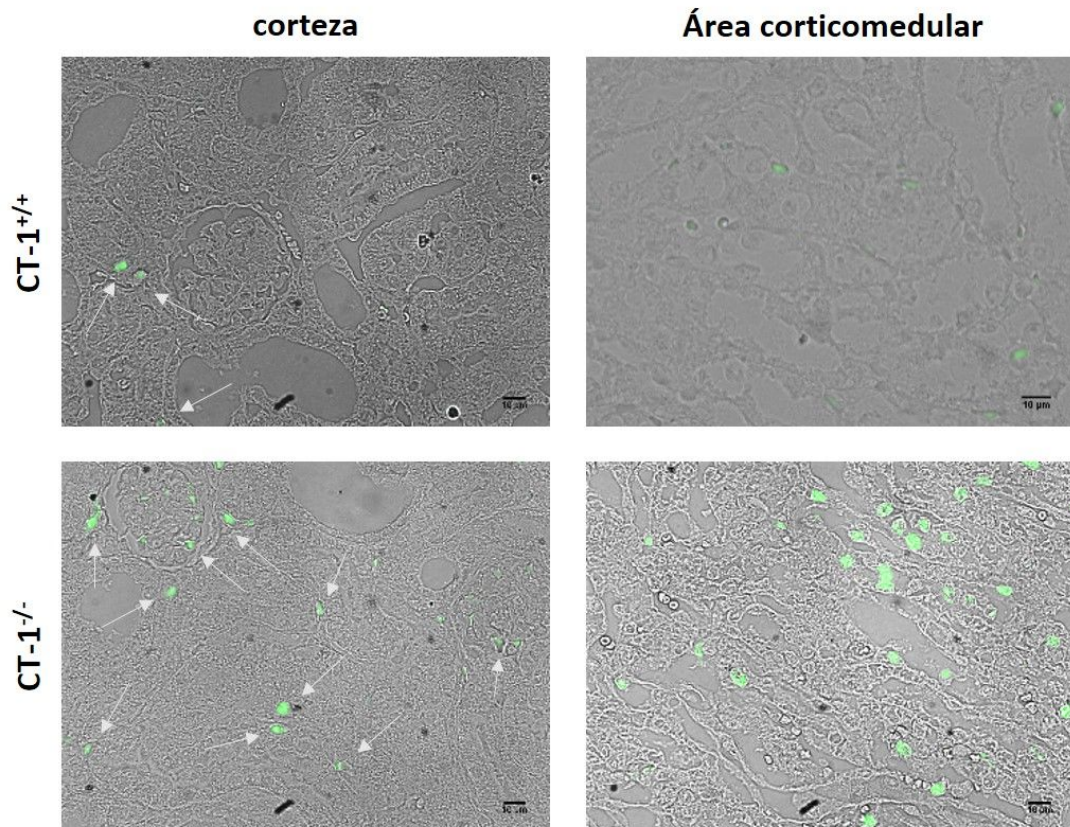


Figura 38. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas de la tinción con TUNEL en la corteza y área corticomedular de riñones obstruidos procedentes de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Las flechas señalan células teñidas. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Magnificación original: 400X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1.

Debido a la implicación de STAT3 en la respuesta antiapoptótica analizamos su activación en nuestro modelo experimental. Observamos que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} muestran una mayor fosforilación de STAT3 que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} (figura 39). Por lo tanto, la disminución en la activación de STAT3 en los ratones CT-1^{-/-} podría ser uno de los mecanismos implicados en el mayor grado de apoptosis que aparece en ausencia de CT-1.

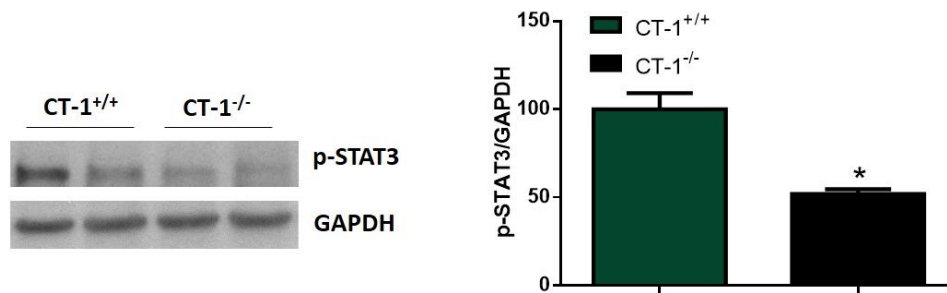


Figura 39. Análisis de la expresión de p-STAT3 tras 3 días de obstrucción. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de p-STAT3 en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ Cantidad de miofibroblastos

Hemos valorado la cantidad de miofibroblastos analizando la expresión de los marcadores de miofibroblastos α -SMA y vimentina.

Mediante western blot observamos que los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} expresan una mayor cantidad de α -SMA que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 40A). Mediante inmunohistoquímica se observa que α -SMA se expresa en el intersticio renal y en las paredes de los vasos; sin embargo, en los riñones O de ratones CT-1^{-/-} se observa una mayor expresión en el intersticio renal que en los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 40B).

La inmunohistoquímica de vimentina muestra que esta proteína se expresa en las paredes de los vasos, en las células mesangiales y el intersticio renal. La expresión en el intersticio renal es mayor en los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} que en los O de los ratones CT-1^{+/+} (figura 40C). Asumiendo que el área teñida es proporcional al número de miofibroblastos y de acuerdo con los resultados observados del análisis de la expresión de α -SMA, estos datos sugieren que los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} tienen un mayor número de miofibroblastos que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+}.

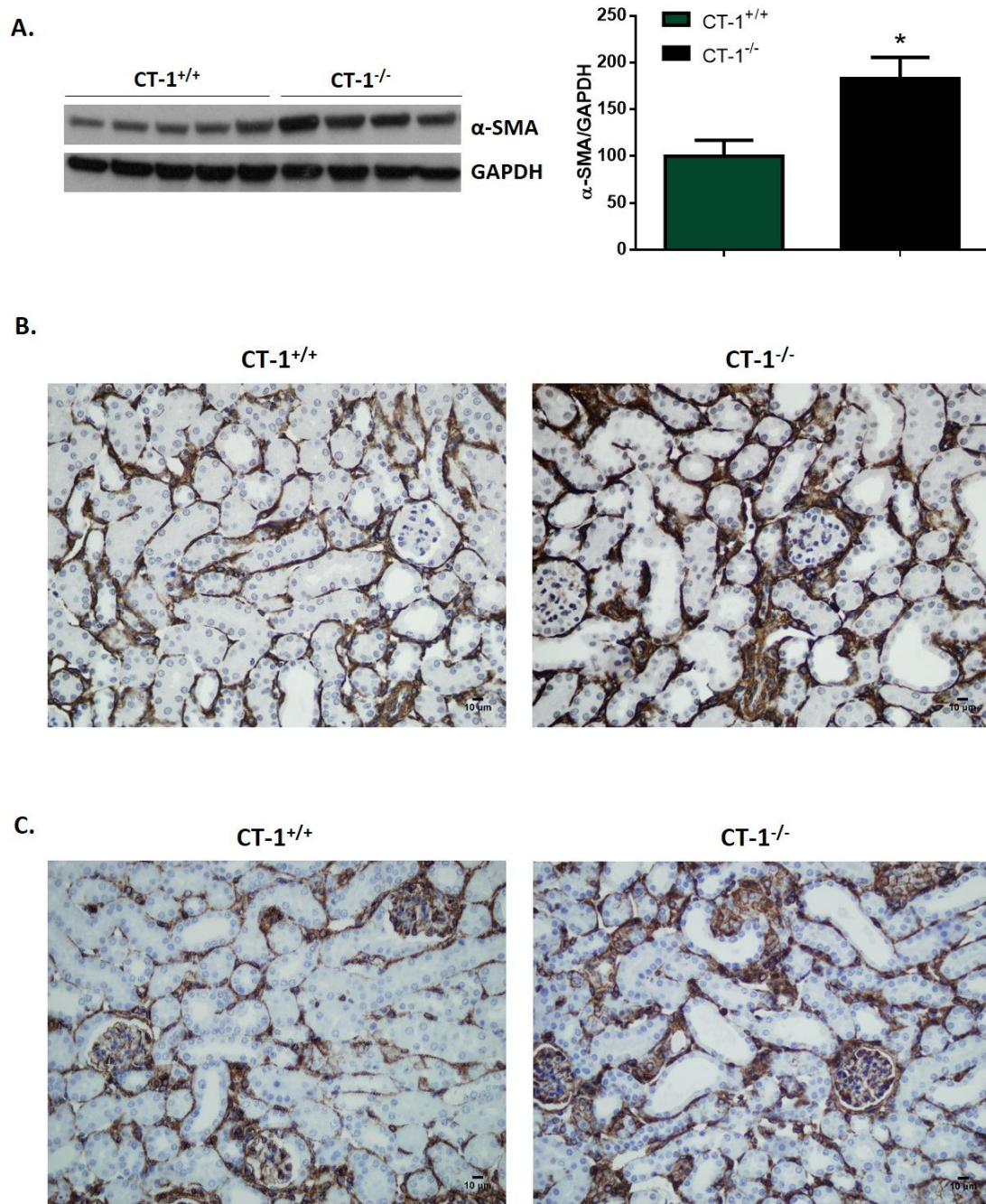


Figura 40. Análisis de la expresión de α -SMA y vimentina tras 3 días de obstrucción. A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de α -SMA en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de α -SMA (B) y vimentina (C) en la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. α -SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos.

➤ Respuesta inflamatoria

La infiltración de células inflamatorias (principalmente macrófagos y leucocitos) y la expresión local de diferentes citoquinas y moléculas de adhesión de membrana promueven la progresión de la fibrosis tubulointersticial (Zeisberg & Neilson, 2010). Por ello, hemos analizado cambios en marcadores implicados en la respuesta inflamatoria.

Los macrófagos liberan citoquinas y factores de crecimiento promoviendo la progresión de la enfermedad, y en el modelo de OUU esta infiltración de células inflamatorias aumenta progresivamente desde las 12 horas de la obstrucción (Yoo et al, 2006).

Con el objetivo de identificar la cantidad de macrófagos utilizamos el marcador Cd68, una glicoproteína presente en los lisosomas de los monocitos y los macrófagos. Hemos observado que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor expresión de ARNm de Cd68 que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 41).

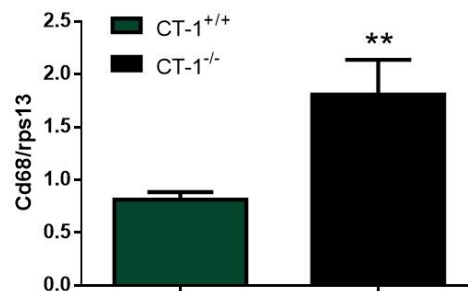


Figura 41. Análisis de la expresión de ARNm de Cd68 tras 3 días de obstrucción. Análisis mediante qPCR de la expresión de los niveles de ARNm de Cd68 en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. ** $p < 0,01$ con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1.

La expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 aumenta a las pocas horas de la obstrucción y media la adhesión y quimiotaxis de los macrófagos (Morrissey & Klahr, 1998b). La inducción de cicloxigenasa-2 (COX-2) puede ocurrir en respuesta a diferentes citoquinas durante el daño tisular y la inflamación (Honma et al, 2014). Mediante western blot observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} muestran una mayor expresión de ICAM-1 y COX-2 que los riñones O de ratones CT-1^{+/+} (figura 42A).

El factor de transcripción NF- κ B es activado tras la obstrucción renal (Morrissey & Klahr, 1998a; Morrissey & Klahr, 1997) y su inhibición previene la fibrosis renal inducida tras la OUU (Tashiro et al, 2003). Evaluamos la activación de NF- κ B analizando la expresión del residuo fosforilado Ser536 de la subunidad NF- κ B p65 (p-p65) y los niveles de I κ B- α libres. Los riñones O de ratones CT-1^{-/-} muestran una mayor expresión de p-p65 y de I κ B- α que los O de los ratones CT-1^{+/+}, y por tanto una mayor activación de NF- κ B (figura 42B).

iNOS es una enzima que se expresa en diferentes células en condiciones de inflamación, y que produce grandes cantidades de óxido nítrico jugando un papel importante en el daño celular por inflamación; tras la OUU se produce un aumento de su expresión (Grande et al, 2010b). Evaluamos la expresión de iNOS mediante western blot e inmunohistoquímica. Observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} expresan una mayor cantidad de iNOS que los riñones O de los ratones CT-1^{+/+}. La inmunohistoquímica muestra que iNOS se expresa en el citoplasma celular, principalmente en los túbulos corticales, y también se observa una mayor expresión de iNOS en los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} que en los O de los CT-1^{+/+} (figura 43).

Estos datos en conjunto indican que la ausencia de CT-1 agrava el daño tubular, abundancia de miofibroblastos y la respuesta inflamatoria inducida por la OUU. Por tanto, este mayor daño producido en los ratones CT-1^{-/-} en las fases iniciales de la enfermedad parece ser el responsable del mayor grado de fibrosis tubulointersticial observado en estos animales en las fases tardías comparado con los ratones CT-1^{+/+}.

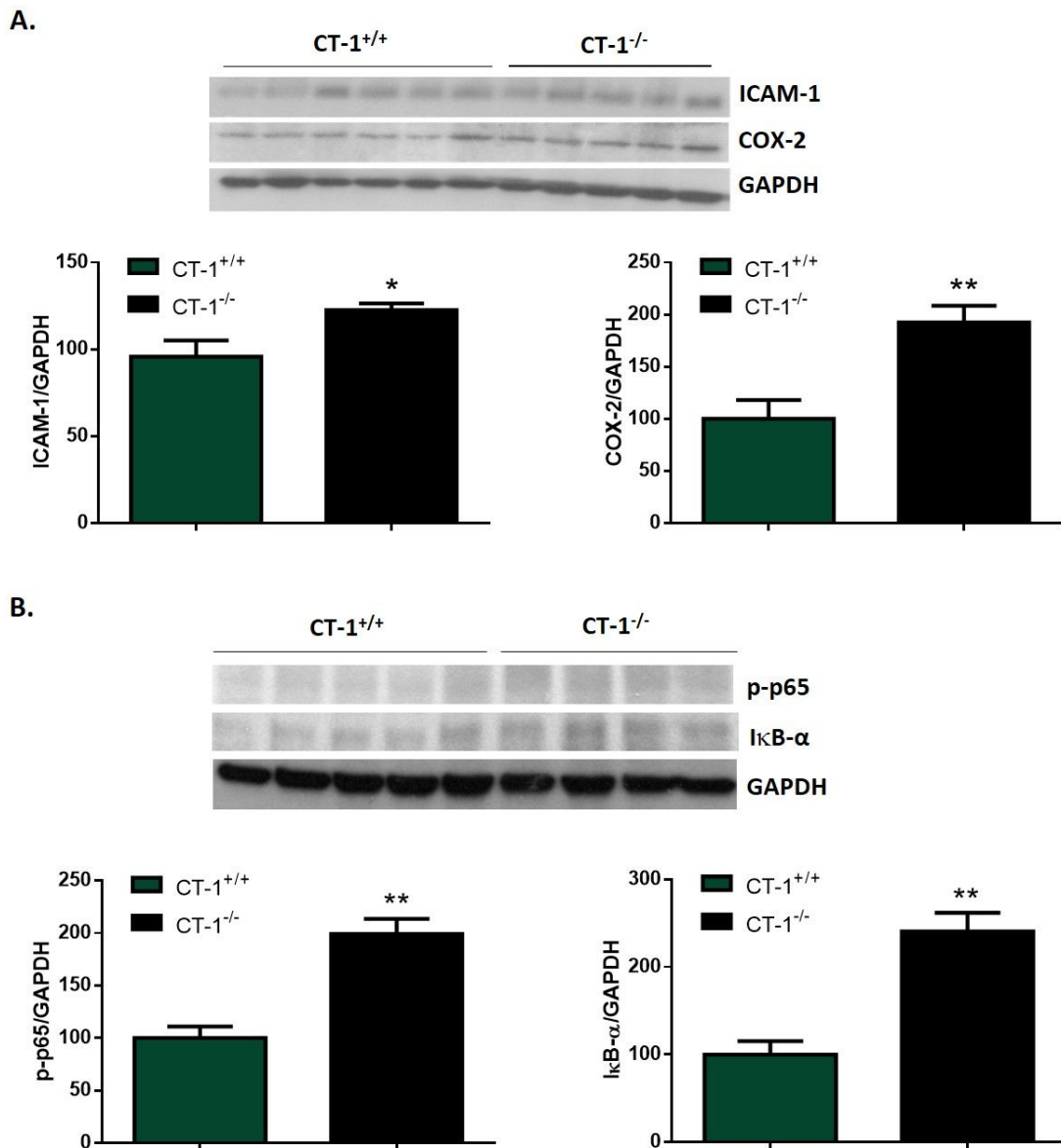


Figura 42. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión, COX-2 y activación de NF-κB tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de ICAM-1, COX-2 (A), p-p65 e IκB-α (B) en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. * p<0,05, **p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1, COX-2: cicloxigenasa-2.

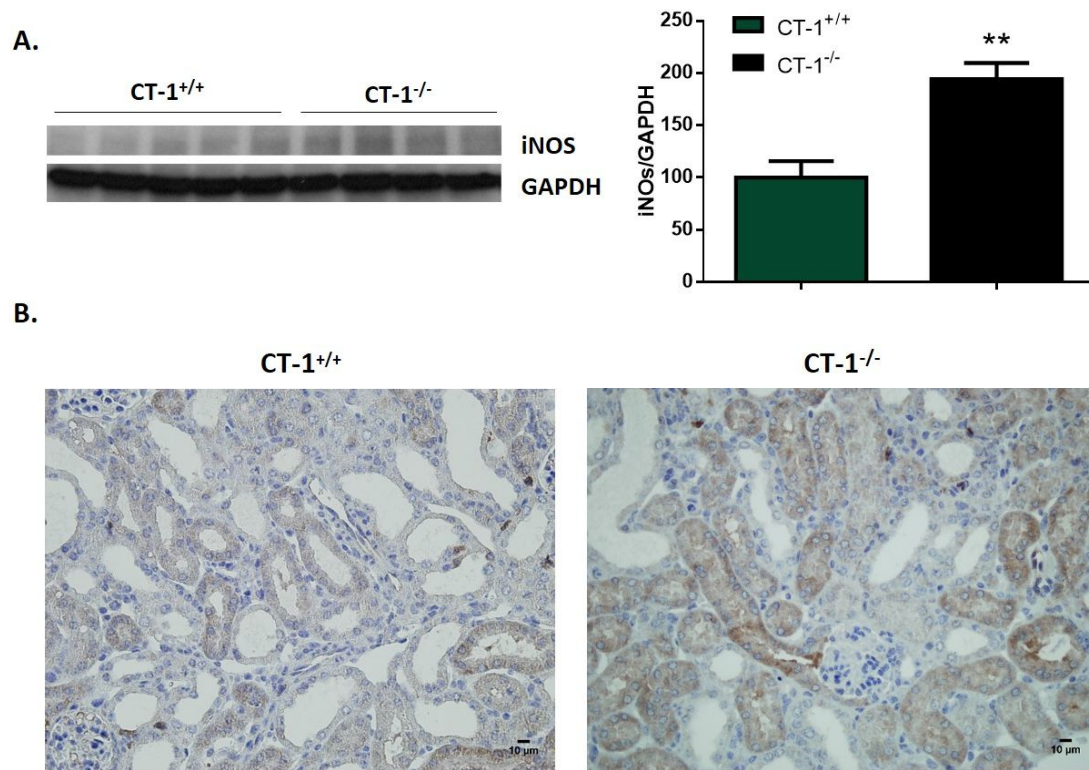


Figura 43. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de obstrucción. A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de iNOS en riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con iNOS de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots, los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). Test estadístico: T de Student. ** $p < 0,01$ con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, O: obstruidos.

3. Efecto de la administración de CT-1 en la fibrosis tubulointersticial

Debido a nuestros resultados previos en los que observamos que la ausencia de CT-1 agrava el daño tubulointersticial y fibrosis renal inducida por OUU y a las investigaciones que muestran la función protectora de CT-1 frente a la inflamación y apoptosis en diversos modelos experimentales (García-Cenador et al, 2013a; López-Yoldi et al, 2015), decidimos evaluar si la administración de CT-1 exógena protege y o disminuye la severidad de la fibrosis renal y el daño tubulointersticial inducido por OUU.

Por ello analizamos el posible efecto terapéutico del tratamiento con CT-1 en los animales CT-1^{+/+} y si la administración exógena de CT-1 en animales deficientes de esta citoquina revierte el daño observado en dichos animales.

3.1. Efecto del tratamiento con CT-1 en animales CT-1^{+/+}

Evaluamos el posible papel protector de la administración de CT-1 frente al daño renal producido por la OUU.

3.1.1. Efecto del tratamiento con CT-1 en la fibrosis tubulointersticial

Realizamos OUU durante 15 días a ratones macho de 3 meses de edad CT-1^{+/+} y les administramos CT-1 100 µg/kg, CT-1 400 µg/kg o solución salina cada dos días tal y como se explica en la sección de métodos 3.1.2.

Observamos que los riñones O de los ratones tratados con CT-1 a ambas dosis (100 y 400 µg/kg) presentan una menor deposición de colágeno intersticial que los riñones O de los ratones no tratados, como se observa en la tinción de Rojo Sirio y tricrómico de Masson (figura 44A-B). La cuantificación de la tinción de Rojo Sirio indica que los riñones O de los ratones tratados con CT-1 muestran una menor presencia de fibrosis que los O de los ratones no tratados (figura 44C). Además, mediante western blot observamos que el tratamiento con CT-1 disminuye la expresión de fibronectina y CTGF (figura 45).

Estos datos sugieren que la administración de CT-1 reduce el grado de fibrosis renal inducida tras 15 días de OUU en ratones CT-1^{+/+}.

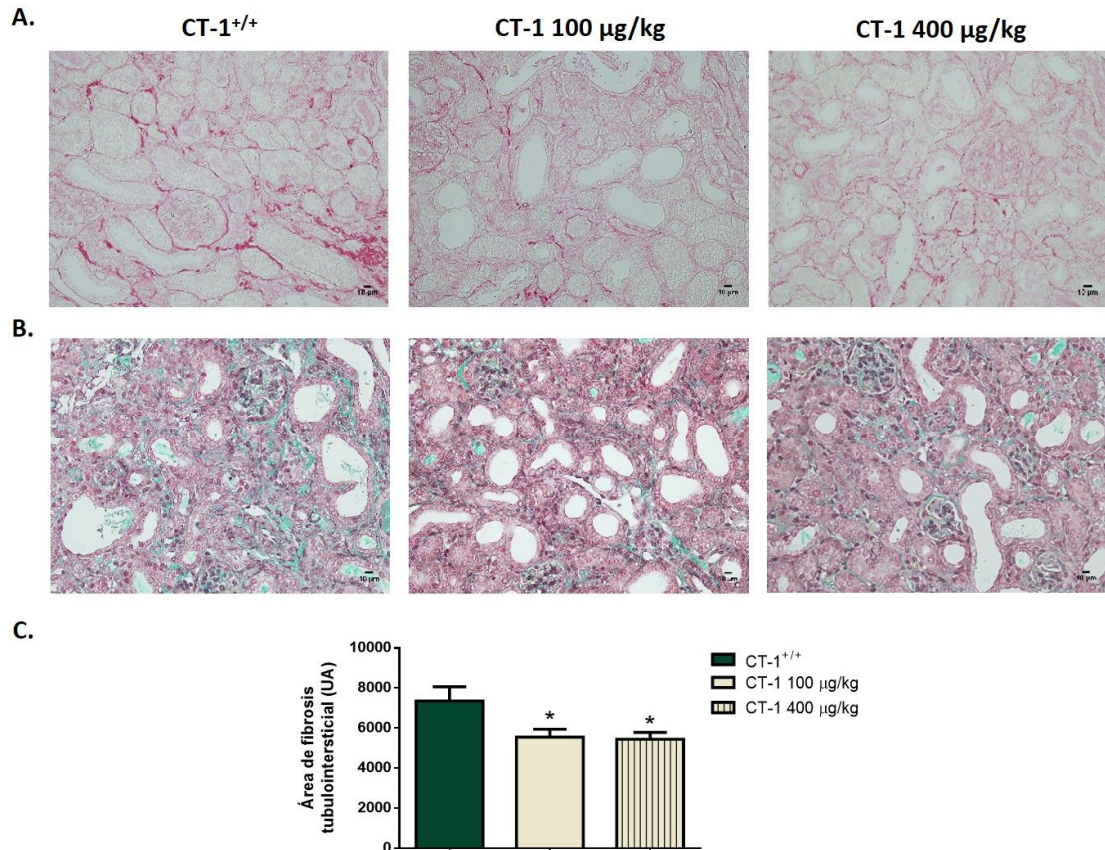


Figura 44. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de tinción con Rojo Sirio en riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. B. Imágenes representativas de tinción con tricrómico de Masson en riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. C. Cuantificación del grado de fibrosis tubulointersticial evaluada con la tinción de Rojo Sirio. Los datos representan la media ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=4). Test estadístico: ANOVA de una vía. * p<0,05 con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

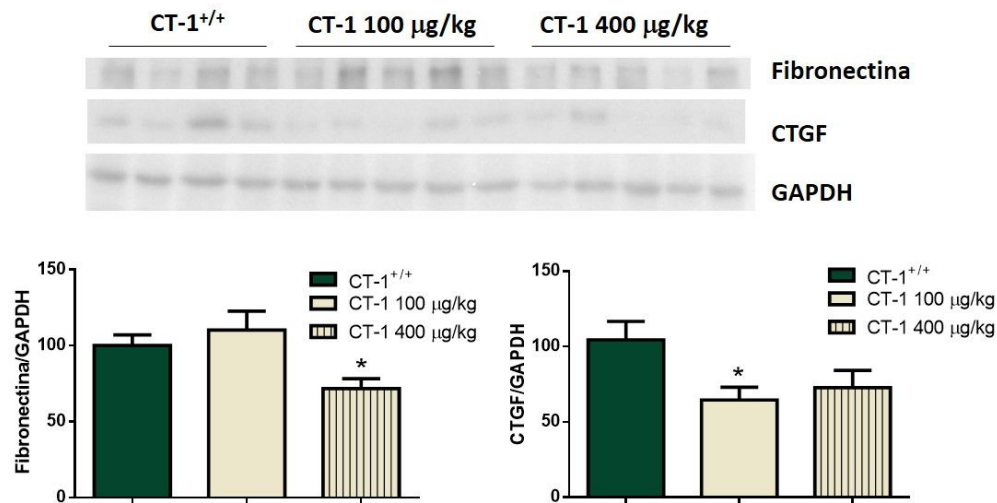


Figura 45. Análisis de la expresión de fibronectina y CTGF tras 15 días de obstrucción. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de fibronectina y CTGF en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg; se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots, los datos son las medias ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=4). Test estadístico: ANOVA de una vía. * p<0,05 con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1.

3.1.2. Efecto del tratamiento con CT-1 en las fases tempranas del daño tubulointersticial

Realizamos OUU durante 3 días a ratones macho de 3 meses de edad CT-1^{+/+} y se les administró CT-1 100 µg/kg, CT-1 400 µg/kg o solución salina. Evaluamos el efecto de la administración de CT-1 en el daño tubular y apoptosis celular, cantidad de miofibroblastos y respuesta inflamatoria.

➤ Análisis histológico del daño tubular

Como se observa en la tinción con HE de la figura 46, los riñones O de ratones tratados con CT-1 presentan un menor número de alteraciones histológicas inducidas por OUU (hinchamiento de las células tubulares, pérdida del borde en cepillo, pérdida de núcleos tubulares, dilatación tubular y aparición de restos celulares y depósitos de material hialino en el lumen tubular) que los riñones O procedentes de ratones sin tratar con CT-1. Tras la cuantificación del daño en la corteza renal, se observa que el tratamiento con CT-1 disminuye dicho daño en los riñones O (figura 46B).

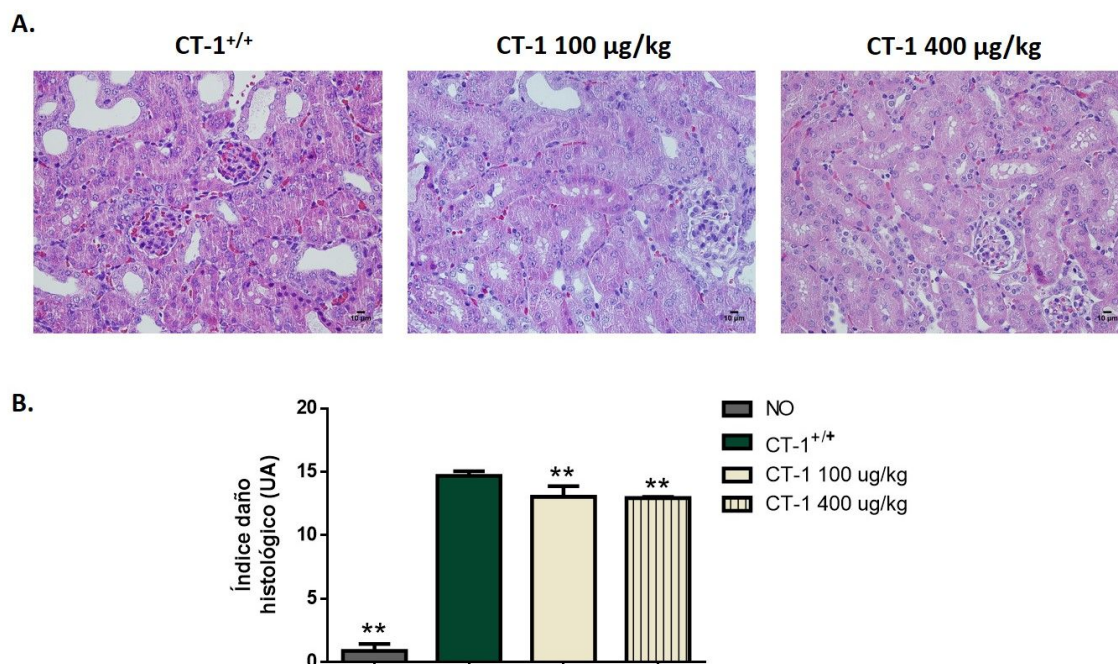


Figura 46. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. B. Índice de daño histológico en riñones NO y O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg; los datos representan la media en UA ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1 100 µg/kg O (n=5), CT-1 400 µg/kg O (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

➤ Apoptosis celular

Analizamos la apoptosis en los riñones O de los ratones tratados con CT-1 mediante la expresión de caspasa-3 activada y la fragmentación de ADN evaluada con el ensayo enzimático TUNEL. La administración de CT-1 a ambas dosis disminuye la expresión de caspasa-3 activada, analizada mediante western blot (figura 47A) y mediante inmunohistoquímica (figura 47B), dónde se puede observar un menor número de células teñidas en los riñones O de los ratones tratados con CT-1 que en los O de los ratones control.

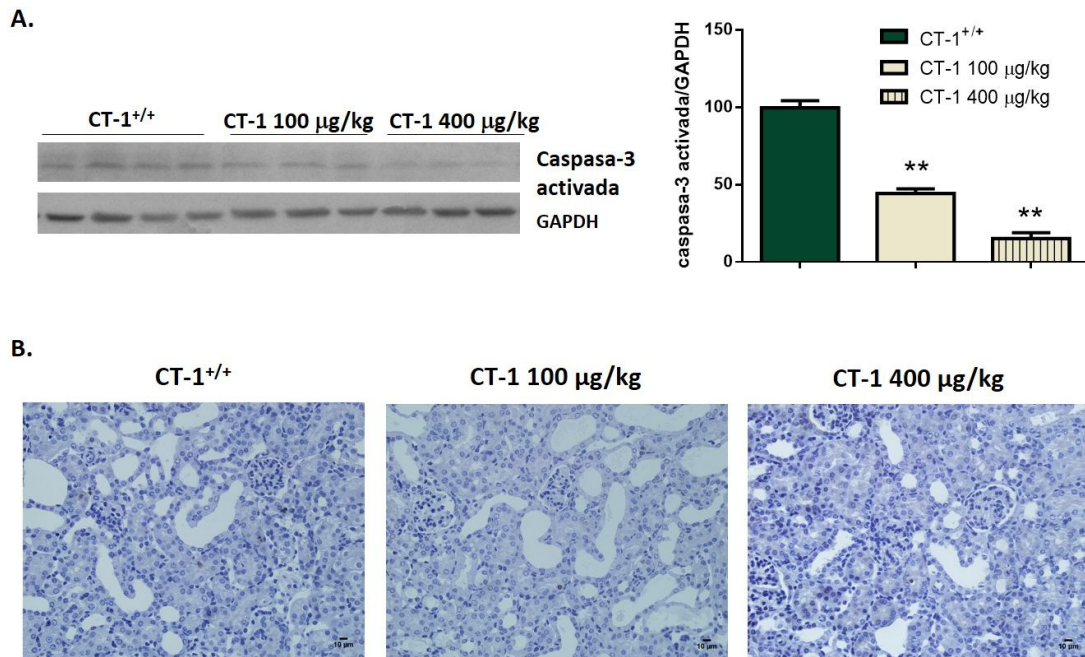


Figura 47. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 activada en riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con caspasa-3 activada de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 µg/kg (n=5); CT-1 400 µg/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos.

Además, el tratamiento con CT-1 disminuye el número de células positivas por TUNEL tanto en la corteza como en el área corticomedular de los riñones O (figura 48). Por tanto, estos resultados indican que la administración de CT-1 disminuye el grado de apoptosis celular inducida tras 3 días de OUU en animales CT-1^{+/+}.

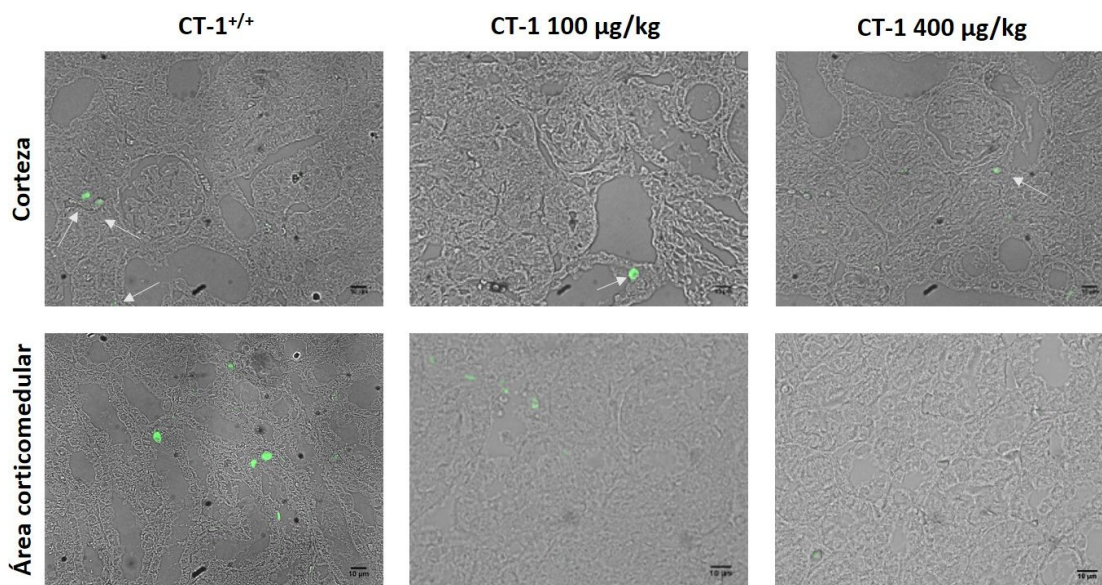


Figura 48. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas de la tinción con TUNEL en la corteza y área corticomedular de riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 µg/kg (n=5); CT-1 400 µg/kg (n=6). Magnificación original: 400X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1.

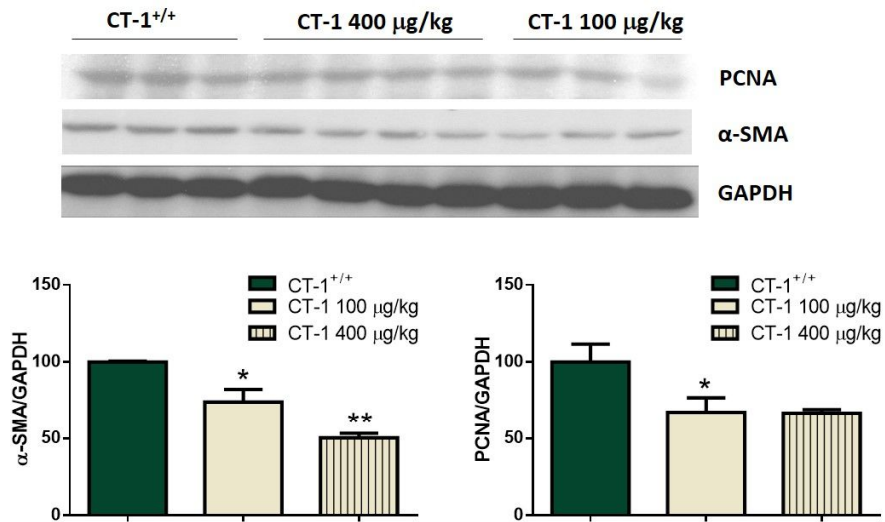
➤ Cantidad de miofibroblastos

Valoramos la cantidad de miofibroblastos en riñones O de ratones tratados con CT-1 mediante la expresión de los marcadores α -SMA y vimentina y la proliferación celular la evaluamos analizando la expresión del antígeno de proliferación celular (PCNA).

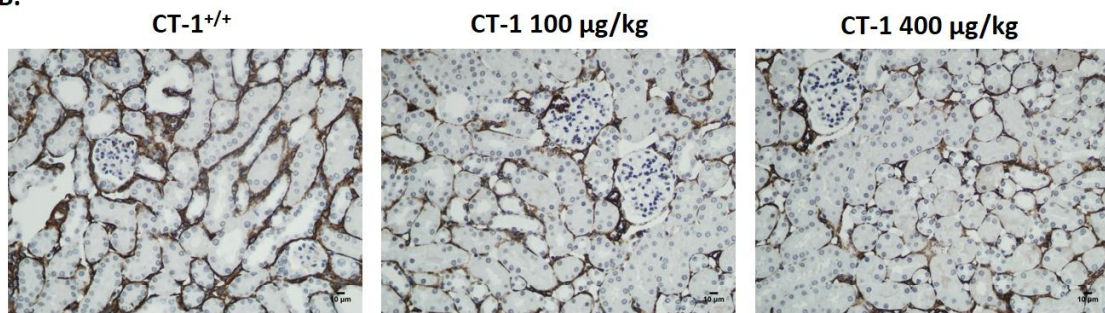
Mediante el análisis por western blot observamos que la administración de CT-1 disminuye la expresión de α -SMA y PCNA en los riñones O. La inmunohistoquímica muestra que los riñones O de los ratones tratados con CT-1 presentan una menor expresión de α -SMA y vimentina en el intersticio renal que los riñones O controles (figura 49).

Estos datos sugieren que la administración de CT-1 reduce la cantidad de miofibroblastos producidos tras la OUU.

A.



B.



C.

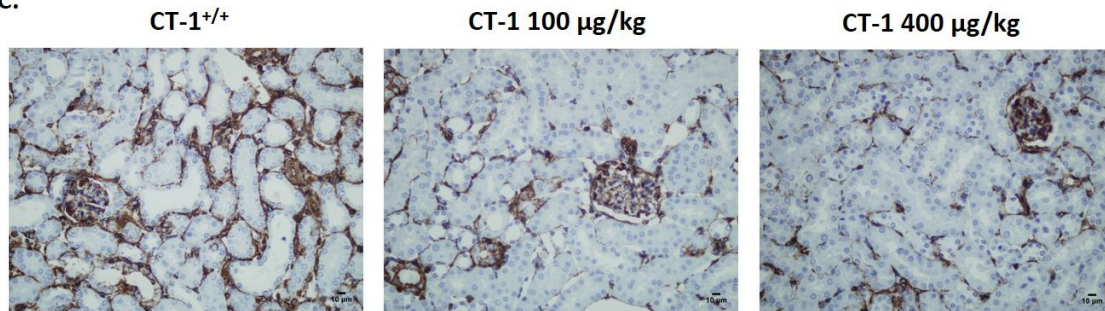


Figura 49. Análisis de la expresión de α -SMA, PCNA y vimentina tras 3 días de obstrucción. A. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión α -SMA y PCNA en riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con α -SMA (B) y vimentina (C) de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 μ g/kg (n=5); CT-1 400 μ g/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, ** p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. Magnificación original: 400X. α -SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos, PCNA: antígeno de proliferación nuclear.

➤ Respuesta inflamatoria

La administración de CT-1 reduce la expresión de ARNm de Cd68 y de IL-1 β evaluada mediante qPCR (figura 50). Mediante western blot observamos que la administración de CT-1 disminuye la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y de COX-2 (figura 51).

Por otra parte, los riñones O de ratones tratados con CT-1 presentan una menor cantidad de p-p65 y de I κ B- α que los riñones O de ratones no tratados (figura 51).

El análisis de la expresión de iNOS se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica. Como se observa en la figura 52, los riñones O de los ratones tratados con CT-1 presentan un menor número de células teñidas, y por tanto una menor expresión de iNOS en la corteza renal que los riñones O de los ratones no tratados.

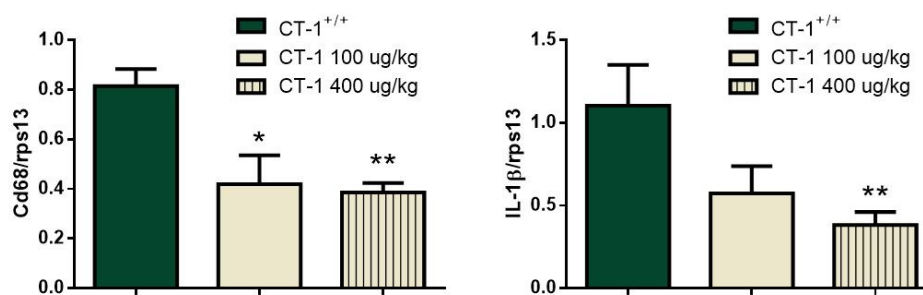


Figura 50. Análisis de la expresión de ARNm de Cd68 e IL-1 β tras 3 días de obstrucción. Análisis mediante qPCR de la expresión de los niveles de ARNm de Cd68 y IL-1 β en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg. Se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 μ g/kg (n=5); CT-1 400 μ g/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, **p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1, IL-1 β : interleuquina-1 β .

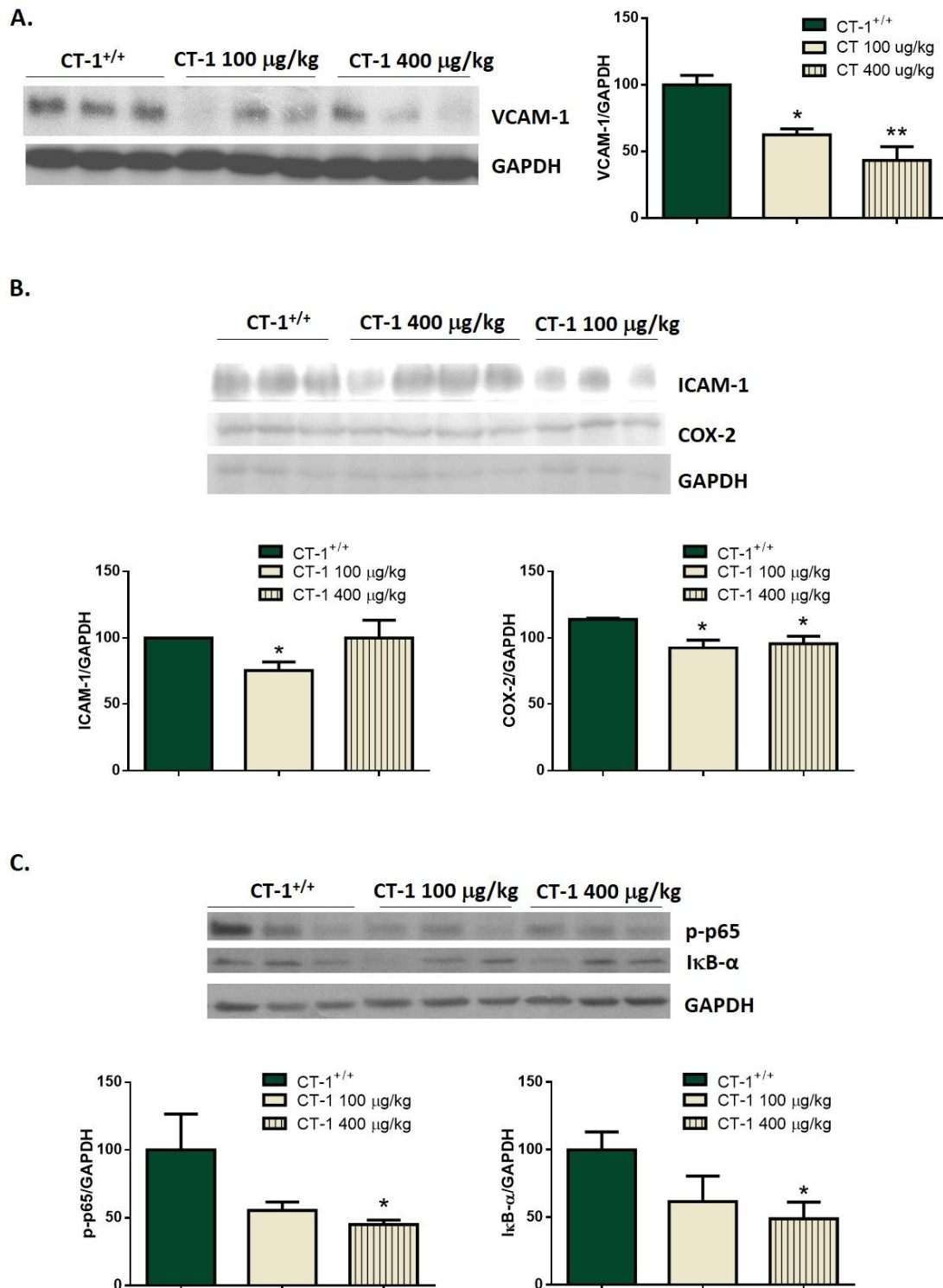
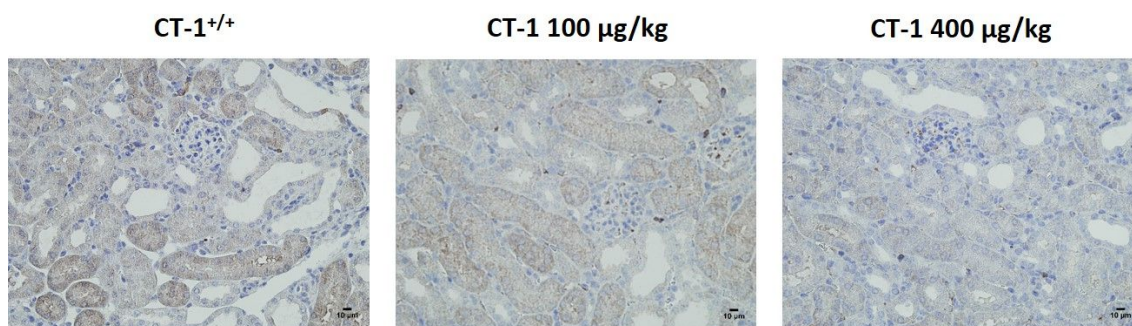


Figura 51. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión, COX-2 y activación de NF- κ B tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de VCAM-1 (A), ICAM-1, COX-2 (B), p-p65 e I κ B- α (C) en riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 μ g/kg (n=5); CT-1 400 μ g/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, ** p<0,01 con respecto a CT-1^{+/+}. CT-1: cardiotrofina-1, COX-2: cicloxigenasa-2.



Figra 52. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con iNOS de la corteza de riñones obstruidos de ratones CT-1^{+/+} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. CT-1^{+/+} (n=6); CT-1 100 µg/kg (n=5); CT-1 400 µg/kg (n=6). Magnificación original 400X. CT-1: cardiotrofina-1, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con CT-1 protege frente al daño tubular y apoptosis, así como frente a la respuesta inflamatoria y al aumento de miofibroblastos que se observa tras 3 días de OUU. Este efecto protector inducido por la administración de CT-1 en el daño tubulointersticial temprano podría ser el responsable de que en las fases tardías también se observe una disminución del grado de fibrosis tubulointersticial, tal y como hemos indicado anteriormente.

3.2. Efecto de la administración de CT-1 en ratones CT-1^{-/-}

Debido a que observamos que los animales CT-1^{-/-} presentaban un mayor grado de daño renal tras la OUU tanto en los procesos tempranos como tardíos, evaluamos si la suplementación de los niveles de CT-1 revertía en parte estos procesos.

3.2.1. Efecto de la administración de CT-1 en la fibrosis tubulointersticial

La administración con CT-1 disminuye la deposición de colágeno intersticial en animales CT-1^{-/-} de acuerdo con lo observado en tinciones con tricrómico de Masson y Rojo Sirio.

La cuantificación del área renal ocupada por la tinción de Rojo Sirio muestra que los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 presentan una menor fibrosis que sus respectivos controles CT-1^{-/-} sin tratar (figura 53C).

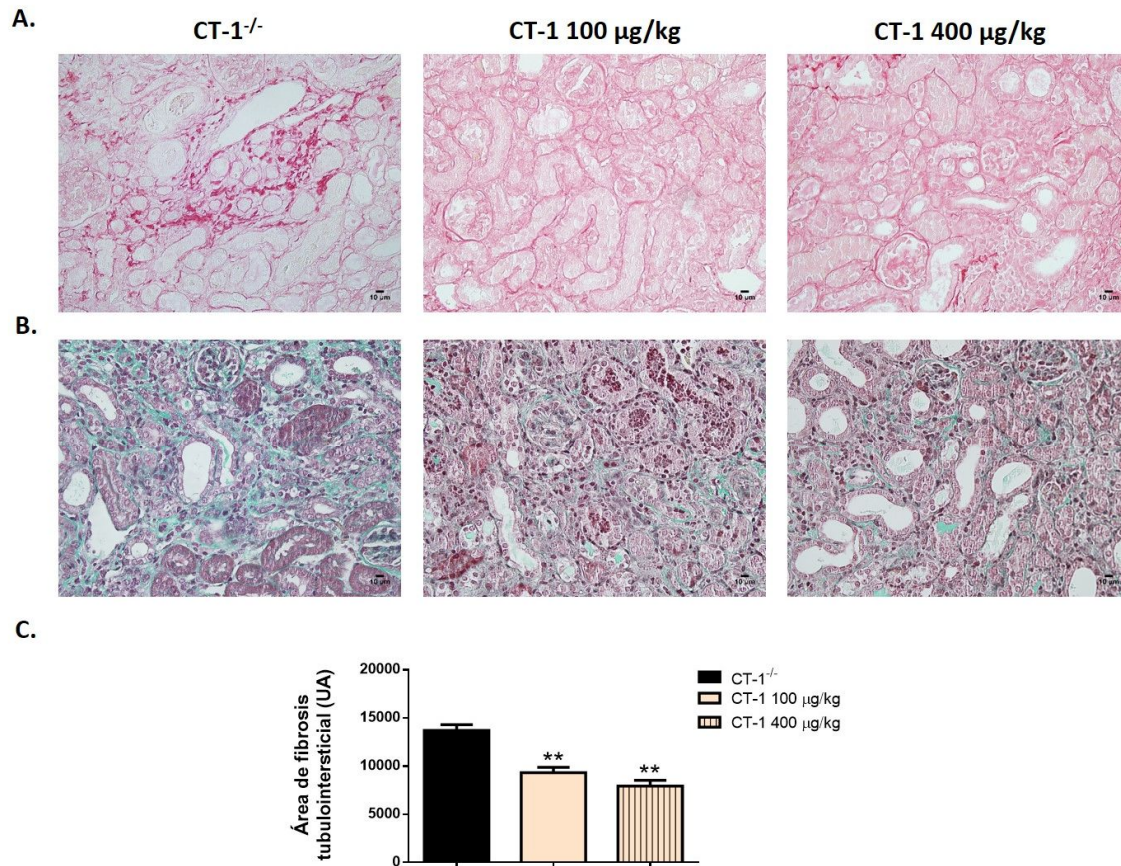


Figura 53. Análisis del grado de fibrosis tubulointersticial tras 15 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de tinción con Rojo Sirio en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. B. Imágenes representativas de tinción con tricrómico de Masson en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. C. Cuantificación del área de fibrosis tubulointersticial evaluada con la tinción de Rojo Sirio. Los datos representan la media ± error estándar de la media. CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=5). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a CT-1^{-/-}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

Además, la administración de CT-1 reduce la expresión de ARNm de colágeno I y fibronectina (figura 54A). Así mismo, mediante western blot observamos que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 presentan una menor expresión de colágeno I, CTGF y fibronectina que los controles no tratados (figura 54B).

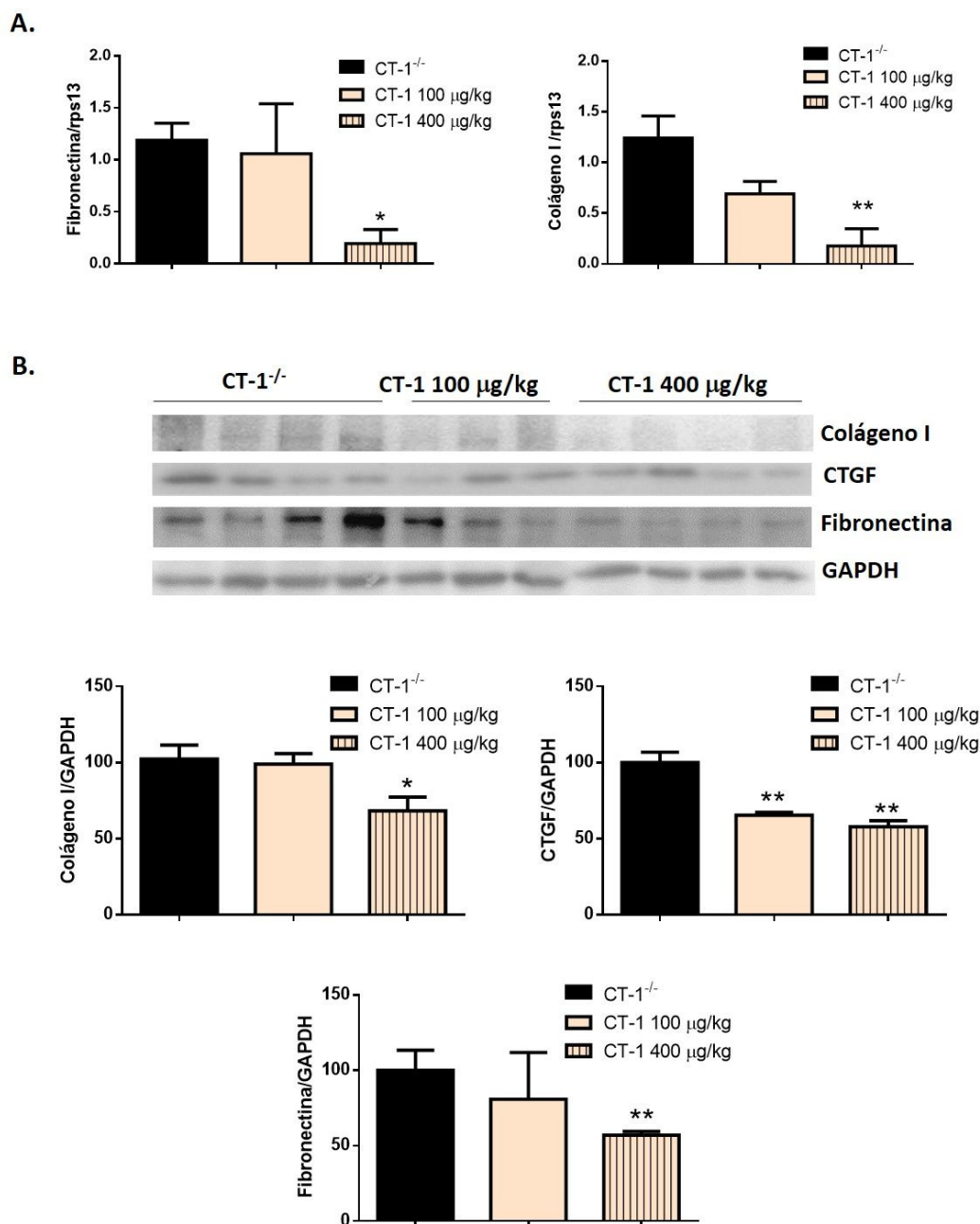


Figura 54. Análisis de la expresión de colágeno I, fibronectina y CTGF tras 15 días de obstrucción. A. qPCR de la expresión de los niveles de ARNm de fibronectina y colágeno I en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Se utilizó rps13 como control interno de carga. Los datos son la media ± EEM. B. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de colágeno I, fibronectina y CTGF en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± EEM. CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=5). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, ** p<0,01 con respecto a CT-1^{-/-}. EEM: error estándar de la media, CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos.

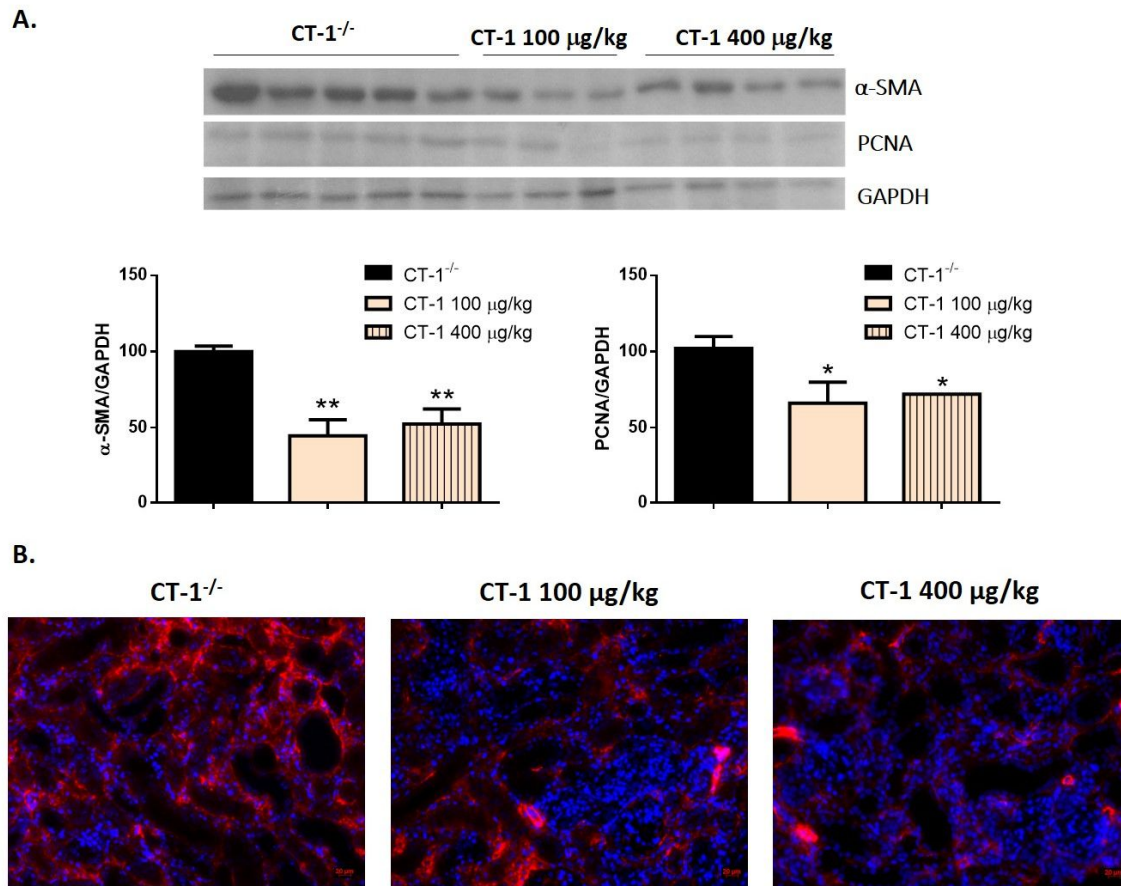


Figura 55. Análisis de la expresión de α-SMA y PCNA tras 15 días de obstrucción. A. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de α-SMA y PCNA en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de α-SMA en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=5). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, ** p<0,01 con respecto a CT-1^{-/-}. Magnificación original: 400X; barra= 20 µm. α-SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos, PCNA: antígeno de proliferación nuclear.

La administración de CT-1 disminuye la expresión de α-SMA y PCNA en los animales CT-1^{-/-} (figura 55A). La inmunofluorescencia de α-SMA muestra que los riñones O de los ratones tratados con CT-1 presentan una menor expresión de α-SMA en el intersticio renal que los riñones O de los ratones no tratados (figura 55B).

Además, la inmunohistoquímica de vimentina muestra que los riñones O procedentes de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 tienen una menor expresión de vimentina en el intersticio renal que los ratones no tratados (figura 56). Por lo tanto, el aumento del número de

miofibroblastos en los riñones O de ratones CT-1^{-/-} es mayor en los ratones no tratados que en los tratados con CT-1.

Estos resultados indican que la administración de CT-1 en animales CT-1^{-/-} disminuye el elevado grado de fibrosis tubulointersticial inducido tras la OUU.

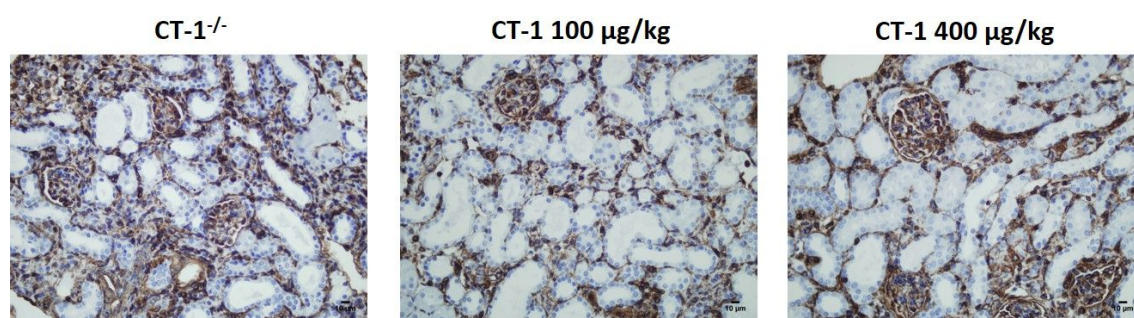


Figura 56. Análisis de la expresión de vimentina tras 15 días de obstrucción. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con vimentina de la corteza de riñones obstruidos de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=5). Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1.

3.2.2. Efecto de la administración de CT-1 en las fases tempranas del daño tubulointersticial

➤ Análisis del daño histológico

Tal y como se observa en la tinción con HE de la figura 57, el tratamiento con CT-1 disminuye la cantidad y severidad de las alteraciones histológicas de la corteza renal que aparecen en los riñones O. La cuantificación del daño tubular muestra que la administración de CT-1 disminuye el daño histológico originado tras la OUU (figura 57B).

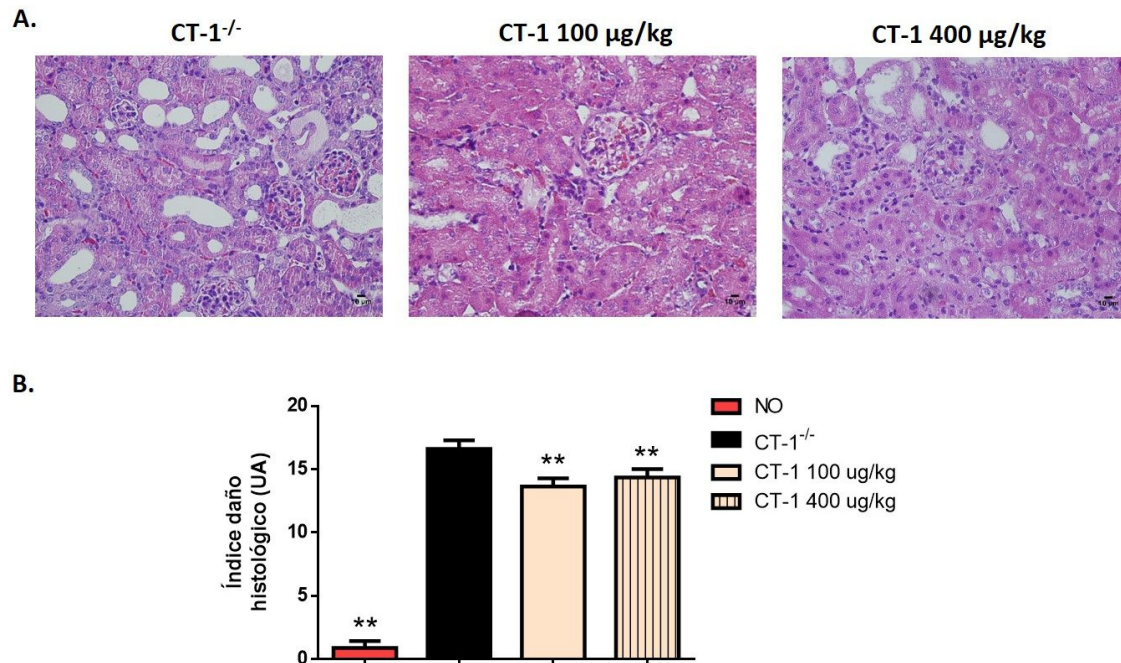


Figura 57. Análisis del daño tubular tras 3 días de obstrucción. A. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. B. Índice del daño histológico en riñones NO y O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Los datos representan la media ± error estándar de la media. CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6), CT-1 100 µg/kg O (n=5), CT-1 400 µg/kg O (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. ** p<0,01 con respecto a CT-1^{-/-}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, NO: no obstruidos, O: obstruidos, UA: unidades arbitrarias.

➤ Apoptosis celular

Los riñones O de los ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 expresan una menor cantidad de caspasa-3 activada que los no tratados con CT-1 (figura 58A). Así mismo, por inmunohistoquímica se puede observar que la corteza de los riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 muestran un menor número de células teñidas con caspasa-3 activada que sus respectivos controles (figura 58B).

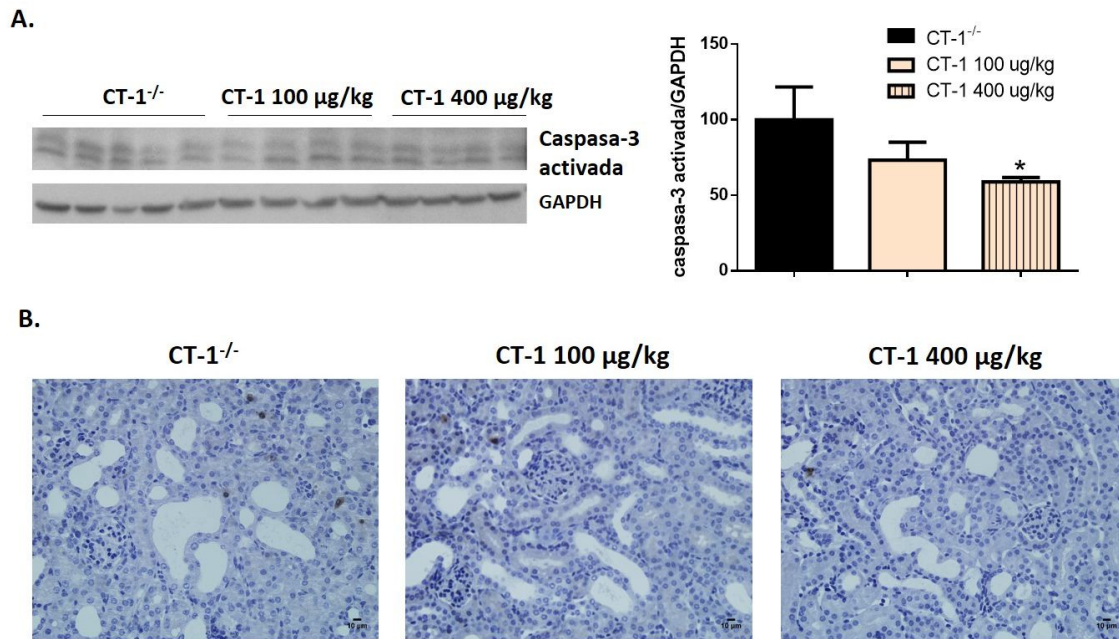


Figura 58. Análisis de la expresión de caspasa-3 activada tras 3 días de obstrucción. A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de caspasa-3 activada en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con caspasa-3 activada de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. * p<0,05 con respecto a CT-1^{-/-}. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos.

El análisis mediante TUNEL corrobora los datos de caspasa-3 activada, ya que se observa que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 presentan un menor número de células TUNEL positivas en la corteza y en el área corticomedular que los riñones O de ratones sin tratar (figura 59).

Estos datos indican que la administración de CT-1 en animales CT-1^{-/-} protege frente a la apoptosis inducida tras 3 días de OUU.

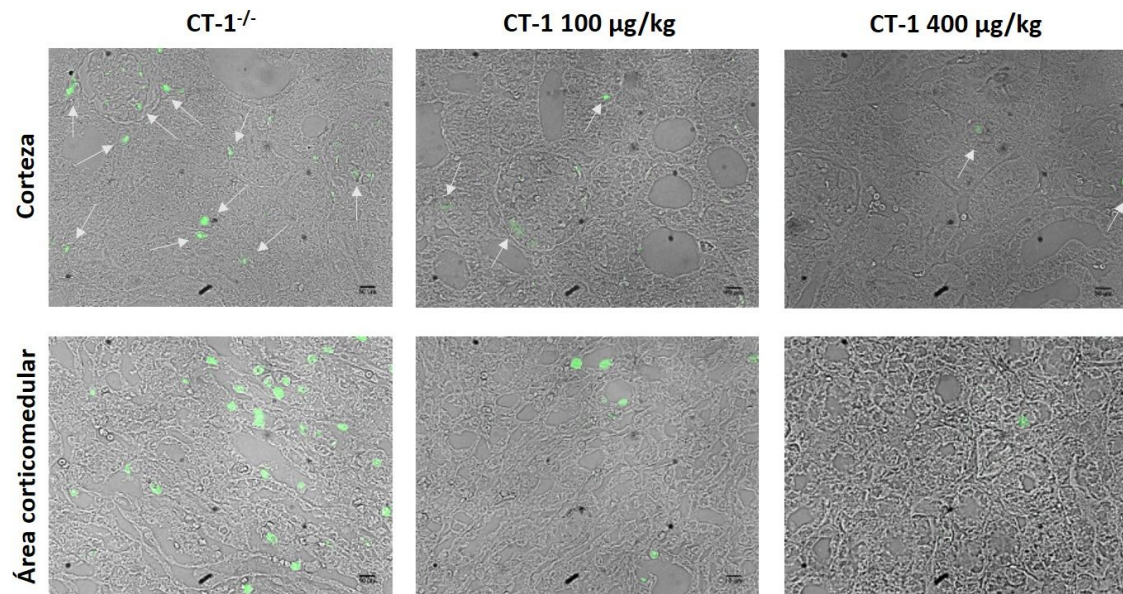


Figura 59. Análisis de la fragmentación de ADN tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas de la tinción con TUNEL en la corteza y área corticomedular de riñones obstruidos de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. CT-1^{-/-} (n=6); CT-1 100 µg/kg (n=5); CT-1 400 µg/kg (n=6). Magnificación original: 400X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ Cantidad de miofibroblastos

Mediante western blot observamos que la administración de 400 µg/kg de CT-1 disminuye la expresión de α -SMA en los riñones O de ratones CT-1^{-/-}. La inmunohistoquímica indica que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 a ambas dosis muestran una menor expresión de α -SMA y vimentina en el intersticio renal que los riñones O de ratones sin tratar (figura 60).

Por ello, la CT-1 también parece disminuir la cantidad de miofibroblastos en ratones CT-1^{-/-} tras 3 días de OUU.

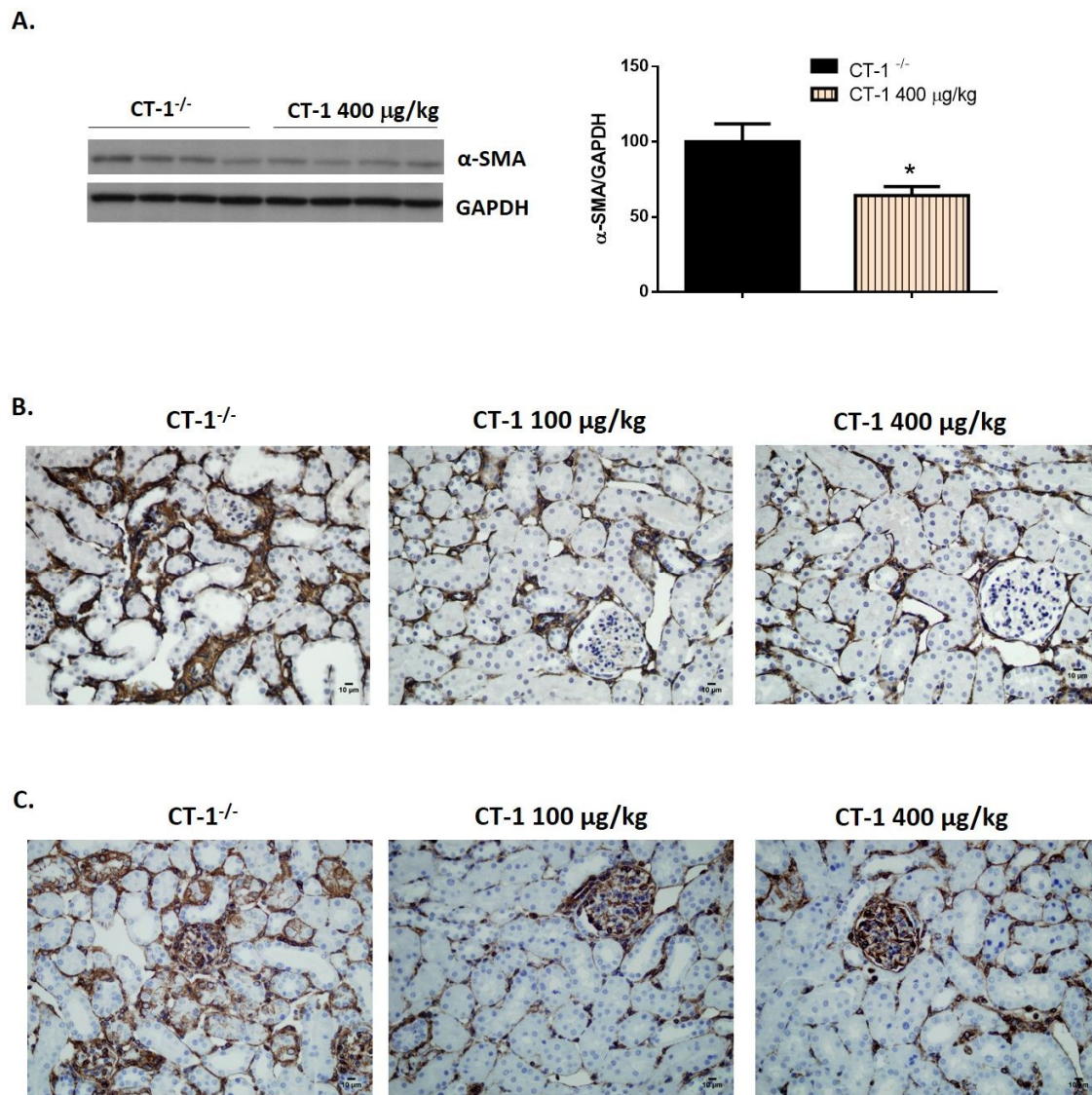


Figura 60. Análisis de la expresión de α -SMA y vimentina tras 3 días de obstrucción. A. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de α -SMA en riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 400 μ g/kg; se utilizó GAPDH como control de carga. B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con α -SMA (B) y vimentina (C) de la corteza de riñones O de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 μ g/kg (n=5), CT-1 400 μ g/kg (n=6). Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a CT-1^{-/-}. Magnificación original: 400X. α -SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1, O: obstruidos, NO: no obstruidos.

➤ Respuesta inflamatoria

La administración de CT-1 reduce la expresión de marcadores de inflamación que se encontraban excesivamente elevados en ausencia de CT-1.

Mediante qPCR hemos observado que la CT-1 reduce la expresión de ARNm de Cd68 e IL-1 β en los riñones O de ratones CT-1^{-/-} (figura 61).

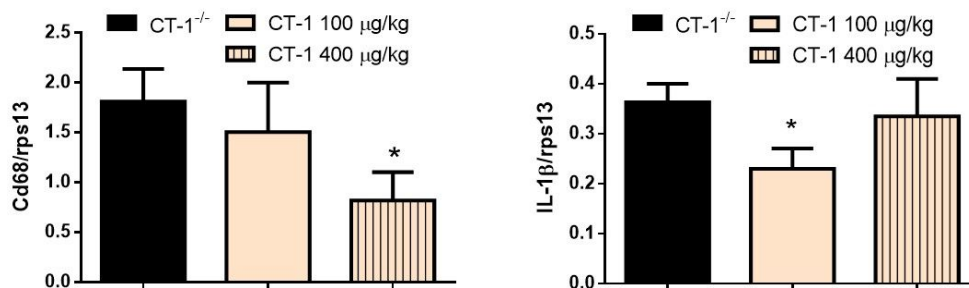


Figura 61. Análisis de la expresión de marcadores de inflamación tras 3 días de obstrucción. qPCR de la expresión de ARNm de Cd68 e IL-1 β en riñones obstruidos de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 μ g/kg y 400 μ g/kg. Se utilizó rps13 como control interno de carga; los datos representan la media \pm error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 μ g/kg (n=5), CT-1 400 μ g/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05 con respecto a CT-1^{-/-}. CT-1: cardiotrofina-1, IL-1 β : interleuquina-1 β .

Además, la administración de CT-1 en animales CT-1^{-/-} disminuye la expresión de VCAM-1, I κ B- α y COX-2 en los riñones O tras 3 días de OUU (figura 62). La inmunohistoquímica de iNOS muestra que los riñones O de ratones CT-1^{-/-} no tratados presentan una mayor tinción en los túbulos de la corteza renal que los riñones O tratados con CT-1 (figura 63), por lo que la administración de CT-1 parece reducir la expresión de iNOS en estos animales.

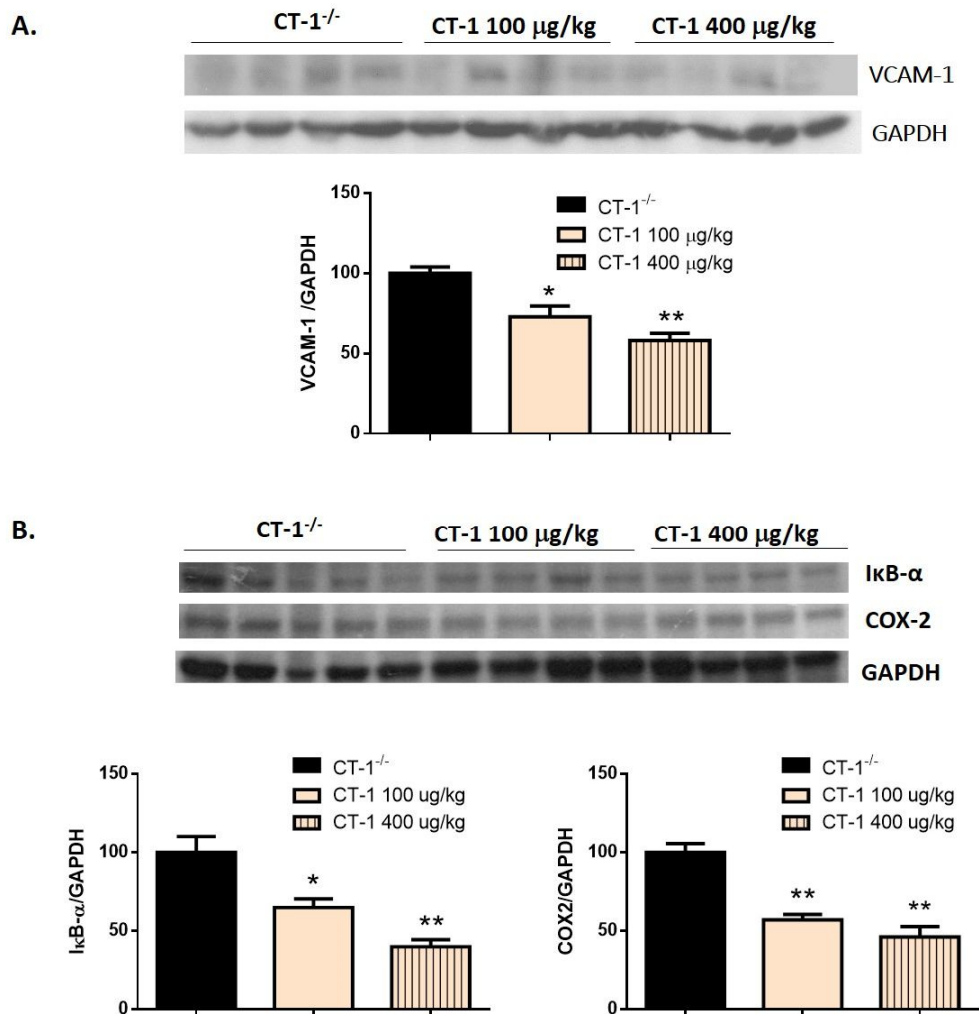


Figura 62. Análisis de la expresión de VCAM-1, IκB-α y COX-2 tras 3 días de obstrucción. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de VCAM-1 (A), IκB-α y COX-2 (B) en riñones obstruidos de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=6). Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, ** p<0,01 con respecto a CT-1^{-/-}. CT-1: cardiotrofina-1, COX-2: cicloxigenasa-2.

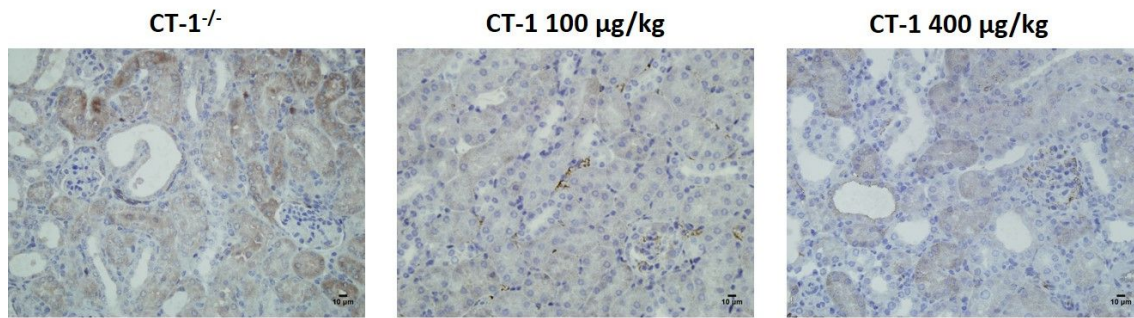


Figura 63. Análisis de la expresión de iNOS tras 3 días de OUU. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con iNOS de la corteza de riñones obstruidos de ratones CT-1^{-/-} tratados con CT-1 100 µg/kg y 400 µg/kg. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=6). Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

Resumiendo, todos estos datos muestran que la administración de CT-1 disminuye el daño tubular, apoptosis, respuesta inflamatoria y acumulación de miofibroblastos que se aprecia tras 3 días de OUU en ratones CT-1^{-/-}; este efecto generado en las fases tempranas de la enfermedad puede ser responsable del descenso en la fibrosis tubulointersticial originada en las fases tardías que se observa tras el tratamiento con CT-1 en ratones que no expresan esta proteína. Además, estos datos parecen sugerir que el mayor grado de fibrosis tubulointersticial observado en los ratones CT-1^{-/-} frente a los ratones CT-1^{+/+} tras el proceso de OUU, se debe a la ausencia de CT-1 y no a otro factor desconocido que hubiera podido surgir tras la generación de dichos ratones knock-out de CT-1.

4. Papel de la CT-1 en miofibroblastos de cultivo primario

Como hemos indicado anteriormente, los miofibroblastos renales juegan un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial, siendo la principal fuente de proteínas de MEC. Debido a nuestros resultados *in vivo* que muestran que tanto la CT-1 endógena como su administración exógena regulan distintos mecanismos que participan en el desarrollo de la enfermedad, evaluamos *in vitro* el papel de la CT-1 endógena y exógena en algunos de los procesos implicados en el desarrollo de la fibrosis renal como son la síntesis de proteínas de MEC, proliferación y migración celular renal (Fuentes-Calvo et al, 2012; Munoz-Felix et al, 2014b). Para ello, utilizamos cultivos primarios de miofibroblastos procedentes de ratones macho CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} tal y como se describe en la sección de métodos 8.1.

4.1. Expresión de CT-1, GP130 y LIFR

Comprobamos mediante inmunofluorescencia y western blot que los miofibroblastos renales procedentes de ratones CT-1^{+/+} expresan CT-1 mientras que los procedentes de ratones CT-1^{-/-} no la expresan (figura 64). Como se observa en la figura 64A, CT-1 se expresa en el citoplasma celular.

Así mismo, tanto LIFR como GP130 se expresan en miofibroblastos renales procedentes de ratones CT-1^{+/+} y de ratones CT-1^{-/-}. LIFR se localiza en la zona perinuclear y citoplasmática, mientras que GP130 tiene una mayor expresión citoplasmática. No existen diferencias en la localización de GP130 y LIFR entre las células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} (figura 64C).

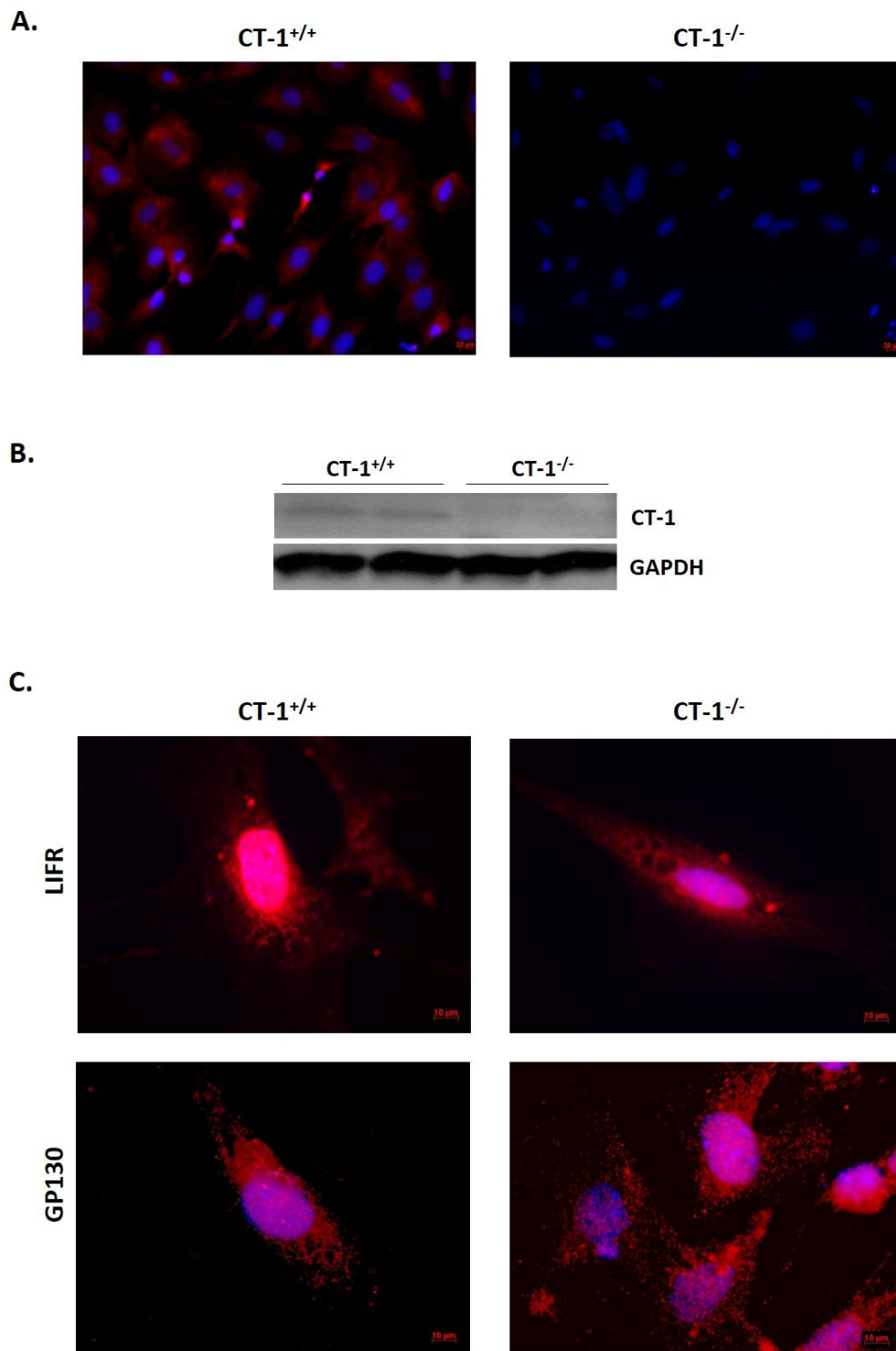


Figura 64. Análisis de la expresión de CT-1, GP130 y LIFR en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. A. Inmunofluorescencia de CT-1. Magnificación original: 200X; barra= 20 μ m. B. Expresión de CT-1 analizada por western blot; utilizamos GAPDH como control de carga. C. Inmunofluorescencia de GP130 y LIFR. Magnificación original: 630X; barra= 10 μ m. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF.

4.2. Vías de señalización activadas por CT-1

Estimulamos las células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} con CT-1 40 ng/mL durante 30 minutos (tras 24 horas en medio con 0,5% SBF). Elegimos este tiempo y concentración basándonos en experimentos previos en los que estimulamos las células con CT-1 a dosis de 10, 40 y 100 ng/mL durante 30 minutos (evaluando la fosforilación de STAT3); a dosis de 40 o 100 ng/mL se producía una fosforilación similar y mayor que a dosis de 10 ng/mL (resultados no mostrados).

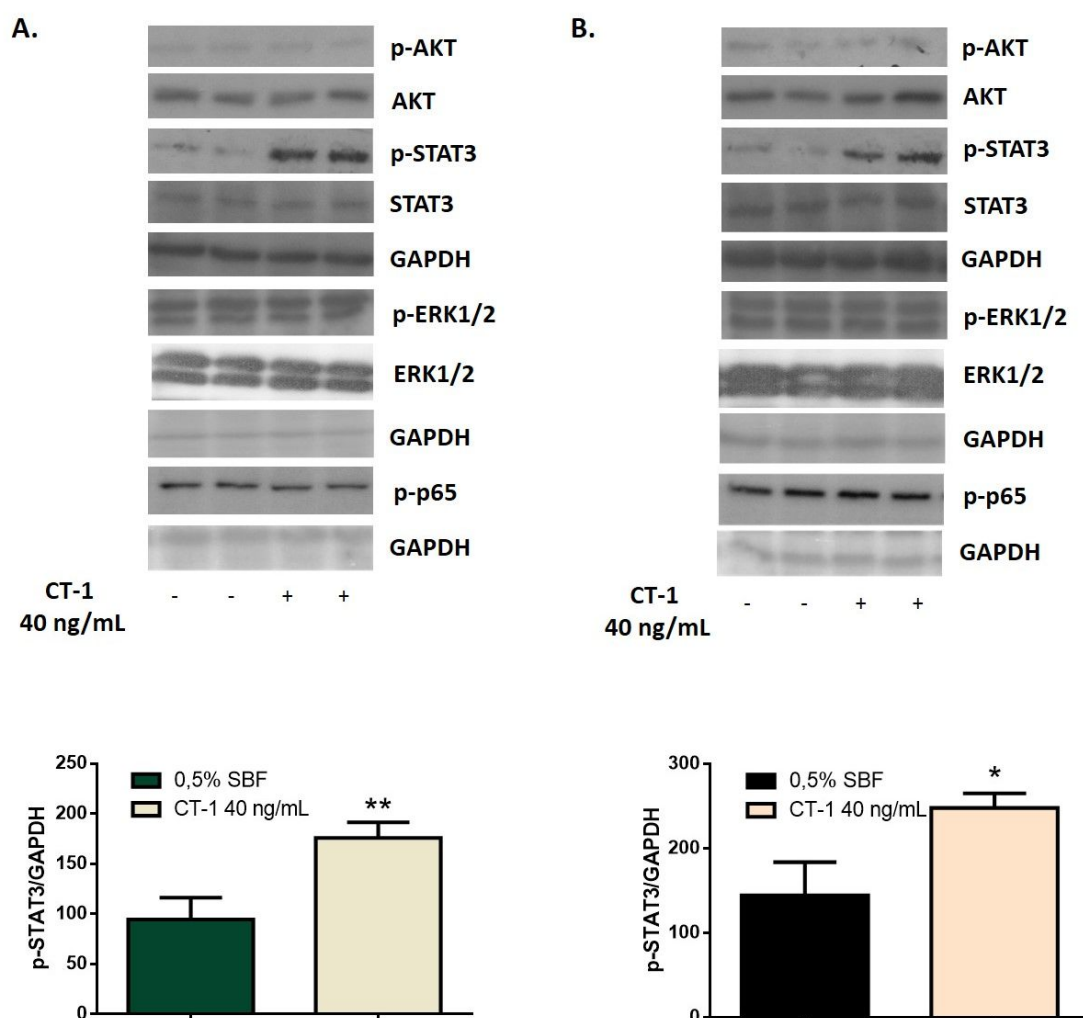


Figura 65. Análisis de la activación de vías de señalización intracelular. Imágenes representativas de western blots de la expresión de p-AKT, AKT, p-STAT3, STAT3, p-ERK1/2, ERK1/2 y p-p65 en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} (A) y CT-1^{-/-} (B) tras 30 minutos de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. Análisis estadístico: T de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto a 0,5% SBF. CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

Esta estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 30 minutos en miofibroblastos renales activa la vía de JAK/STAT3 a través del aumento en la fosforilación de STAT3; sin embargo ni en las células CT-1^{+/+} ni en las células CT-1^{-/-} vemos que CT-1 active las otras vías de señalización estudiadas (MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT y NF-κB) (figura 65), por lo que parece que en este tipo celular, la CT-1 ejerce sus funciones a través de JAK/STAT3.

4.3. Papel de la CT-1 en la síntesis de proteínas de MEC

Estimulamos los miofibroblastos renales CT-1^{+/+} con la citoquina profibrótica TGF-β1 1 ng/mL durante 24 horas (tras 24 horas de depleción de SBF). TGF-β1 produce un aumento en la expresión de CT-1 (figura 66).

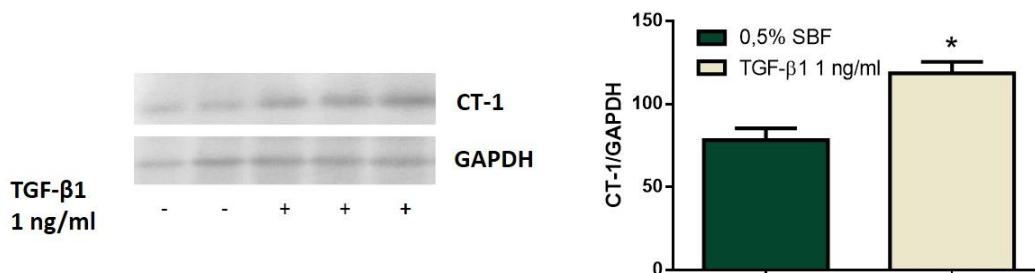


Figura 66. Análisis de la expresión de CT-1. Imagen representativa del análisis por western blot de la expresión de CT-1 tras 24 horas de estimulación con TGF-β1 1 ng/mL en miofibroblastos renales CT-1^{+/+}. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. Análisis estadístico: T de Student. *p<0,05 con respecto a 0,5% SBF. CT-1: cardiotrofina-1, TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta-1, SBF: suero bovino fetal.

Evaluamos el efecto de la CT-1 endógena en la expresión de proteínas de MEC estimulando tanto los miofibroblastos renales CT-1^{+/+} como los CT-1^{-/-} con TGF-β1 1 ng/mL durante 24 horas (tras 24 horas de depleción de SBF). TGF-β1 induce un aumento en la expresión de colágeno I y fibronectina en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Las células CT-1^{-/-} expresan una mayor cantidad de colágeno I y fibronectina que las células CT-1^{+/+} tanto en condiciones basales como tras la estimulación con TGF-β1 (figura 67A). Por lo tanto, la ausencia de CT-1 promueve una mayor expresión de proteínas de MEC en miofibroblastos renales.

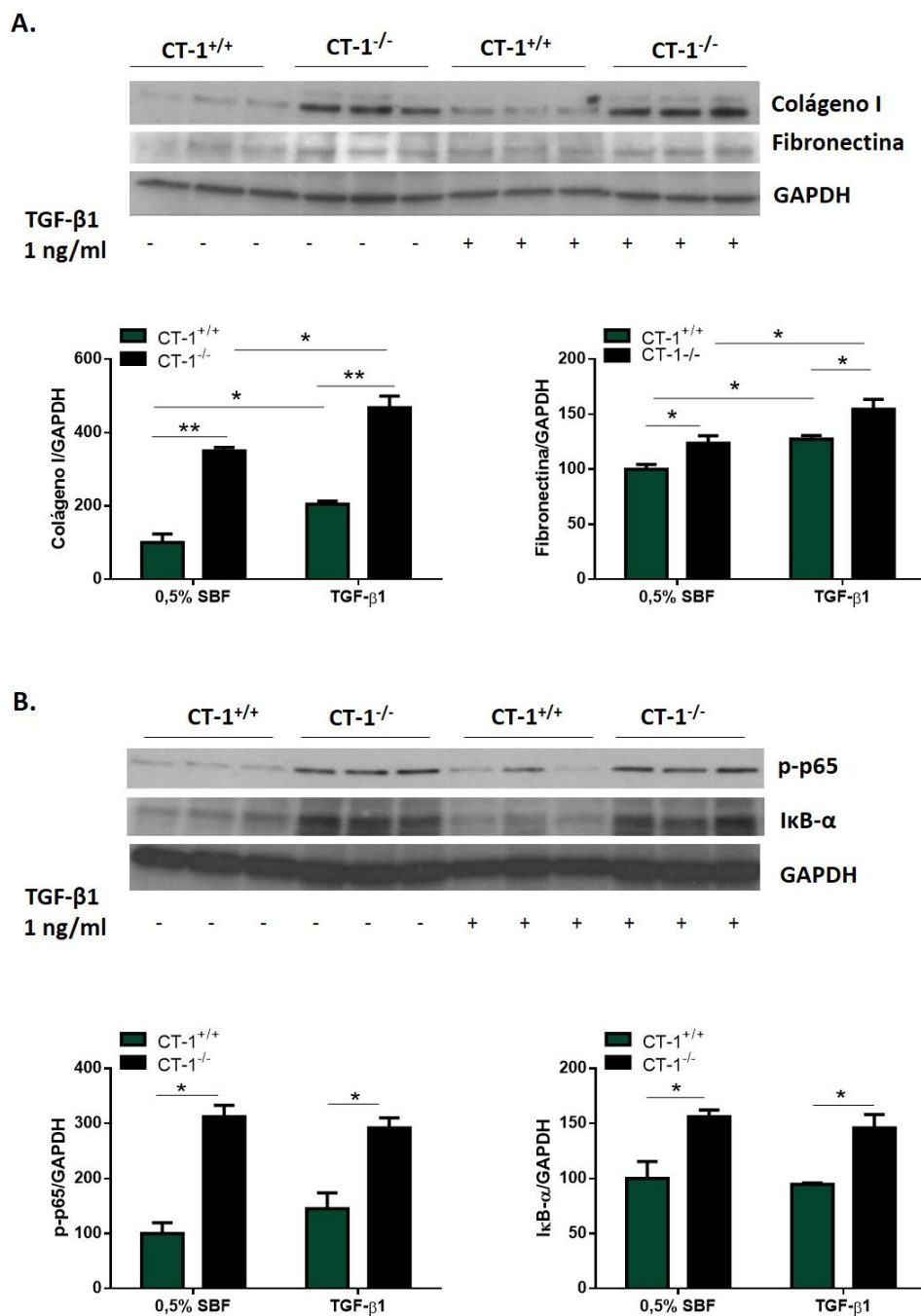


Figura 67. Análisis de la expresión de proteínas de MEC y de la activación de NF-κB. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de colágeno I y fibronectina tras 24 horas de estimulación con TGF-β1 1 ng/mL (A) y de p-p65 e IκB-α tras 30 minutos de estimulación con TGF-β1 1 ng/mL (B) en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. Análisis estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05, **p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. CT-1: cardiotrofina-1, MEC: matriz extracelular, SBF: suero bovino fetal, TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta-1.

Hemos observado mediante western blot que las células CT-1^{-/-} expresan una mayor cantidad de p-p65 y de IκB-α tanto en condiciones basales como tras la estimulación con TGF-β1 (1 ng/mL) durante 30 minutos que las células CT-1^{+/+} (figura 67B), lo que sugiere que la activación de NF-κB puede contribuir al aumento de proteínas de MEC observado en ausencia de CT-1.

4.4. Papel de la CT-1 en la migración celular

Evaluamos el papel de la CT-1 endógena en la migración celular mediante el ensayo denominado scratch o cierre de herida.

En la figura 68 se muestran fotografías representativas de células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} tras 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. Se observa que tanto a las 6, 12 y 24 horas el número de células que migran dentro de la herida es mayor en las células CT-1^{-/-} que en las CT-1^{+/+} (figura 69A).

Seguidamente analizamos el efecto de la estimulación con CT-1 40 ng/mL en la migración celular en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. Para ello, tras 24 horas de depleción de SBF, realizamos la herida y estimulamos las células con CT-1 40 ng/mL. Como se muestra en la figura 69B-C, no observamos diferencias en migración entre las células estimuladas con CT-1 o sin estimular, tanto en miofibroblastos CT-1^{+/+} como en CT-1^{-/-}. Estos datos sugieren que las células CT-1^{-/-} migran más que las células CT-1^{+/+}, pero la estimulación con CT-1 a la dosis y tiempo utilizados no afectan la migración celular de miofibroblastos renales en cultivo.

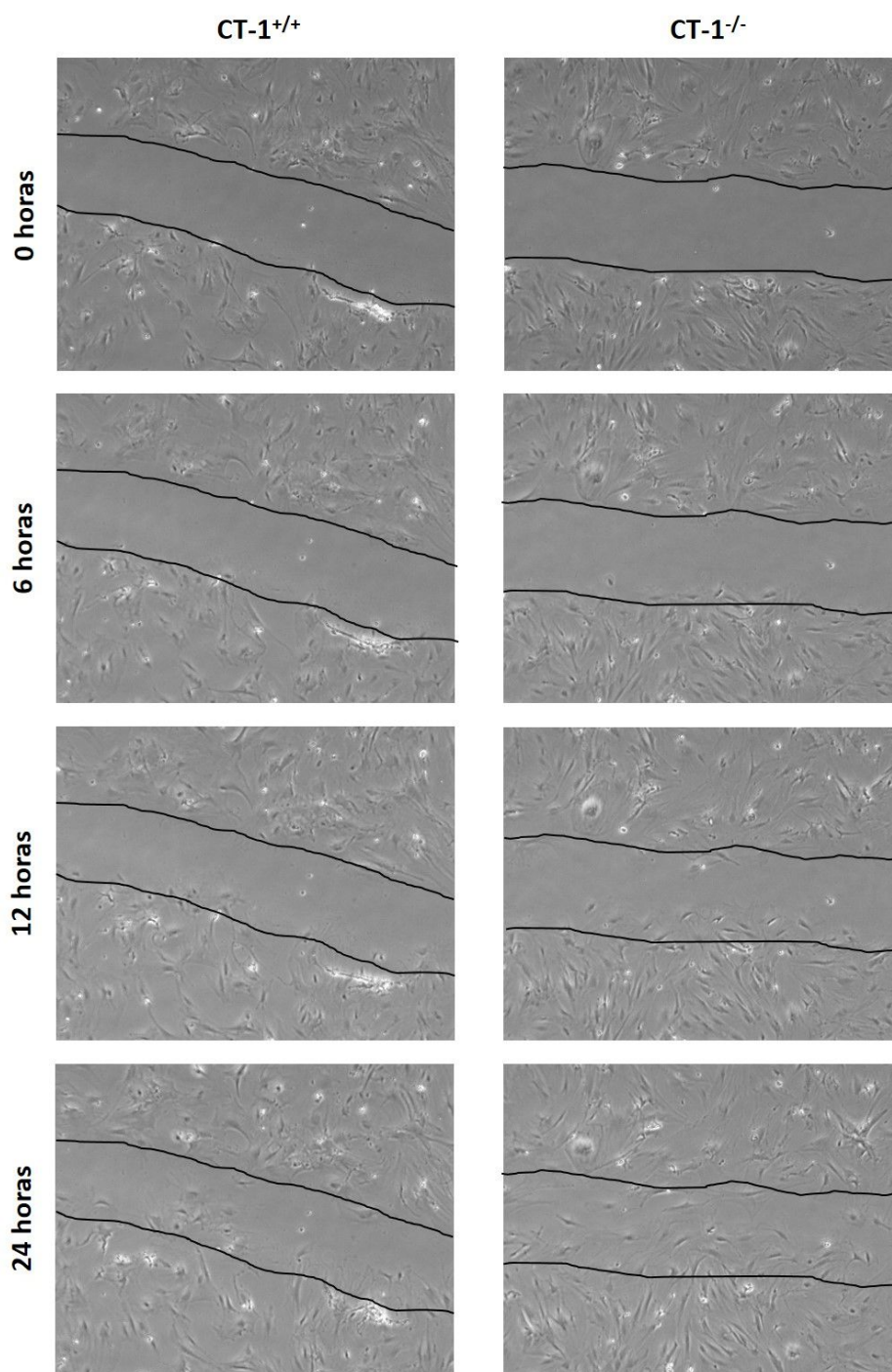


Figura 68. Migración de miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} en el ensayo de cierre de herida. Imágenes representativas tras 0, 6, 12 y 24 horas de la herida en la monocapa de células. Magnificación original: 50X. CT-1: cardiotrofina-1.

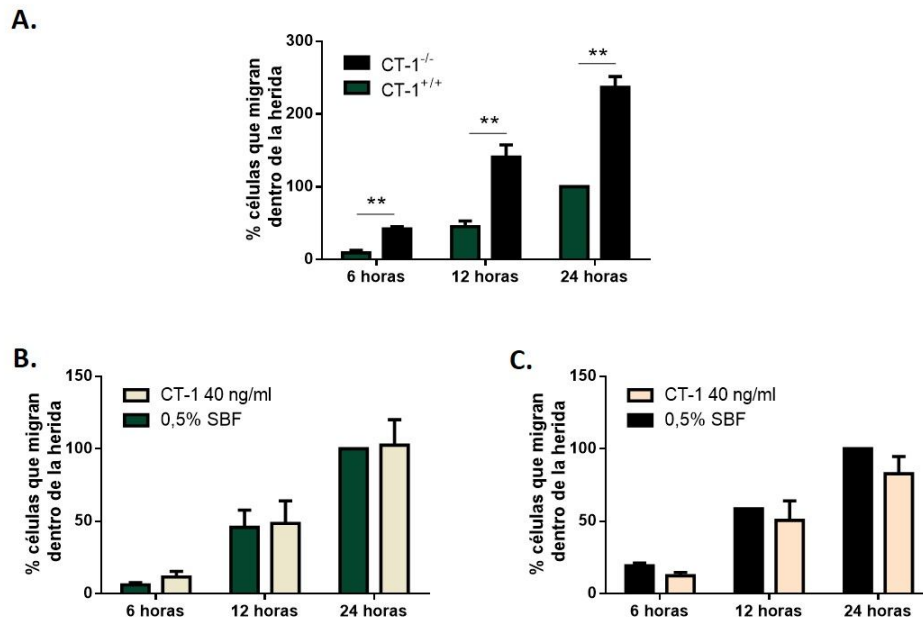


Figura 69. Cuantificación de la migración celular en el ensayo de cierre de herida. Porcentaje del número de células que migran dentro de la herida: A. representa la cuantificación de las células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}; B. representa la cuantificación de las células CT-1^{+/+} estimuladas con CT-1; C. representa la cuantificación de las células CT-1^{-/-} estimuladas con CT-1. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. **p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

4.5. Papel de la CT-1 en la proliferación celular

Como se observa en la figura 70, los miofibroblastos renales CT-1^{-/-} muestran una mayor viabilidad celular a las 24 y 48 horas tras la deplección que las células CT-1^{+/+}.

Todos estos resultados *in vitro* indican que los miofibroblastos renales expresan CT-1 así como sus receptores LIFR y GP130, sin haber diferencias en su localización entre las células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. JAK/STAT3 es la principal vía de señalización intracelular activada por la estimulación exógena de CT-1 en este tipo de células. Además, las células CT-1^{-/-} expresan una mayor cantidad de proteínas de MEC tanto en condiciones basales como tras estimulación con TGF- β 1, migran más y presentan una mayor viabilidad celular que los miofibroblastos renales CT-1^{+/+}, posiblemente debido a la mayor activación de NF- κ B observada en los miofibroblastos CT-1^{-/-}; estos datos podrían justificar, al menos en parte, los resultados obtenidos *in vivo* en los que observamos que los ratones CT-1^{-/-} muestran un mayor grado de fibrosis tubulointersticial tras la OUU que los ratones CT-1^{+/+}.

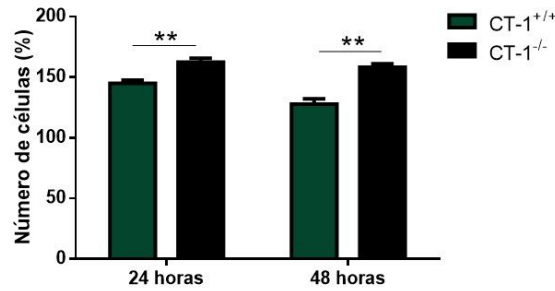


Figura 70. Análisis de la proliferación celular. Porcentaje del número de células viables en miofibroblastos renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} evaluado mediante ensayo de MTT a las 24 y 48 horas tras la depleción. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. **p<0,01 con respecto a los grupos indicados por la línea. CT-1: cardiotrofina-1.

5. Papel de la CT-1 en células epiteliales tubulares

En este tipo celular analizamos la expresión de CT-1 y sus receptores (LIFR y GP130), así como las vías de señalización activadas tras la estimulación con CT-1. También evaluamos el papel de la CT-1 en la hipertrofia y proliferación celular.

Para ello, realizamos cultivos primarios de células epiteliales tubulares procedentes de ratones macho CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} tal y como se describe en la sección de métodos 8.2.

5.1. Expresión de CT-1, GP130 y LIFR

Observamos mediante inmunofluorescencia (figura 71A) y western blot (figura 71B) que las células tubulares CT-1^{+/+} expresan CT-1 en el citoplasma mientras que las CT-1^{-/-} no la expresan.

También detectamos mediante inmunofluorescencia la expresión perinuclear y citoplasmática de LIFR y GP130 tanto en células CT-1^{+/+} como en células CT-1^{-/-}, sin diferencias en función de la presencia o ausencia de CT-1 (figura 71C).

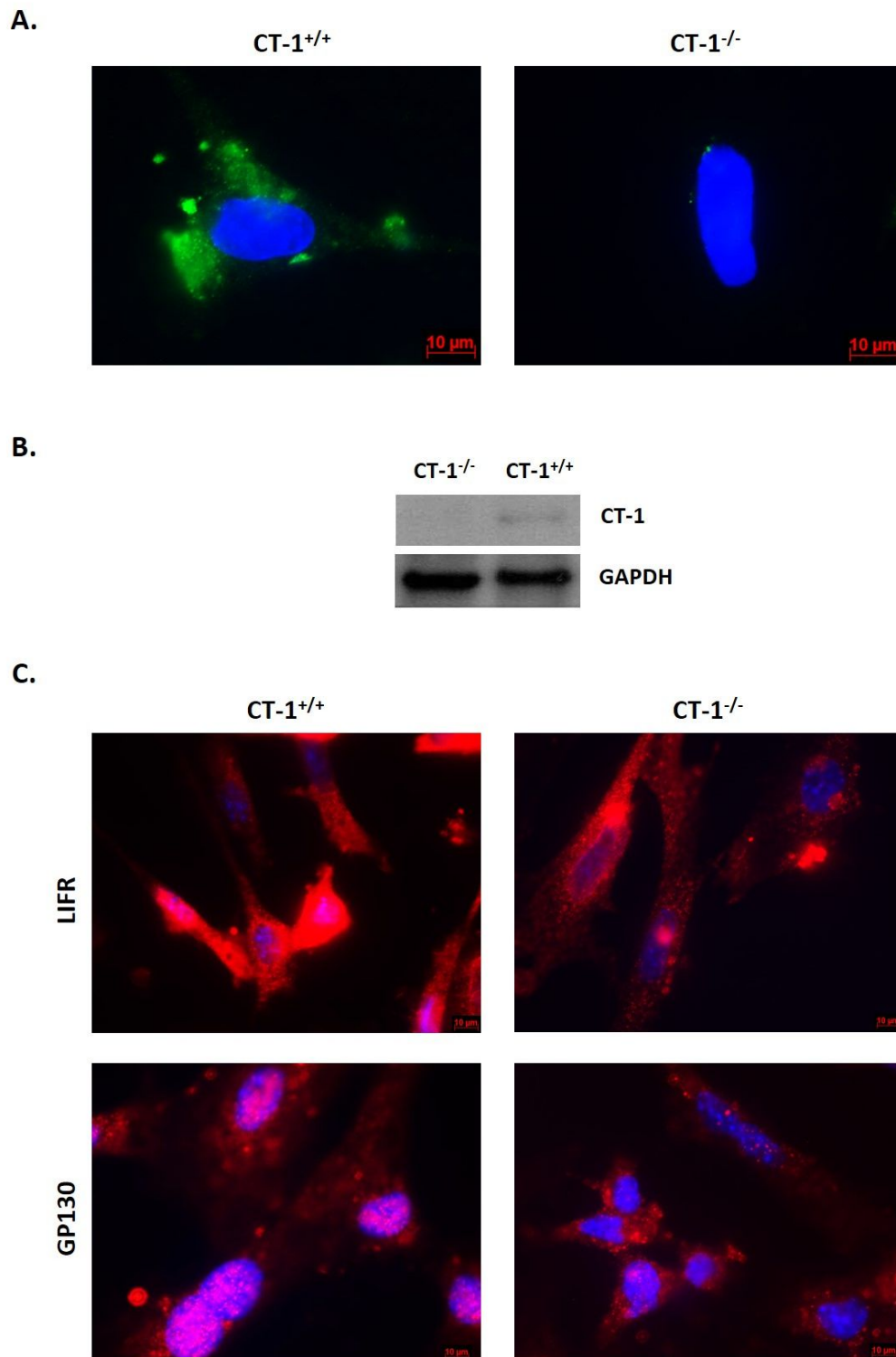


Figura 71. Análisis de la expresión de CT-1, GP130 y LIFR en células epiteliales tubulares renales CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}. A. Inmunofluorescencia de CT-1. B. Expresión de CT-1 analizada por western blot; utilizamos GAPDH como control de carga. C. Inmunofluorescencia de GP130 y LIFR. Magnificación original: 630X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF.

5.2. Vías de señalización activadas por CT-1

Estimulamos las células epiteliales tubulares procedentes de ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} con CT-1 40 ng/mL durante 30 minutos tras 24 horas de depleción de SBF.

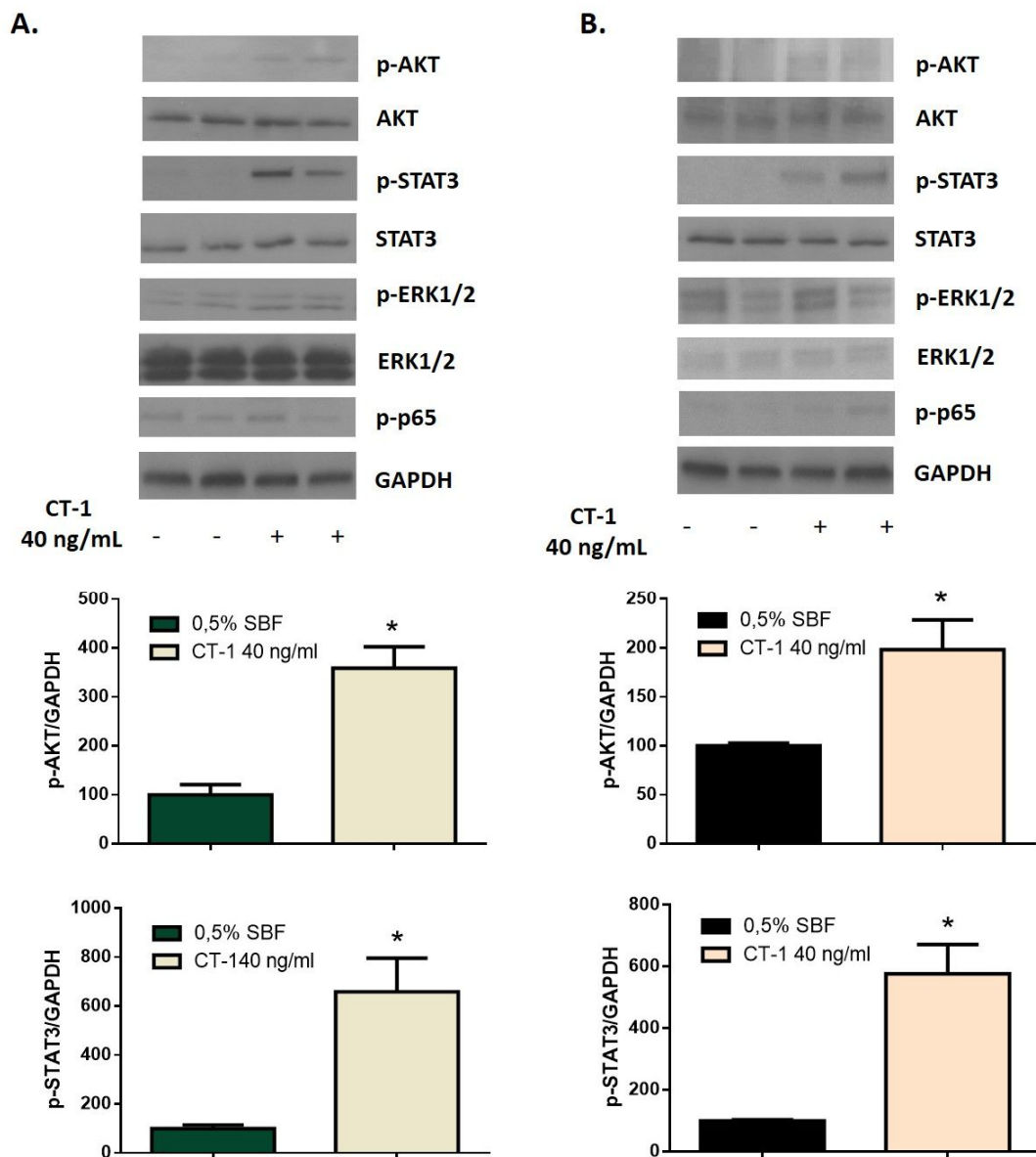


Figura 72. Análisis de la activación de vías de señalización intracelular. Imágenes representativas de western blots de p-AKT, AKT, p-STAT3, STAT3, p-ERK1/2, ERK1/2 y p-p65 en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} (A) y CT-1^{-/-} (B) tras 30 minutos de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias \pm error estándar de la media. Análisis estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a 0,5% SBF. CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

Como se observa en la figura 72, la estimulación con CT-1 activa las vías de JAK/STAT3 (evaluada por el aumento en la fosforilación de STAT3) y PI3K/AKT (evaluada por el aumento en la fosforilación de AKT). Sin embargo, CT-1 no estimula las vías de MAPK/ERK1/2 o NF- κ B.

Por ello, en células epiteliales tubulares, CT-1 ejerce su acción a través de la activación de JAK/STAT3 y PI3K/AKT fundamentalmente, vías directamente relacionadas con la hipertrofia celular y protección de la apoptosis respectivamente.

5.3. Papel de la CT-1 en la hipertrofia celular

Evaluamos la hipertrofia celular mediante tinción con faloidina. La cuantificación del área celular, así como una imagen representativa de cada grupo de estudio se muestran en la Figura 73. Las células CT-1^{+/+} presentan un mayor tamaño celular que las CT-1^{-/-}; además, la estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 48 horas induce un aumento del tamaño celular tanto en las células CT-1^{+/+} como en las células CT-1^{-/-}.

También evaluamos la hipertrofia celular mediante el análisis del cociente proteínas/ADN. Como se observa en la figura 74, la estimulación con CT-1 40 ng/mL produce un aumento estadísticamente significativo del cociente proteínas/ADN en las células CT-1^{+/+}; la estimulación con CT-1 también aumenta el cociente proteínas/ADN en células CT-1^{-/-}, aunque no es estadísticamente significativo ($p=0,08$). Todos estos datos sugieren que tanto la CT-1 endógena como la administrada exógenamente parecen estar implicadas en la regulación del tamaño celular.

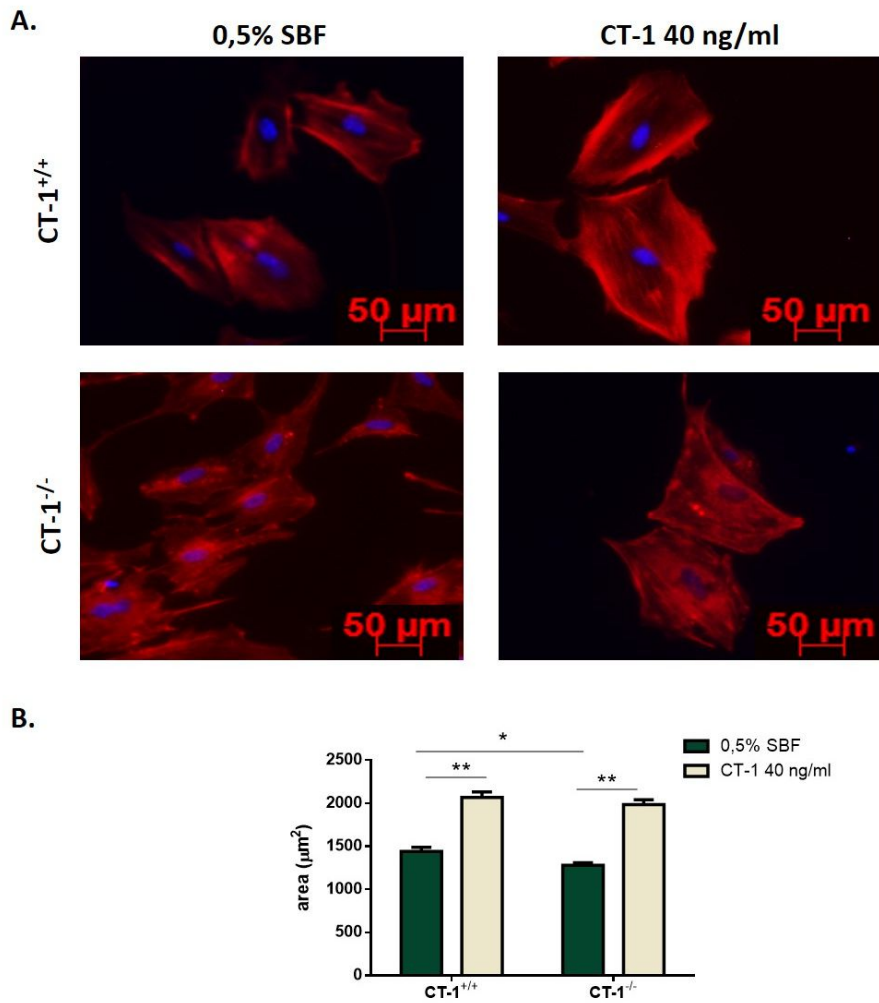


Figura 73. Análisis de la hipertrofia celular mediante inmunofluorescencia con faloidina. A. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia de faloidina en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-} en condiciones basales (medio con 0,5% SBF) y tras 48 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. B. Cuantificación del área celular mediante el software Fiji. Los datos representan la media ± error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al grupo indicado por la línea. Magnificación original: 50X CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

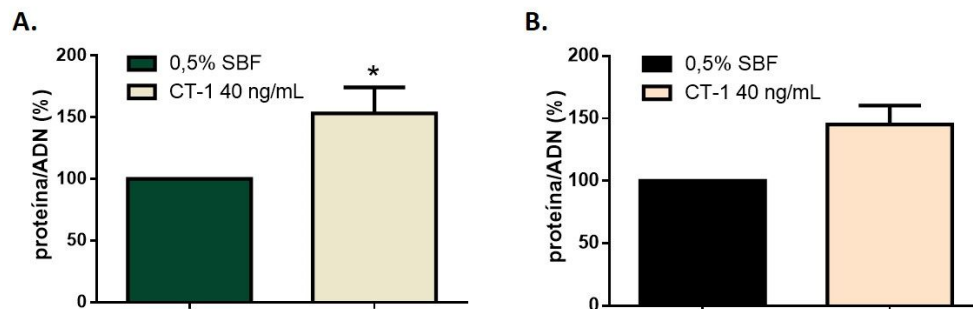


Figura 74. Análisis de la hipertrofia celular mediante el cociente proteína/ADN en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} (A) y CT-1^{-/-} (B) en condiciones basales (mantenidas en medio con 0,5% de SBF) y tras 48 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto a 0,5% SBF. CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

Debido a que previamente observamos que JAK/STAT3 se activa significativamente tras la estimulación con CT-1 en este tipo celular, y a que en cardiomiocitos la CT-1 ejerce su papel hipertrófico fundamentalmente a través de la activación de dicha vía (Railson et al, 2002; Tian et al, 2004), analizamos si efectivamente la CT-1 ejerce su efecto hipertrófico a través de la fosforilación de STAT3.

Para ello, estimulamos las células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} con S3I-201 50 μ M (inhibidor de la fosforilación de STAT3), y con CT-1 40 ng/mL tras 24 horas de depleción de SBF, siguiendo el procedimiento explicado en la sección de métodos 8.8. Elegimos esta concentración de S3I-201 basándonos en estudios previos (Matsui et al, 2013). Así mismo, estimulamos con S3I-201 50 μ M durante 2 horas junto a CT-1 40 ng/mL durante 30 minutos y comprobamos mediante western blot que S3I-201 inhibe efectivamente la fosforilación de STAT3 (figura 75).

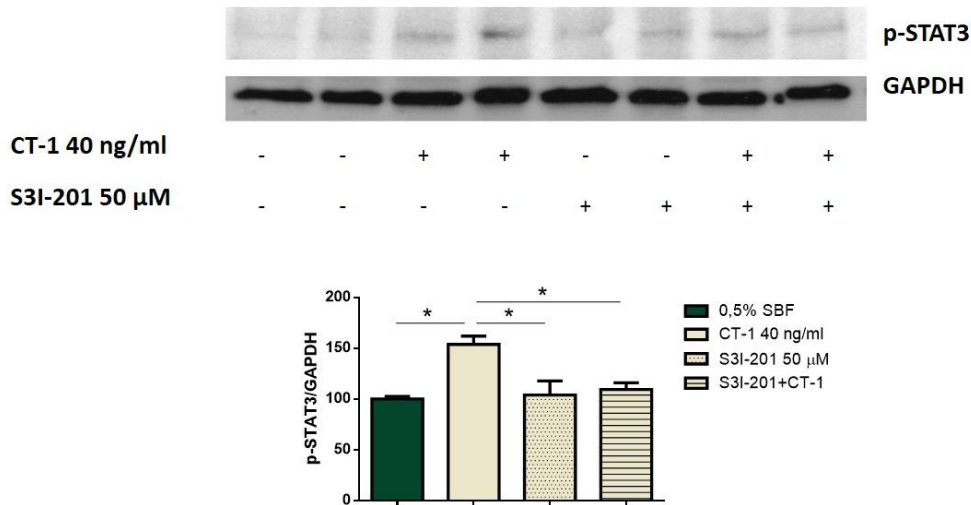


Figura 75. Análisis de la expresión de p-STAT3. Imágenes representativas del análisis por western blot de la expresión de p-STAT3 en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} en condiciones basales (medio con 0,5% SBF), tras estimulación con S3I-201 50 μM (2 horas) y CT-1 40 ng/mL (30 minutos). Se utilizó GAPDH como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica de los western blots; los datos son las medias ± error estándar de la media. Análisis estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05 con respecto a los grupos indicados por la línea. CT-1: cardiotrofina-1, SBF: suero bovino fetal.

Además, no se observa un aumento en el tamaño celular (valorado por inmunofluorescencia con faloidina) tras la estimulación con S3I-201 50 μM + CT-1 40 ng/mL (figura 76), por lo que podemos sugerir que, al menos en parte, la CT-1 ejerce su acción hipertrófica en las células epiteliales tubulares mediante la fosforilación de STAT3.

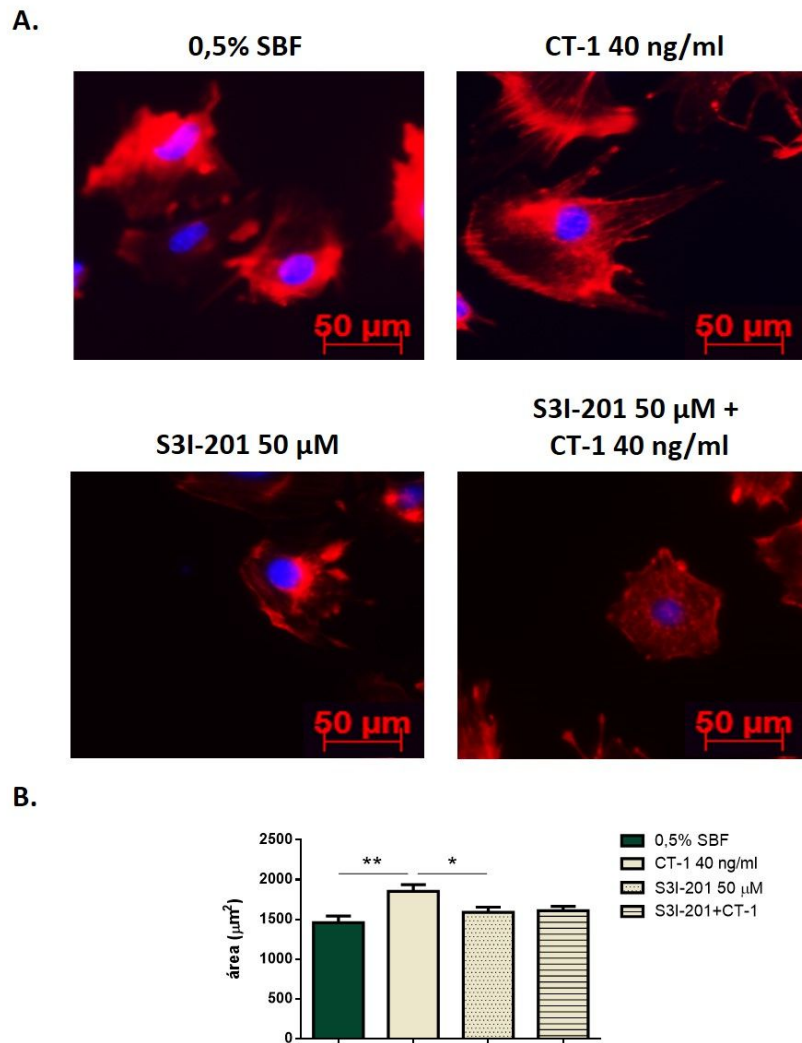


Figura 76. Análisis de la hipertrofia celular mediante inmunofluorescencia con faloidina. A. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia de faloidina en células epiteliales tubulares CT-1^{+/+} en condiciones basales (medio con 0,5% SBF) tras estimulación con S3I-201 50 μM (2 horas) y CT-1 40 ng/mL durante 48 horas. B. Cuantificación del área celular mediante el software Fiji. Los datos representan la media ± error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: ANOVA de una vía. *p<0,05 **p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 100X. CT-1: cardiotrofina, SBF: suero bovino fetal.

5.4. Papel de la CT-1 en la proliferación celular

Evaluamos la proliferación celular en células epiteliales tubulares CT-1^{-/-} y sus respectivos controles CT-1^{+/+} en condiciones basales (mantenidas en medio con 0,5% SBF). Como se observa en la figura 77, no hay diferencias en la proliferación celular entre las células CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}.

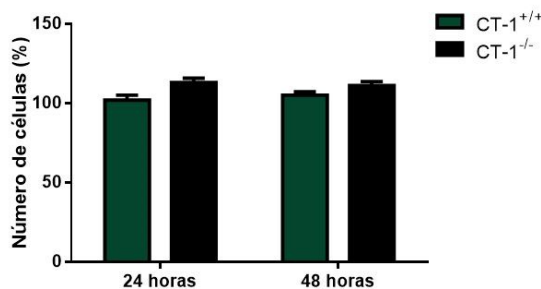


Figura 77. Análisis de la proliferación celular. Porcentaje del número de células epiteliales tubulares viables CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}, valorado por ensayo de MTT a las 24 y 48 horas post depleción. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. CT-1: cardiotrofina-1.

También analizamos el efecto de la estimulación con CT-1 en la proliferación de células epiteliales tubulares CT-1^{+/+}. No se observan diferencias en la proliferación celular tras la estimulación con CT-1 40 ng/mL ni a las 24 ni a las 48 horas (figura 78).

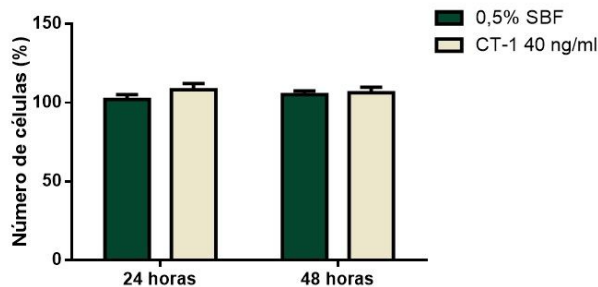


Figura 78. Análisis de la proliferación celular. Porcentaje del número de células epiteliales tubulares viables CT-1^{+/+} valorado por ensayo de MTT a las 24 y 48 horas tras la estimulación con CT-1 40 ng/mL. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. CT-1: cardiotrofina-1.

Por lo tanto, ni la CT-1 endógena ni exógena parecen influir en la viabilidad y proliferación celular en las células epiteliales tubulares en cultivo primario.

En conjunto, todos estos resultados indican que las células epiteliales tubulares expresan CT-1, LIFR y GP130, pero la expresión de estos receptores no varía en presencia o ausencia de CT-1. La estimulación con CT-1 activa las vías de JAK/STAT3 y PI3K/AKT, y su efecto

hipertrófico lo realiza a través de la fosforilación de STAT3. Por otra parte, CT-1 no ejerce ningún efecto sobre la viabilidad o proliferación de este tipo celular.

6. CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis

Para estudiar el papel de la CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis, utilizamos un modelo experimental nefrotóxico por SNT, tal y como se explica en la sección de métodos 3.2 que replica algunas de las características patológicas de la glomerulonefritis crescética humana: daño en las células glomerulares, formación de semilunas y una marcada inflamación y fibrosis (Khan et al, 2005; Tam et al, 1999; Vasilopoulou et al, 2016).

6.1. Expresión de CT-1 y sus receptores en la glomerulonefritis experimental

7 días después de la administración de SNT se observa (por tinción con PAS) un daño intermedio en el que algunos glomérulos contienen depósitos de material hialino y aumento de la matriz mesangial. 21 días tras la administración de SNT se incrementa la gravedad de estas anomalías y en algunos glomérulos aparece colapso de los capilares, glomeruloesclerosis, adhesión del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman e hiperplasia epitelial (figura 79).

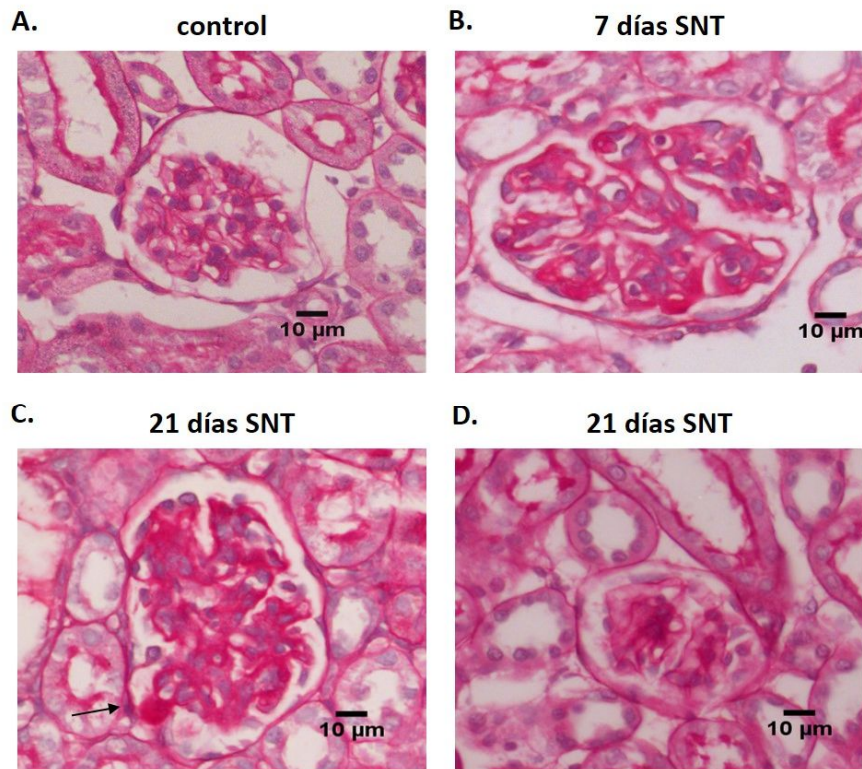


Figura 79. Imágenes representativas de la tinción con PAS. A. Glomérulo de ratón control. B. Glomérulo de ratón 7 días tras la administración de SNT con depósitos hialinos. C. Glomérulo de ratón 21 días tras la administración de SNT con depósitos hialinos, colapso capilar y adhesión del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman indicado mediante una flecha. D. Glomérulo de ratón 21 días tras la administración de SNT con una abundante área esclerótica y pérdida de capilares. Control (n=6), 7 días SNT (n=6), 21 días SNT (n=5). Magnificación original: 400X. PAS: ácido peryódico de Schiff, SNT: suero nefrotóxico.

En estos ratones analizamos la función renal. Se observa un aumento en la albuminuria 7 y 21 días tras la administración de SNT así como un aumento de creatinina plasmática 21 días tras la administración de SNT (figura 80).

Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la administración de SNT produce un daño histológico glomerular así como una alteración en la función renal.

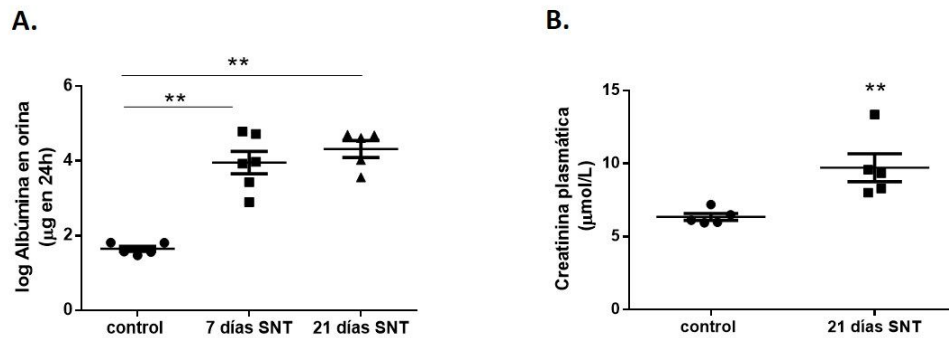


Figura 80. Análisis de la función renal. A. Albumina en orina en ratones controles y 7 y 21 días tras la administración de SNT. Los valores se representan como el logaritmo en base 10 de la albumina en orina (μg en 24 horas). Las barras rerepresentan la media \pm EEM. Test estadístico: ANOVA de una vía. $**p < 0,01$ con respecto a los grupos indicados por las líneas. B. Creatinina plasmática ($\mu\text{mol/L}$) en ratones controles y 21 días tras la administración de SNT. Las barras representan la media \pm EEM. Test estadístico: T de Student. $**p < 0,01$ con respecto al control. Control ($n=6$), 7 días SNT ($n=6$), 21 días SNT ($n=5$). EEM: error estándar de la media, SNT: suero nefrotóxico.

➤ Expresión de CT-1

Para evaluar el grado de expresión de CT-1 alrededor del glomérulo hemos realizado un score detallado en la sección de métodos 5.5. Observamos que con la progresión de la enfermedad hay una disminución en la expresión de CT-1 en las células que se encuentran entre el ovillo glomerular y la cápsula de Bowman (figura 81), siendo más evidente esta disminución 21 días tras la administración de SNT.

No encontramos diferencias en los niveles de expresión de ARNm de CT-1 entre los riñones controles y 21 días tras la administración de SNT (figura 81), lo que confirma que las diferencias encontradas se deben exclusivamente a la expresión alrededor del glomérulo. Por ello, la administración exógena de CT-1 podría tener un efecto protector frente al desarrollo de la glomerulonefritis.

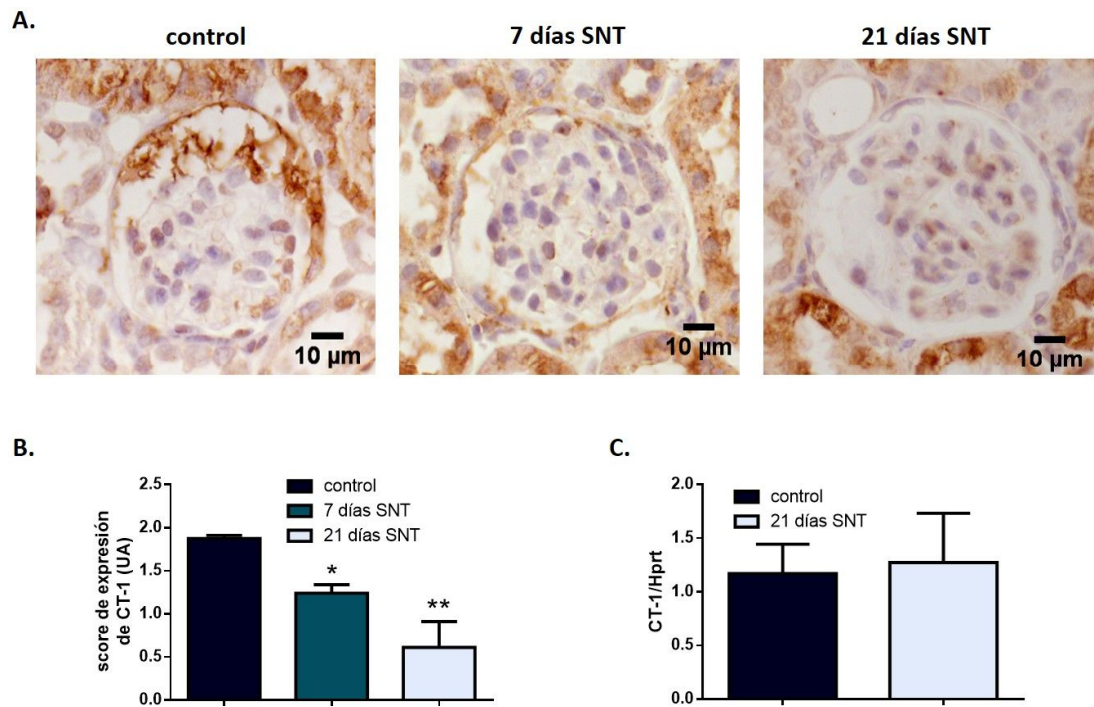


Figura 81. Análisis de la expresión de CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis. A. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de CT-1 en riñones de ratones controles y 7 y 21 días tras la administración de SNT. B. Score de expresión de CT-1 en riñones controles y 7 y 21 días tras la administración de SNT. Los datos representan la media en UA \pm EEM. Análisis estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al control. C. Análisis mediante qPCR de la expresión de ARNm de CT-1. Se utilizó Hprt como control interno de carga; los datos representan la media \pm EEM. Test estadístico: T de Student. Control (n=6), 7 días SNT (n=6), 21 días SNT (n=5). Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, EEM: error estándar de la media, SNT: suero nefrotóxico, UA: unidades arbitrarias.

➤ Expresión de LIFR y GP130

No encontramos diferencias en los niveles de expresión del ARNm de ninguno de los dos receptores 21 días tras la administración de SNT (figura 82).

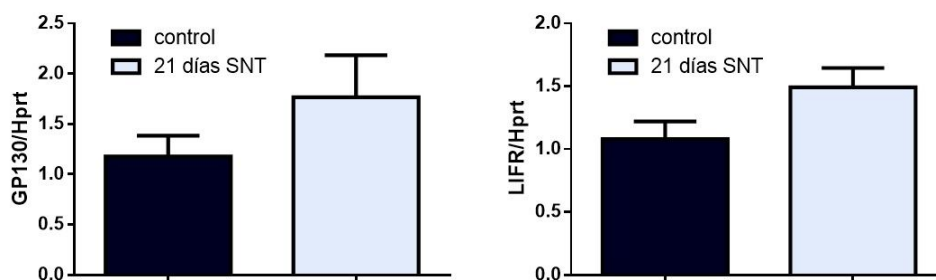


Figura 82. Análisis de la expresión de ARNm de GP130 y LIFR 21 días tras la administración de SNT. qPCR de la expresión de ARNm de GP130 y LIFR en riñones de ratones controles y 21 días tras la administración de SNT; se utilizó Hprt como control interno de carga; los datos representan la media \pm error estándar de la media. Test estadístico: T de Student. Control (n=6), 21 días SNT (n=5). GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF, SNT: suero nefrotóxico.

6.2. Efecto del tratamiento con CT-1 en la progresión de la glomerulonefritis

Evaluamos el posible papel protector del tratamiento con CT-1 frente al daño renal producido por la administración de SNT.

➤ Efecto del tratamiento con CT-1 en la función renal

Observamos que 21 días tras la administración de SNT hay un aumento en la albuminuria; los ratones tratados con CT-1 presentan una menor albuminuria que los ratones no tratados con CT-1 21 días tras la administración de SNT; por ello, la administración de CT-1 parece tener un efecto protector frente a la albuminuria inducida por SNT (figura 83).

También hay un aumento significativo de creatinina plasmática 21 días tras la administración de SNT, que es menor en el grupo tratado con SNT y CT-1 (figura 84A). Cuando se comparan los valores de creatinina plasmática entre los días 7 y 21 tras la administración de SNT, el aumento es menor en el grupo tratado con CT-1, con una interacción cercana a la significación ($p=0,08$) (figura 84B).

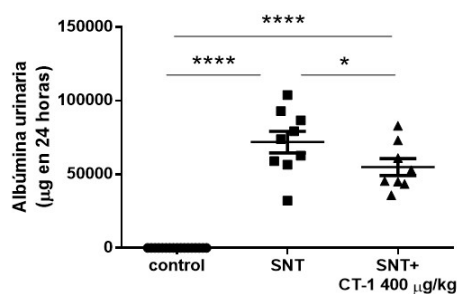


Figura 83. Análisis de la albuminuria tras administración de SNT. Excreción de albúmina en orina en 24 horas en ratones a día 0 (controles) y 21 días tras la administración de SNT + CT-1 400 µg/kg. Las barras son la media ± error estándar de la media. SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Test estadístico: ANOVA de una vía. ****p<0,0001, *p<0,05 con respecto a los grupos indicados por las líneas. CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

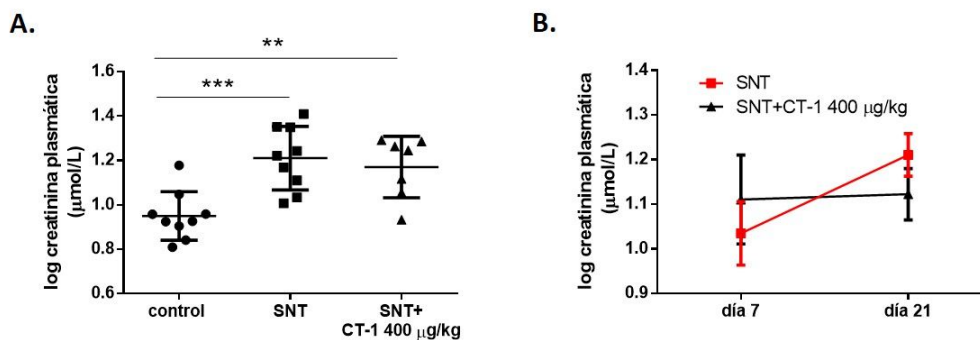


Figura 84. Análisis de la creatinina plasmática tras administración de SNT. A. Creatinina plasmática en ratones a día 0 (controles) y 21 días tras la administración de SNT + CT-1 400 µg/kg. Los valores se representan como el logaritmo en base 10 de la creatinina plasmática (µmol/L). Las barras son la media ± EEM. Test estadístico: ANOVA de una vía. ***p<0,001, *p<0,05 con respecto a los grupos indicados por las líneas. B. Creatinina plasmática 7 y 21 días tras la administración de SNT. Los valores se representan como el logaritmo en base 10 de la creatinina plasmática (µmol/L). Las barras son la media ± EEM. Test estadístico: ANOVA de doble vía. SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). EEM: error estándar de la media, CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

También hemos observado una disminución en el aclaramiento de creatinina 21 días tras la administración de SNT, aunque no se encuentran diferencias entre los ratones tratados y sin tratar con CT-1 (figura 85A). Hay un aumento estadísticamente significativo de los compuestos nitrogenados en sangre 21 días tras la administración de SNT, aumento que no aparece en los ratones tratados con SNT y CT-1 (figura 85B).

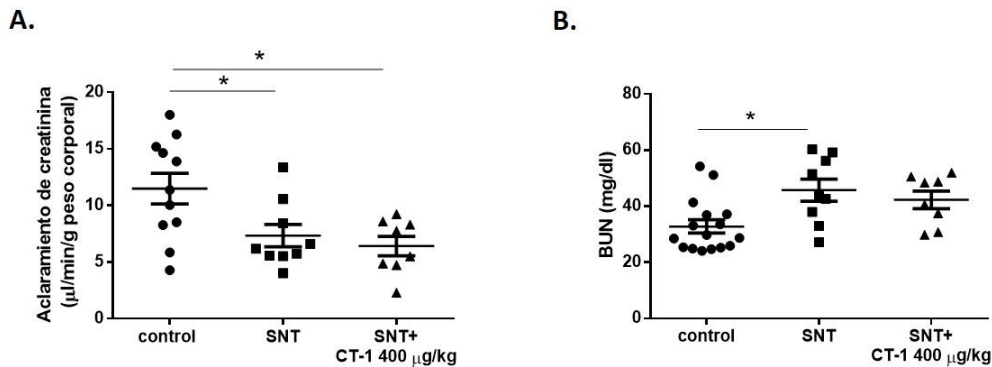


Figura 85. Análisis del aclaramiento de creatinina (A) y de los compuestos nitrogenados en sangre (B) a día 0 (controles) y 21 días tras la administración de SNT + CT-1 400 µg/kg. Las barras representan la media \pm error estándar de la media. SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ con respecto a los grupos indicados por las líneas. BUN: compuestos nitrogenados en sangre, CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

Estos datos indican que la administración de CT-1 reduce los aumentos observados en la albuminuria, creatinina plasmática y compuestos nitrogenados en sangre tras la administración de SNT. Por lo tanto, la administración de CT-1 parece tener un efecto protector sobre el daño renal producido tras la administración de SNT.

➤ Efecto del tratamiento con CT-1 en el proceso inflamatorio

La infiltración de células del sistema inmune juega un papel fundamental en el inicio y progresión de la glomerulonefritis crescética (Duffield et al, 2005; Huang et al, 1997) por lo que decidimos examinar esta infiltración en el modelo de glomerulonefritis inducida por SNT mediante inmunohistoquímica con F4/80 (glicoproteína expresada en los macrófagos) tal y como han realizado otros autores previamente en este modelo (Vasilopoulou et al, 2016).

Cuantificamos el número de células teñidas con F4/80 dentro del ovillo glomerular y en la zona periglomerular de los riñones 21 días tras la administración de SNT y CT-1 400 µg/kg.

Observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas en el número de células F4/80 positivas en el interior del ovillo glomerular en nuestros grupos experimentales. La enfermedad produce un aumento en el número de células F4/80 positivas en la zona periglomerular, siendo este número mayor en el grupo sin tratar con CT-1 que en el grupo tratado con CT-1 (figura 86). Por lo tanto, la administración de CT-1 reduce la acumulación de macrófagos activados en la zona periglomerular tras la administración de SNT.

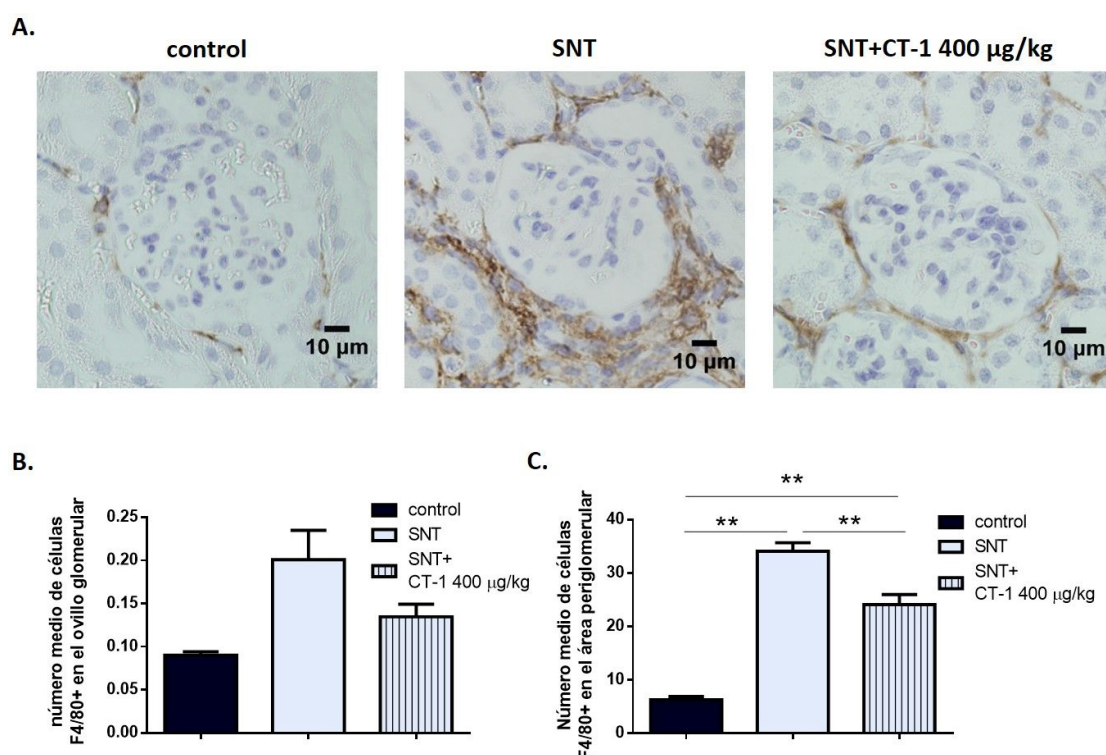


Figura 86. Análisis de la inflamación en la glomerulonefritis nefrotóxica. A. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica con F4/80 en glomérulos de riñones de ratones de controles y 21 días tras la administración con SNT y CT-1 400 µg/kg. Se contaron el número de células F4/80+ en el ovillo glomerular (B) y en el área periglomerular (C) de 50 glomérulos por muestra y se calculó la media. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Control (n=6), SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Test estadístico: ANOVA de una vía. **p<0,01 con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

➤ Efecto del tratamiento con CT-1 en la fibrosis renal

Como se ha mencionado anteriormente, en las fases tardías de la enfermedad aparece una marcada glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, por lo que evaluamos el grado de glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial 21 días tras la administración de SNT en ratones tratados con CT-1.

Como se muestra en la figura 87, tras 21 días de la administración de SNT hay un aumento del área de fibrosis (valorada por tinción con Rojo Sirio) en la zona intersticial (fibrosis intersticial); este aumento es menor en los ratones tratados con CT-1.

También evaluamos el grado de glomerulosclerosis cuantificando el área fibrótica dentro del ovillo glomerular. Como puede observarse en la figura 87, tras 21 días de administración de SNT los glomérulos de los ratones tratados con CT-1 presentan un menor grado de glomerulosclerosis que los ratones sin tratar con CT-1.

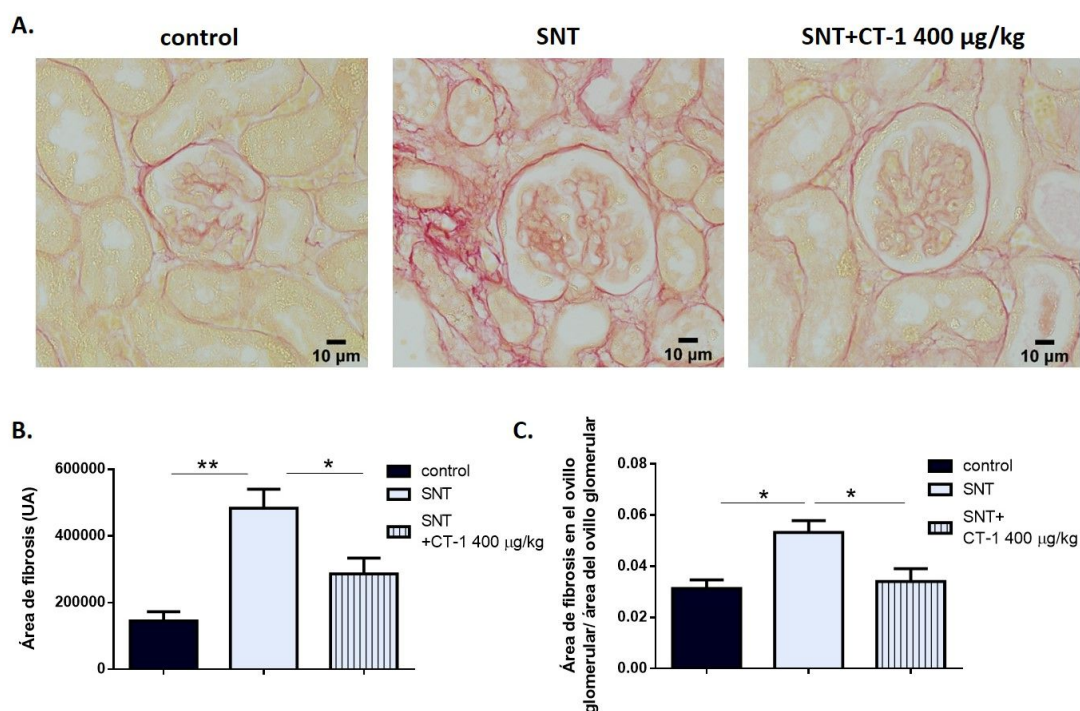


Figura 87. Análisis del grado de fibrosis renal. A. Imágenes representativas de tinción con Rojo Sirio de riñones de ratones controles y 21 días tras la administración de SNT y CT-1 400 μ g/kg. B. Cuantificación del área de fibrosis evaluada mediante la tinción con Rojo Sirio. C. Cociente del área fibrótica dentro del ovillo glomerular/área del ovillo glomerular en 25 glomérulos de cada riñón y se calculó la media. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Control (n=6), SNT (n=9), SNT+CT-1 400 μ g/kg (n=8). Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico, UA: unidades arbitrarias.

Por lo tanto, la administración de CT-1 reduce tanto el grado de glomerulosclerosis como de fibrosis intersticial 21 días tras la administración con SNT.

La administración de SNT produce un aumento en la expresión de colágeno IV en las zonas glomerular y periglomerular; los riñones de ratones tratados con CT-1 21 días tras la administración de SNT presentan una menor expresión de colágeno IV en ambas zonas que los ratones no tratados con CT-1 (figura 88).

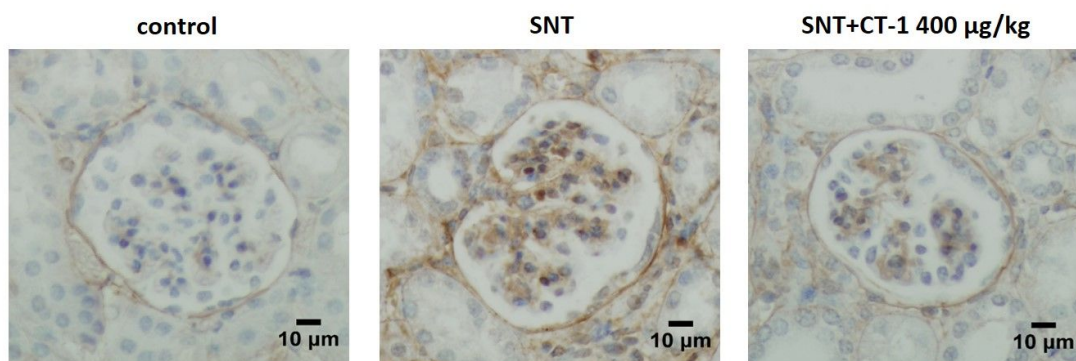


Figura 88. Análisis de la expresión de colágeno IV. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de colágeno IV de los glomérulos de ratones controles y 21 días tras la administración de SNT y CT-1 400 µg/kg. Control (n=6), SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Magnificación original: 400X. CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

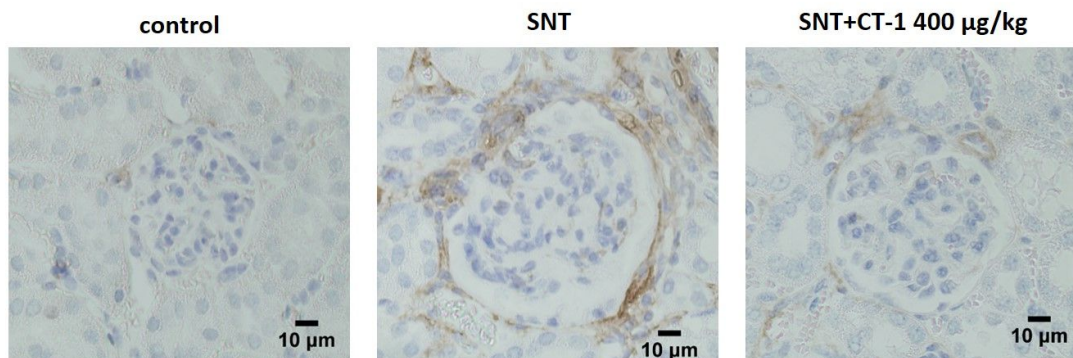


Figura 89. Análisis de la expresión de α-SMA. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de α-SMA de los glomérulos de ratones controles y 21 días tras la administración de SNT y CT-1 400 µg/kg. Control (n=6), SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Magnificación original 400X. α-SMA: actina de músculo liso vascular, CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

También analizamos la expresión de α-SMA mediante inmunohistoquímica. Tal y como se muestra en la figura 89, la administración de SNT aumenta la expresión de α-SMA en la zona periglomerular y este aumento de expresión es menor en los ratones tratados con CT-1 que en

los ratones sin tratar, lo que sugiere que la administración de CT-1 reduce la cantidad de miofibroblastos presentes en la zona periglomerular tras la administración de SNT.

En conjunto, estos resultados nos indican que la administración de CT-1 reduce la fibrosis renal producida por la administración de SNT.

➤ **Efecto del tratamiento con CT-1 en la distribución de podocitos**

Cuantificamos mediante inmunofluorescencia el número de podocitos positivos para WT1 dentro y fuera del ovilleo glomerular tal y como han llevado a cabo otros autores (Vasilopoulou et al, 2016). WT1 se expresa en los podocitos y una disminución en su expresión causa glomerulonefritis crescética y esclerosis mesangial (Guo et al, 2002).

La administración de SNT reduce el número de células WT1+ dentro del ovilleo glomerular y aumenta su número fuera del ovilleo glomerular (figura 90). Así mismo, los animales con glomerulonefritis tratados con CT-1 presentan un mayor número de células WT1+ dentro del ovilleo glomerular y un menor número de células fuera del ovilleo glomerular que los animales no tratados. Sin embargo, no observamos cambios en el número de células WT1+ positivas en el glomérulo entero en los diferentes grupos experimentales (figura 90). Por lo tanto, la administración de SNT redistribuye los podocitos desde el ovilleo glomerular, donde contribuyen a la integridad de la barrera de filtración glomerular, hacia la cápsula de Bowman; ésta redistribución de los podocitos se reduce tras el tratamiento con CT-1.

Todos estos resultados muestran que la administración de CT-1 protege frente a algunos de los procesos implicados en la glomerulonefritis inducida por SNT. Se ha demostrado en un modelo de glomerulonefritis crescética que la depleción de macrófagos reduce la cantidad de miofibroblastos y por tanto la fibrosis renal y mejora la función renal (Duffield et al, 2005). Por tanto, la reducción en el número de macrófagos observada tras la administración de CT-1 podría ser la causa de la disminución en el número de miofibroblastos, disminución en la fibrosis renal y mejora de la función renal. La menor albuminuria observada en los ratones tratados con CT-1 podría también ser debida a que en estos ratones se ha frenado la salida de podocitos hacia la cápsula de Bowman, y por tanto tendría una barrera de filtración glomerular menos alterada que los animales no tratados con CT-1.

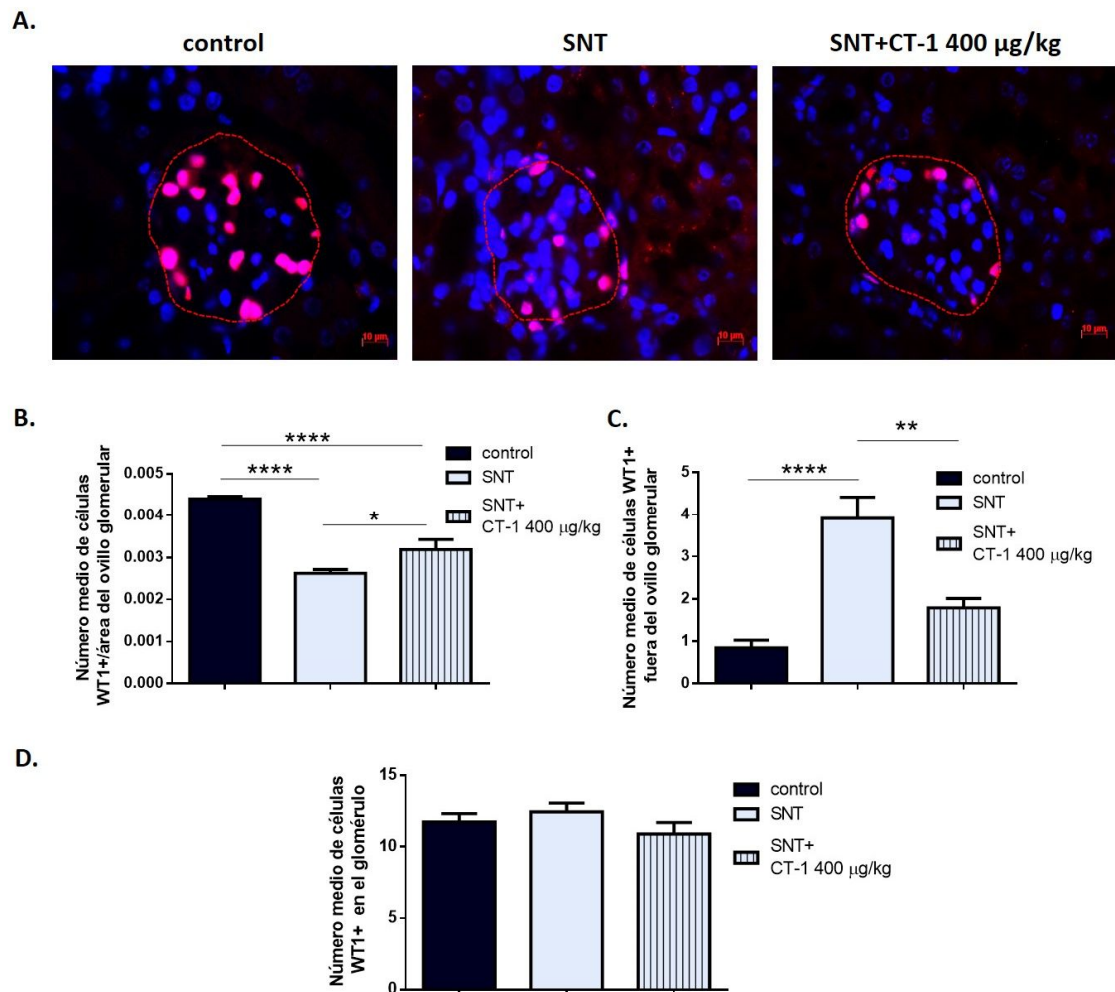


Figura 90. Análisis de la distribución de podocitos. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de WT1 en glomérulos de ratones controles y 21 días tras la administración de SNT y CT-1 400 µg/kg. Se contaron el número de células WT1+ de 25 glomérulos de cada riñón en el ovillo glomerular/área del ovillo glomerular (B), fuera del ovillo glomerular (C) y en todo el glomérulo (D) y se calculó la media. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Control (n=6), SNT (n=9), SNT+CT-1 400 µg/kg (n=8). Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ con respecto a los grupos indicados por las líneas. Magnificación original: 400X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1, SNT: suero nefrotóxico.

7. Papel de la CT-1 en podocitos

7.1. Expresión de CT-1 y sus receptores en podocitos

Para valorar si CT-1 se expresa en podocitos, realizamos una doble tinción de CT-1 y nefrina (Nphs1), componente del diafragma de filtración de los podocitos, en riñones de ratones controles. Como se observa en la figura 91, CT-1 colocaliza con nefrina, lo que indica que los podocitos *in vivo* expresan CT-1.

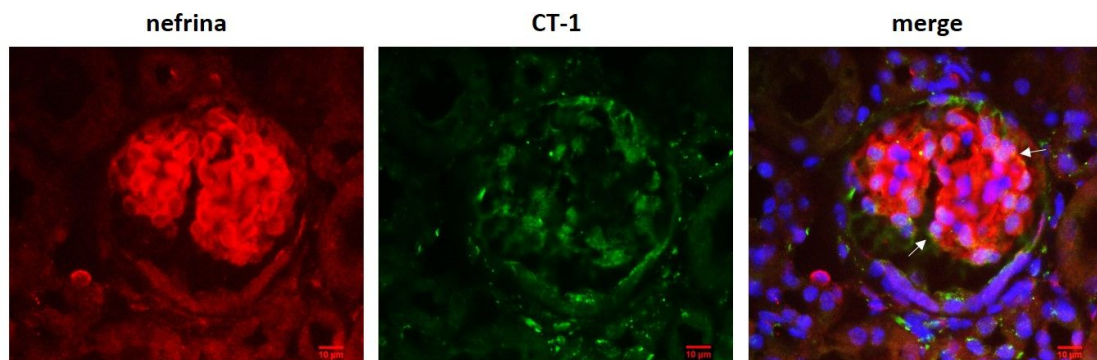


Figura 91. Expresión de CT-1 en glomérulos de ratones controles. Imágenes representativas de la doble tinción mediante inmunofluorescencia de nefrina (nphs1) y CT-1. La imagen mezclada (merge) muestra nefrina en rojo y CT-1 en verde. Las flechas indican algunas áreas en las que se colocalizan ambas tinciones. Magnificación original: 400X; barra= 10 μ m. CT-1: cardiotrofina-1.

Una vez vez verificado que CT-1 se expresa en los podocitos glomerulares *in vivo*, comprobamos si CT-1 y sus receptores GP130 y LIFR se expresan en podocitos glomerulares en cultivo primario de riñón de ratones sanos, así como en podocitos inmortalizados *in vitro*.

➤ **Expresión de CT-1, LIFR y GP130 en cultivos primarios de podocitos glomerulares**

Comprobamos mediante inmunofluorescencia que los podocitos glomerulares en cultivo primario expresan CT-1, LIFR y GP130. La expresión de CT-1, como hemos visto en otros tipos celulares, es citoplasmática; GP130 se localiza en la zona citoplasmática y perinuclear mientras que LIFR se expresa fundamentalmente en la zona perinuclear (figura 92).

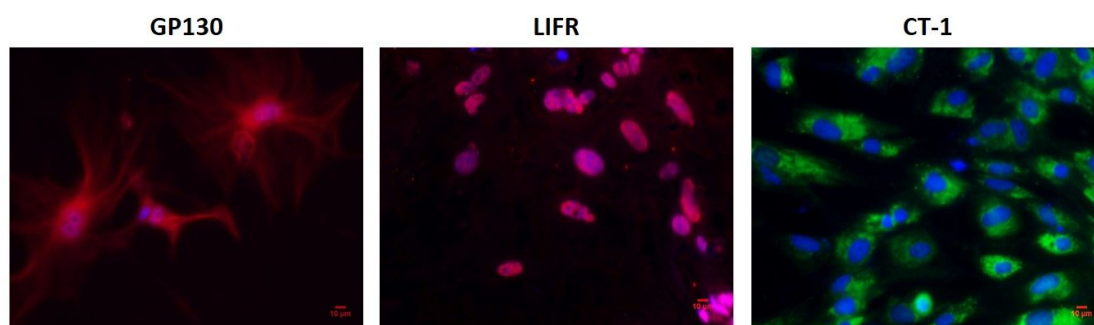


Figura 92. Análisis de la expresión de GP130, LIFR y CT-1 en podocitos glomerulares maduros en cultivo primario. Inmunofluorescencia de GP130, LIFR y CT-1. Magnificación original: 200X; barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF.

➤ **Expresión de CT-1, LIFR y GP130 en podocitos glomerulares inmortalizados**

En los podocitos maduros inmortalizados después de su diferenciación también detectamos mediante inmunofluorescencia la expresión de CT-1, LIFR y GP130. Como se muestra en la figura 93, la expresión y localización es muy similar a la observada en los podocitos glomerulares en cultivo primario: GP130 en la zona citoplasmática y perinuclear, LIFR mayoritariamente en la zona perinuclear y CT-1 fundamentalmente en el citoplasma.

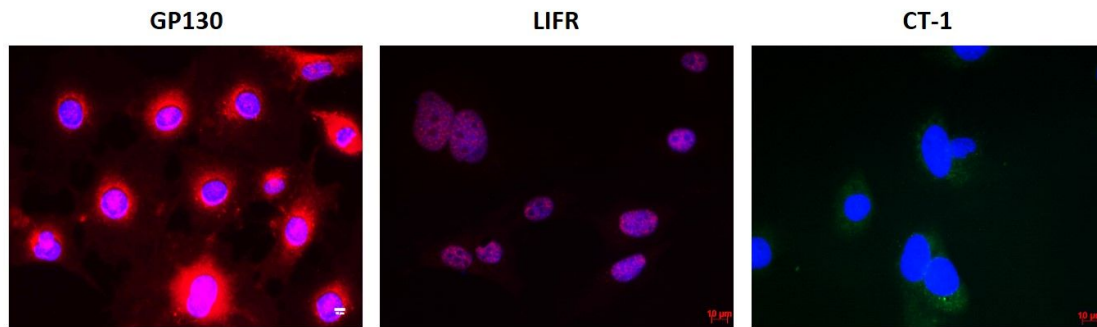


Figura 93. Análisis de la expresión de GP130, LIFR y CT-1 en podocitos inmortalizados. Inmunofluorescencia de GP130 (magnificación original: 200X), LIFR y CT-1 (magnificación original: 400X) en podocitos maduros tras 14 días de diferenciación. Barra= 10 µm. CT-1: cardiotrofina-1, GP130: glicoproteína 130, LIFR: receptor de LIF.

7.2. Efecto de la ausencia de CT-1 en la migración, proliferación celular y morfología del citoesqueleto de los podocitos

Aunque una motilidad basal de los podocitos es necesaria para mantener la filtración glomerular funcional, tanto la hipermotilidad como la hipomotilidad están asociadas con desaparición de los pedicelos y proteinuria (Reiser & Sever, 2013). Además, el citoesqueleto juega un papel importante en el mantenimiento de la función de los pedicelos, por lo que anomalías en su estructura pueden ocasionar también la desaparición de los pedicelos y proteinuria (Welsh & Saleem, 2011).

Utilizamos podocitos inmortalizados y después de su diferenciación en podocitos maduros transfectamos con ARNsi 10 nM contra CT-1, lo que resulta en 70% de disminución de los niveles endógenos de CT-1 (figura 94).

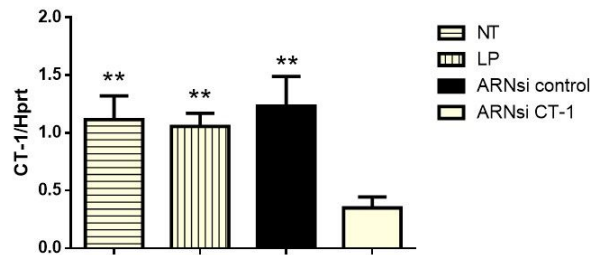


Figura 94. Análisis de la expresión de CT-1. qPCR de la expresión de ARNm de CT-1 en podocitos maduros tras 48 horas de transfección con ARNsi contra CT-1. Se utilizó Hprt como control interno de carga; los datos representan la media \pm error estándar de la media de 5 experimentos. Test estadístico: ANOVA de una vía. ** $p < 0,01$ respecto a ARNsi CT-1. CT-1: cardiotrofina-1, LP: lipofectamina, NT: no transfectado.

➤ Papel de la CT-1 en la migración celular

Después de la transfección con ARNsi contra CT-1 realizamos una herida en la monocapa celular y cuantificamos el número de células que migran dentro de la herida a las 0, 6 y 24 horas.

A las 24 horas el porcentaje de células que migran dentro de la herida es mayor en las células transfectadas con ARNsi contra CT-1 que en las células transfectadas con ARNsi control; además los agentes de transfección no afectan a la migración de los podocitos (figura 95).

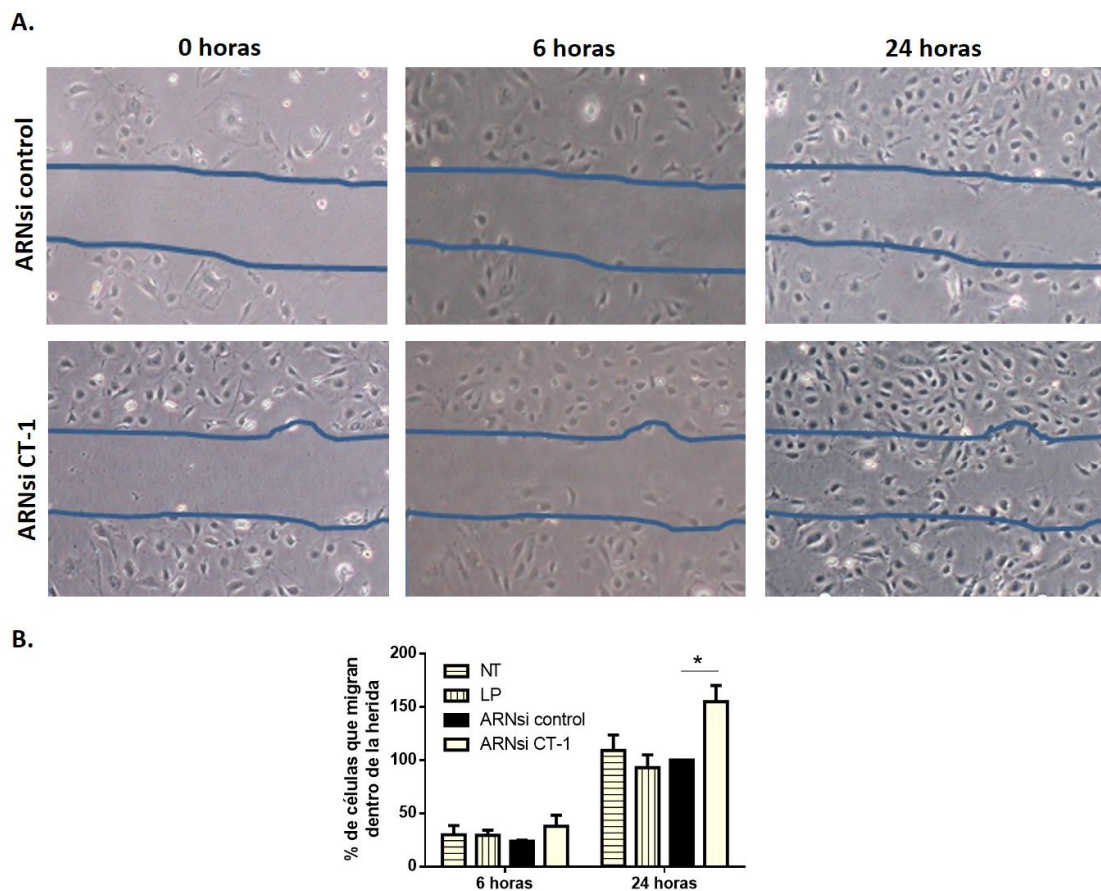


Figura 95. Análisis de la migración celular en el ensayo de cierre de herida. A. Imágenes representativas de las células ARNsi control y ARNsi CT-1 a las 0, 6 y 24 horas postransfección. B. Porcentaje del número de células que migran dentro de la herida en los podocitos maduros no transfectados (NT), sólo expuestos a lipofectamina (LP), transfectados con ARNsi control y transfectados con ARNsi contra CT-1 (ARNsi CT-1). Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 5 experimentos. Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ con respecto al grupo indicado con la línea. Magnificación original: 50X. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ Papel de la CT-1 en la proliferación celular

El silenciamiento por ARNsi de la expresión de CT-1, valorada por el ensayo MTT, no modifica la proliferación de los podocitos (figura 96).

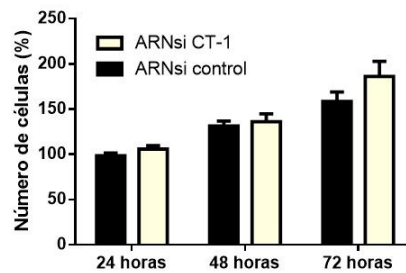


Figura 96. Análisis de la proliferación celular. Porcentaje del número de podocitos maduros inmortalizados viables tras la transfección con ARNsi contra CT-1, medido mediante ensayo de MTT a las 24, 48 y 72 horas post transfección. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 5 experimentos. Test estadístico: T de Student. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ **Papel de la CT-1 en la morfología del citoesqueleto**

Las células transfectadas con ARNsi contra CT-1 presentan una menor área celular, evaluada mediante la inmunofluorescencia de faloidina (figura 97).

Además, clasificamos la organización de los filamentos de actina como una distribución cortical o en fibras citoplasmáticas de estrés (tal como se mostró en la figura 25 de la sección de métodos 8.11.). Observamos que el silenciamiento de la CT-1 endógena aumenta el porcentaje de células con distribución cortical (figura 97).

Con estos datos, podemos sugerir que la CT-1 participa en la regulación de la morfología del citoesqueleto de los podocitos.

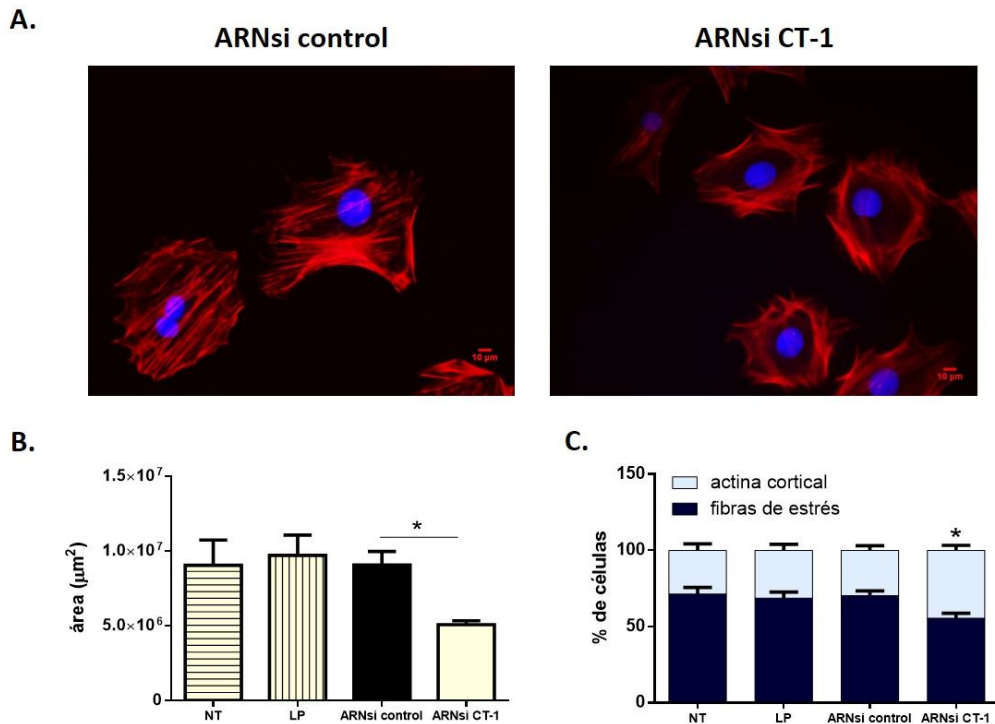


Figura 97. Análisis de la morfología del citoesqueleto. A. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia de faloidina en podocitos maduros inmortalizados tras 48 horas de transfección con ARNsi contra CT-1. B. Cuantificación del área celular mediante el software Fiji. Test estadístico: ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ con respecto al grupo ARNsi control. C. Porcentaje de células con filamentos de actina en disposición cortical o en fibras citoplasmáticas de estrés. Test estadístico: T de Student. * $P < 0,05$ con respecto al grupo ARNsi control. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Magnificación original: 200X; barra= 10 μm . CT-1: cardiotrofina-1, LP: lipofectamina, NT: no transfectado.

➤ Papel de la CT-1 en la activación de RhoA y Cdc42

Evaluamos el efecto del silenciamiento de la CT-1 en la activación de las GTPasas RhoA y Cdc42, que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y la migración celular. Cdc42 regula fundamentalmente la dirección de la migración (Raftopoulou & Hall, 2004).

Observamos una disminución en la actividad de Cdc42 en podocitos transfectados con ARNsi contra CT-1 en comparación con los podocitos controles, mientras que la actividad de RhoA no se encuentra afectada por el silenciamiento de la CT-1 (figura 98).

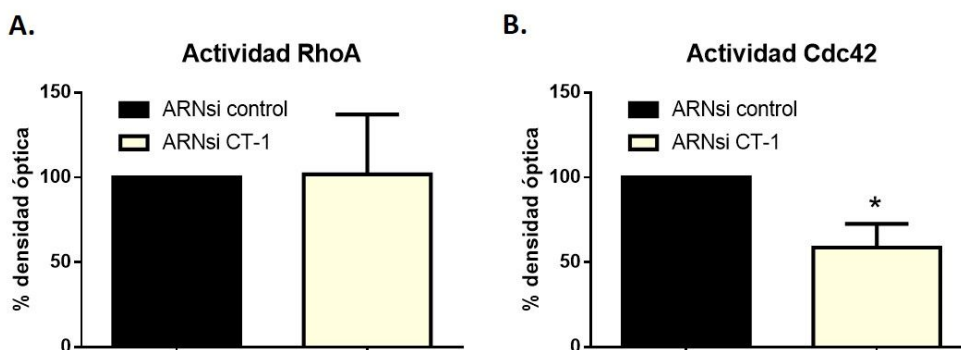


Figura 98. Cuantificación de la actividad de RhoA (A) y Cdc42 (B) en podocitos maduros tras 48 horas de transfección con ARNsi contra CT-1. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto al grupo ARNsi control. CT-1: cardiotrofina-1.

En conjunto, estos resultados muestran que el silenciamiento de la CT-1 endógena en podocitos maduros no afecta a la viabilidad celular, pero aumenta el número de células que migran a las 24 horas de transfección y reduce el tamaño celular y el porcentaje de células con una distribución en fibras citoplasmáticas de estrés, efectos que pueden estar mediados por una disminución en la actividad de Cdc42.

7.3. Efecto de la estimulación con CT-1 en la migración, proliferación celular y morfología del citoesqueleto de los podocitos

➤ Papel de la estimulación con CT-1 en la migración celular

Como se observa en la figura 99, no hay diferencias en el número de células que migran dentro de la herida entre las células controles y las células estimuladas con CT-1 tanto a las 6 como a las 24 h.

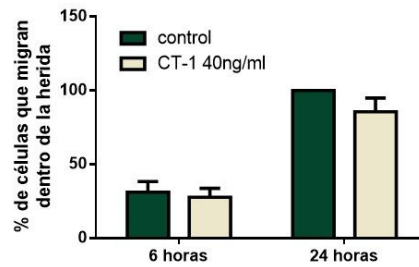


Figura 99. Cuantificación de migración celular en el ensayo de cierre de herida. Porcentaje del número de células que migran dentro de la herida en podocitos maduros estimulados con CT-1 40 ng/mL durante 6 y 24 horas. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ Papel de la estimulación con CT-1 en la proliferación celular

No se observan diferencias en la proliferación de podocitos maduros inmortalizados tras la estimulación con CT-1 40 ng/mL ni a las 24 ni a las 48 horas (figura 100).

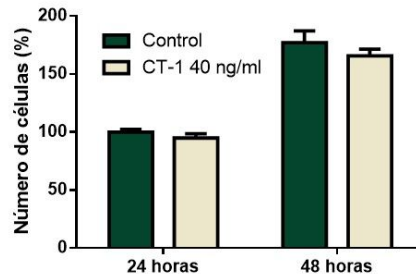


Figura 100. Análisis de la proliferación celular. Porcentaje del número de células viables en podocitos maduros inmortalizados valorado mediante ensayo de MTT tras la estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 24 y 48 horas. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ Papel de la estimulación con CT-1 en la morfología del citoesqueleto

La estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 24 horas en podocitos maduros inmortalizados produce un aumento del área celular (figura 101). Estos resultados son similares al papel hipertrófico de la CT-1 que habíamos observado previamente en las células epiteliales tubulares en cultivo.

También observamos que la estimulación con CT-1 40 ng/mL durante 24 horas no produce cambios significativos en la organización de los filamentos de actina del citoesqueleto de podocitos maduros inmortalizados en estas condiciones experimentales (figura 101C).

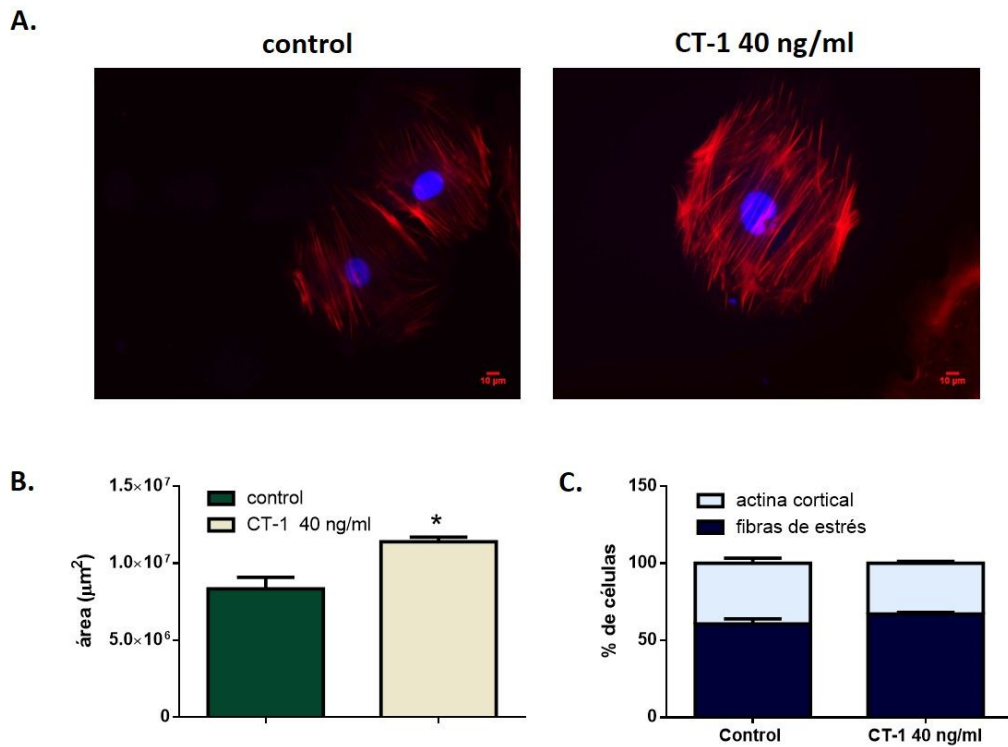


Figura 101. Análisis de la morfología del citoesqueleto. A. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia de faloidina en podocitos maduros inmortalizados tras 24 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. B. Cuantificación del área celular mediante el software Fiji. C. Porcentaje de células con filamentos de actina en disposición cortical o en fibras citoplasmáticas de estrés tras 24 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. * $p < 0,05$ con respecto al control. Magnificación original: 200X; barra= 10 μ m. CT-1: cardiotrofina-1.

➤ **Papel de la estimulación con CT-1 en la actividad de RhoA y Cdc42**

Los podocitos estimulados con CT-1 40 ng/mL presentan una disminución en la actividad de RhoA en comparación con las células controles, mientras que la actividad de Cdc42 no se encuentra afectada (figura 102).

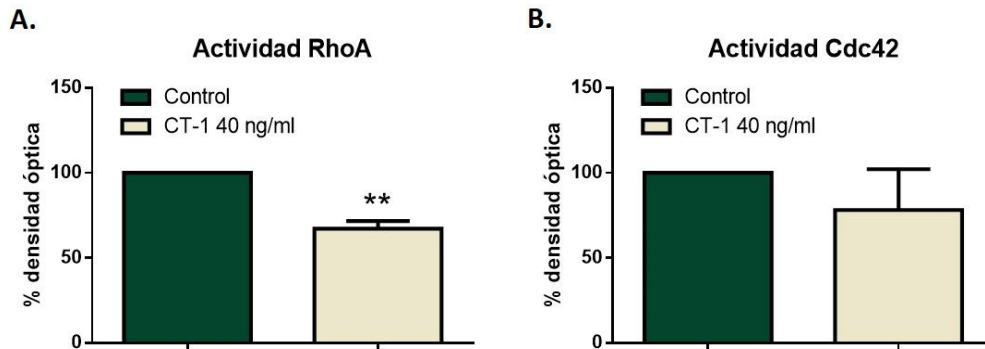


Figura 102. Cuantificación de la actividad de RhoA (A) y Cdc42 (B) en podocitos maduros inmortalizados tras 24 horas de estimulación con CT-1 40 ng/mL. Los datos representan la media ± error estándar de la media de 3 experimentos. Test estadístico: T de Student. **p<0,01 con respecto al control. CT-1: cardiotrofina-1.

En conjunto, estos resultados muestran que en podocitos maduros inmortalizados, la estimulación con CT-1 40 ng/mL promueve aumentos en el tamaño celular, así como una disminución en la actividad de RhoA; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, la CT-1 no ejerce ningún efecto notable en la migración ni en la viabilidad celular.

Discusión

La CT-1 es una citoquina que participa en distintas respuestas biológicas del organismo, incluyendo inflamación, apoptosis, estrés oxidativo y supervivencia celular. Numerosos estudios han mostrado que la administración exógena de CT-1 ejerce efectos citoprotectores en distintos órganos mediante la modulación de dichos mecanismos. Sin embargo, si bien se conoce el efecto antiapoptótico y antiinflamatorio del tratamiento con CT-1 en modelos de daño renal inducidos por toxicidad por contrastes iodados y gentamicina y tras isquemia/reperfusión, hasta la fecha era desconocido el papel de la CT-1 endógena y su administración exógena en la regulación de los distintos procesos implicados en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial y glomerulonefritis así como en la hipertrofia tubular.

Por ello, para la realización de este trabajo se utilizaron ratones CT-1^{-/-} y sus respectivos controles CT-1^{+/+}, permitiéndonos estudiar por una parte el efecto de la CT-1 endógena en los mecanismos involucrados en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial (apoptosis, daño tubular, inflamación y producción de MEC) tanto *in vivo* como *in vitro* y por otra parte el efecto de la administración de CT-1 en la progresión de la fibrosis tubulointersticial, enfermedad glomerular e hipertrofia celular. Inicialmente, hemos comprobado que tanto la CT-1 como sus receptores LIFR y GP130 se expresan en el riñón de ratón.

1. CT-1 en la fibrosis tubulointersticial

La CT-1 endógena modula el daño tubulointersticial, ya que tras la obstrucción ureteral los ratones CT-1^{-/-} presentan un mayor grado de fibrosis tubulointersticial que los ratones control, acompañado de un aumento en la inflamación, daño tubular y apoptosis celular. Además, la deficiencia de CT-1 en miofibroblastos renales promueve un fenotipo profibrótico (aumento de proteínas de MEC, aumento de proliferación y de migración celular).

La fibrosis renal se inicia como un mecanismo en respuesta a un daño inicial. Por razones desconocidas, este proceso inicial de restauración no se regula correctamente y se origina un círculo vicioso patológico de daño tisular y fibrosis tubulointersticial (Lopez-Novoa et al, 2011). El incremento en la expresión de CT-1 tras la obstrucción sugiere que esta citoquina actúa como un mecanismo de defensa endógeno que reduce o atenúa el daño tubular inicial, con un efecto protector frente a la fibrosis renal. Además, la estimulación con TGF-β1 produce un aumento en la expresión de CT-1 en miofibroblastos en cultivo, lo que puede estar relacionado con el aumento de CT-1 observado *in vivo* tras la OUU, ya que la expresión de TGF-β1 aumenta tras la

obstrucción (Prieto et al, 2005). Previamente, nuestro grupo de investigación ha observado que los niveles plasmáticos de CT-1 están correlacionados positivamente con el daño renal temprano (microalbuminuria y cociente de albúmina/creatinina elevado) en pacientes hipertensos y diabéticos (Gamella-Pozuelo et al, 2015).

Diversos estudios han detectado un aumento del estrés oxidativo en los riñones O en los estados iniciales de la enfermedad (Kawada et al, 1999)(Grande et al, 2010b)(Ricardo et al, 1997); además el estrés oxidativo induce la expresión de CT-1 en hepatocitos (Iniguez et al, 2006) y en cardiomiocitos (Sauer et al, 2004)(Hishinuma et al, 1999). Este aumento del estrés oxidativo tras la obstrucción ureteral puede ser una de las causas del aumento de expresión de CT-1 observado en los riñones dañados.

La OUU induce un aumento progresivo de la activación de STAT3 (Kuratsune et al, 2007). En nuestro modelo experimental, los animales deficientes de CT-1 presentan una menor activación de STAT3 que los controles. Diversos autores han relacionado la activación de la vía de JAK/STAT3 con una disminución de fibrosis en corazón, riñón e hígado (Hilfiker-Kleiner et al, 2004; Koike et al, 2014; Plum et al, 2010). Sin embargo, existe cierta controversia acerca del papel fisiopatológico de esta vía ya que la administración de S3I-201 (inhibidor de STAT3) reduce la fibrosis renal *in vivo* (Pang et al, 2010). Estas diferencias pueden deberse a que dependiendo del ligando que active STAT3 y del tiempo de activación, éste puede promover un efecto inflamatorio o antiinflamatorio ; así, si la activación de STAT3 por parte de IL-6 es mantenida en vez de transitoria, se activan genes antiinflamatorios como IL-10 (Murray, 2007). En nuestro estudio observamos un mayor aumento de la activación de STAT3 en los ratones CT-1^{+/+} tanto a los 3 como a los 15 días tras la OUU, por lo que al mantener esta maniobra experimental prolongada en el tiempo sus efectos son básicamente antiinflamatorios. Además, otros autores han demostrado que el aumento de p-STAT3 inducido por OUU atenúa la fibrosis renal mediante la activación de MMP2 (Koike et al, 2014). En nuestro estudio, los ratones CT-1^{+/+} presentan una mayor activación de MMP2 inducida por la activación de la vía de JAK/STAT3 tras 15 días de OUU que los CT1^{-/-}; por lo tanto, la CT-1 parece ejercer su efecto protector frente a la fibrosis tubulointersticial, al menos en parte, por medio de la activación de STAT3.

Por otra parte, hay otros mecanismos por los cuales la ausencia de la CT-1 endógena da lugar a un elevado grado de fibrosis tubulointersticial en nuestro modelo experimental. El efecto beneficioso de esta citoquina puede deberse a su capacidad para regular diferentes procesos

implicados en el desarrollo de la fibrosis renal inducida por OUU, como son la apoptosis celular, estrés oxidativo, infiltración de monocitos y macrófagos e inflamación tubulointersticial (García-Cenador et al, 2013a; Lopez-Yoldi et al, 2015).

La señalización mediada por STAT3 da lugar a una respuesta antiapoptótica a través de la inducción de proteínas como Bcl-2 (Bhattacharya et al, 2005; Catlett-Falcone et al, 1999). Previamente se ha demostrado que tras un daño hepático los ratones CT-1^{-/-} presentan un mayor grado de apoptosis que los ratones CT-1^{+/+} debido en parte a una menor fosforilación de STAT3 (Iniguez et al, 2006; Marques et al, 2007).

Nuestros datos sugieren que el elevado grado de apoptosis que muestran los ratones CT-1^{-/-} tras la OUU puede ser debido a la menor activación de STAT3 observada en las fases iniciales de la enfermedad en estos animales comparada con los ratones CT-1^{+/+}, siendo la vía JAK/STAT3 una de las vías de señalización implicadas en el efecto antiapoptótico de la CT-1. Además, nuestros resultados *in vitro* indican que la estimulación con CT-1 produce la fosforilación de STAT3 en miofibroblastos renales y en células epiteliales tubulares.

Otra de las vías implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía de PI3K/AKT. Nuestros resultados *in vitro* muestran una activación de la ruta PI3K/AKT tras la estimulación con CT-1 en células epiteliales tubulares. La activación de PI3K induce la fosforilación de AKT, que a su vez media la fosforilación de Bad, miembro de la familia de Bcl-2, cuya fosforilación conlleva la liberación de factores antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-x (Kawahara et al, 2000). De este modo, en nuestro modelo experimental la CT-1 podría ejercer en parte sus efectos antiapoptóticos en las células epiteliales tubulares a través de la fosforilación de AKT, como se ha observado previamente en cardiomiocitos (Brar et al, 2001b; Kuwahara et al, 2000) y hepatocitos (Bustos et al, 2003).

La mayor activación de NF-κB observada en los ratones CT-1^{-/-} tras la OUU podría explicar también en parte el papel antiapoptótico de la CT-1. Aunque en cardiomiocitos el efecto antiapoptótico de la CT-1 está asociado con una activación de NF-κB (Craig et al, 2001), en un modelo de daño renal tras isquemia/reperfusión dicho efecto antiapoptótico se relaciona con una disminución de la activación de NF-κB (García-Cenador et al, 2013b); estas diferencias se deben a que dependiendo de las circunstancias, la activación de NF-κB puede inducir tanto la expresión de genes proapoptóticos como antiapoptóticos (Barnes & Karin, 1997).

Por lo tanto, en nuestro modelo experimental, la CT-1 podría estar ejerciendo su efecto antiapoptótico a través de la activación de las vías de señalización JAK/STAT y PI3K/AKT y de la disminución de la activación de NF- κ B.

En cuanto al papel de la CT-1 en la respuesta inflamatoria, nuestros resultados indican una mayor expresión de Cd68, ICAM-1, VCAM-1, COX-2 e iNOS tras la OUU en los animales CT-1^{-/-} que en los animales CT-1^{+/+}, lo que indica que la deficiencia CT-1 causa una mayor respuesta inflamatoria tras la OUU. Además los ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor activación de NF- κ B tras la obstrucción que los ratones CT-1^{+/+}; a la vista de estos resultados, la CT-1 endógena podría participar en la recuperación de la inflamación y la fibrosis renal inducida por la OUU a través de la reducción de la actividad de NF- κ B.

La activación y acumulación de macrófagos favorece la respuesta inflamatoria por su capacidad de liberar citoquinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α ; además contribuyen a la apoptosis y progresión de la fibrosis renal mediante la liberación de distintos mediadores profibróticos como galectina-3, Wnt y CSF-1 (Henderson et al, 2008; Ma et al, 2009). Un estudio reciente ha demostrado que los macrófagos se pueden transdiferenciar a miofibroblastos productores de colágeno durante la progresión de la fibrosis renal en el modelo de OUU (Meng et al, 2016). El aumento de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 tras la OUU media la quimiotaxis y adhesión de los macrófagos (Morrissey & Klahr, 1998b), y contribuye a la apoptosis y a la fibrosis tubulointersticial (Ucero et al, 2014). COX-2 puede acelerar la fibrosis intersticial por su implicación en la expresión de colágeno IV y la proteína de choque térmico 47 (hsp 47) (Honma et al, 2014). La expresión de iNOS aumenta en respuesta a citoquinas proinflamatorias (Lee et al, 2016), y se ha observado también su aumento en el modelo de OUU en ratas (Manucha & Valles, 2008). Además, se ha descrito que el efecto protector de la administración de melatonina (Ozbek et al, 2009) y de losartán (Manucha et al, 2004) frente a la fibrosis tubulointersticial inducida por la OUU está relacionado con una disminución en los niveles de expresión de iNOS.

La regulación de la actividad de la iNOS es principalmente transcripcional; la unión de STAT y NF- κ B a las secuencias del promotor que presenta iNOS son necesarias para la activación de iNOS (Liu et al, 1997). Por lo que es posible que el efecto de la CT-1 sobre iNOS esté mediado por la menor activación de NF- κ B. También se ha estudiado el papel de STAT3 en la inducción de iNOS por lipopolisacáridos (LPS), IL-1 β e INF- γ en células mesangiales. NF- κ B forma un complejo con STAT3 tanto *in vivo* como *in vitro* y la sobreexpresión de STAT3 inhibe la inducción

de iNOS mediada por IL-1 β o por IFN- γ + LPS e inhibe la actividad de un gen promotor dependiente de NF- κ B. Por lo tanto STAT3, por interacción directa con NF- κ B, inhibe su actividad y suprime la inducción indirecta del promotor de iNOS por citoquinas en células mesangiales (Yu et al, 2002).

No hay consenso sobre el efecto de la CT-1 sobre la activación de NF- κ B según los diferentes estudios publicados. Por un lado se ha observado que la administración de CT-1 disminuye la activación de NF- κ B y la expresión de iNOS en un modelo de infección por LPS en el corazón (Takahashi et al, 2005) y en un modelo de isquemia/reperfusión en el riñón (García-Cenador et al, 2013b). Por otro lado, se ha descrito que la CT-1 activa NF- κ B en células endoteliales (Fritzenwanger et al, 2008) y monocitos (Fritzenwanger et al, 2007), así como que los efectos citoprotectores de la CT-1 en cardiomiocitos en cultivo se producen a través de la activación de NF- κ B (Craig et al, 2001). Por lo tanto, parece que, dependiendo de las circunstancias, la CT-1 induce o inhibe la activación de NF- κ B. En nuestro estudio, los animales deficientes de CT-1 presentan una mayor activación de NF- κ B tras la OUU que los animales CT-1^{+/+} y la administración exógena de CT-1 disminuye la activación de NF- κ B.

Es importante destacar la relación de la CT-1 con la activación de NF- κ B ya que este factor de transcripción se activa durante la obstrucción renal y participa de forma relevante en el desarrollo de la enfermedad (Meldrum et al, 2006; Oppenheim et al, 2001). Además, como ya hemos señalado, tras la OUU se produce un aumento del estrés oxidativo en el riñón (Kawada et al, 1999; Klahr, 2001) que juega un papel clave en la activación de NF- κ B, que a su vez induce la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α), quimiocinas (MCP1, RANTES), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), enzimas inducibles (COX-2, iNOS), y por tanto agrava la respuesta inflamatoria generada en el riñón dañado (Blackwell & Christman, 1997; Grande et al, 2010b; Nam, 2006; Sanz et al, 2010).

La administración de CT-1 disminuye el estrés oxidativo producido tras el daño en diferentes órganos, entre los que se incluye el corazón (Lopez et al, 2005), el hígado (Iniguez et al, 2006) y el riñón (García-Cenador et al, 2013b). Se piensa que la CT-1 disminuye el estrés oxidativo a través de la activación de la vía de señalización GP130/STAT3, la cual induce la expresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa que transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Negoro et al, 2001). También se sabe que la IL-6, una citoquina de la

misma familia que la CT-1, protege a las neuronas de la isquemia/reperfusión activando la vía de GP130/STAT3 y aumentando la expresión de la superóxido dismutasa (Jung et al, 2011).

Por ello, sugerimos que el estrés oxidativo y el aumento de TGF- β 1 producido tras la OUU origina un aumento de expresión de CT-1 en el riñón dañado, el cual a su vez promueve una mayor activación de STAT3 en los riñones O de los ratones CT-1^{+/+} que en los ratones CT-1^{-/-}. Esta activación de STAT3 puede iniciar distintos mecanismos protectores frente al daño originado: 1) reduce el estrés oxidativo, lo que causa una disminución en la activación de NF- κ B, que a su vez promueve una menor expresión de ICAM-1, VCAM-1, COX-2 e iNOS, lo cual reduce la infiltración de macrófagos y por tanto la respuesta inflamatoria; 2) promueve la síntesis de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2; 3) promueve la síntesis de la citoquina antiinflamatoria IL-10; 4) induce un aumento de actividad de MMP2 en las fases tardías y la consiguiente degradación de proteínas de MEC. Además, la CT-1 reduce la apoptosis tubular a través de la fosforilación de AKT y gracias a la disminución de la activación de NF- κ B. Por ello, el elevado grado de fibrosis tubulointerstitial observado en los animales CT-1^{-/-} con respecto a los CT-1^{+/+} puede deberse al aumento de la apoptosis tubular, infiltración de macrófagos, inflamación y acumulación de miofibroblastos. Así mismo, en nuestro modelo experimental la CT-1 endógena sólo ejerce su papel protector tras la inducción del daño obstructivo, ya que no encontramos diferencias histológicas entre los riñones NO de los ratones CT-1^{+/+} y CT-1^{-/-}.

Estudios *in vitro* demuestran que la estimulación con CT-1 produce una mayor migración celular en miofibroblastos cardiacos (Freed et al, 2011) y en células endoteliales, migración producida por un aumento de ICAM-1 y MCP1 mediado por NF- κ B (Ichiki et al, 2008). También, se ha relacionado la activación de NF- κ B con un aumento en la migración celular en fibroblastos cardiacos (Hashikata et al, 2015) y en líneas celulares de cáncer escamosos de cabeza y cuello (Tang et al, 2017) y cáncer de pulmón (Zhu et al, 2016).

Nuestros resultados muestran una mayor migración celular en los miofibroblastos renales de ratones CT-1^{-/-} que en los miofibroblastos controles; este aumento en la migración puede deberse a la mayor activación de NF- κ B detectada en estos fibroblastos CT-1^{-/-}.

Varios autores relacionan el efecto protector de la CT-1 frente a diferentes daños tisulares con un aumento de proliferación celular, por ejemplo en fibroblastos cardiacos (Freed et al, 2005) o en hepatocitos, en los que además la estimulación *in vitro* con CT-1 produce un aumento de expresión de pp65 (Yang et al, 2008b). Como ya se ha señalado previamente la

activación de NF- κ B puede inducir la expresión de genes que promueven la proliferación celular (Haussler et al, 2005; Martinka & Bruggeman, 2006). En nuestro estudio, observamos que los miofibroblastos CT-1^{-/-} proliferan más que los CT-1^{+/+} en condiciones basales, lo que puede deberse a la mayor activación de NF- κ B observada en las células deficientes de CT-1. Estos datos apoyan los resultados *in vivo* que muestran que tras la OUU los ratones CT-1^{-/-} presentan una mayor cantidad de miofibroblastos que los ratones CT-1^{+/+}.

Por otra parte, hemos valorado el posible efecto terapéutico o de reversión del daño renal del tratamiento con CT-1. Observamos que el tratamiento con CT-1 reduce notablemente la fibrosis tubulointersticial producida por la OUU. Aunque un estudio previo describe que la exposición crónica a niveles elevados de CT-1 induce fibrosis renal en ratas sanas, este efecto sólo aparece cuando los niveles elevados de CT-1 se administran durante largos periodos de tiempo (Lopez-Andres et al, 2012), pero no cuando esta citoquina se administra durante periodos cortos de tiempo o a dosis bajas (Garcia-Cenador et al, 2013a).

El tratamiento con CT-1 también reduce la apoptosis, el daño tubular y la respuesta inflamatoria inducida por la OUU en nuestro modelo experimental, valorada por la reducción en la expresión de Cd68, IL-1 β , iNOS, VCAM-1, ICAM-1 y COX-2 y una menor activación de NF- κ B.

El efecto antiapoptótico de la CT-1 es conocido (Lopez-Yoldi et al, 2015) (Garcia-Cenador et al, 2013a). Así, protege de la apoptosis en el infarto de miocardio aumentando la expresión de Bcl-2 e inhibiendo p53, Fas y Bax (Ruixing et al, 2004; Ruixing et al, 2007). También reduce la muerte celular neuronal tanto *in vivo* como *in vitro* (Peng et al, 2010) y protege contra la apoptosis inducida en células del pulmón (Zhou et al, 2003). Además en distintos modelos de daño renal se ha observado una disminución de la caspasa-3 activada (Garcia-Cenador et al, 2013b; Quiros et al, 2013).

Se ha descrito el efecto antiinflamatorio de la administración de CT-1 en distintos modelos de daño renal, como la isquemia/reperfusión (Garcia-Cenador et al, 2013b) o nefrotoxicidad por gentamicina (Quiros et al, 2016), gracias a la disminución de la expresión de IL-1 β , TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, iNOS o Cd68 .

Estudios *in vitro* muestran que la expresión de las CAMs está asociada con la activación de la vía de señalización de JAK/STAT (Brar et al, 2001a; Fritzenwanger et al, 2009) , sin embargo son escasos los estudios *in vivo* que relacionan ambos mediadores (Yang et al, 2008a). Como ya

comentamos anteriormente, en la fibrosis tubulointersticial la activación de NF- κ B induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 (Grande et al, 2010b). Por ello, la menor expresión de ICAM-1 y VCAM-1 que hemos observado tras el tratamiento con CT-1 puede deberse a la menor activación de NF- κ B.

Como conclusión, la CT-1 endógena repara el daño temprano inducido por la nefropatía obstructiva activando mecanismos protectores frente al estrés oxidativo, apoptosis tubular, inflamación y fibrosis tubulointersticial. Aunque la CT-1 endógena no parece ser suficiente para compensar todo el daño producido en esta maniobra experimental, la administración exógena de CT-1 favorece esta protección frente al daño inducido por la OUU mediante los mismos mecanismos que la CT-1 endógena. Estos datos sugieren que el tratamiento con CT-1 puede constituir una nueva estrategia para disminuir la fibrosis tubulointersticial inducida por la nefropatía obstructiva.

La figura 103 muestra un esquema de las posibles vías implicadas en el efecto protector que ejerce la CT-1 tras la OUU.

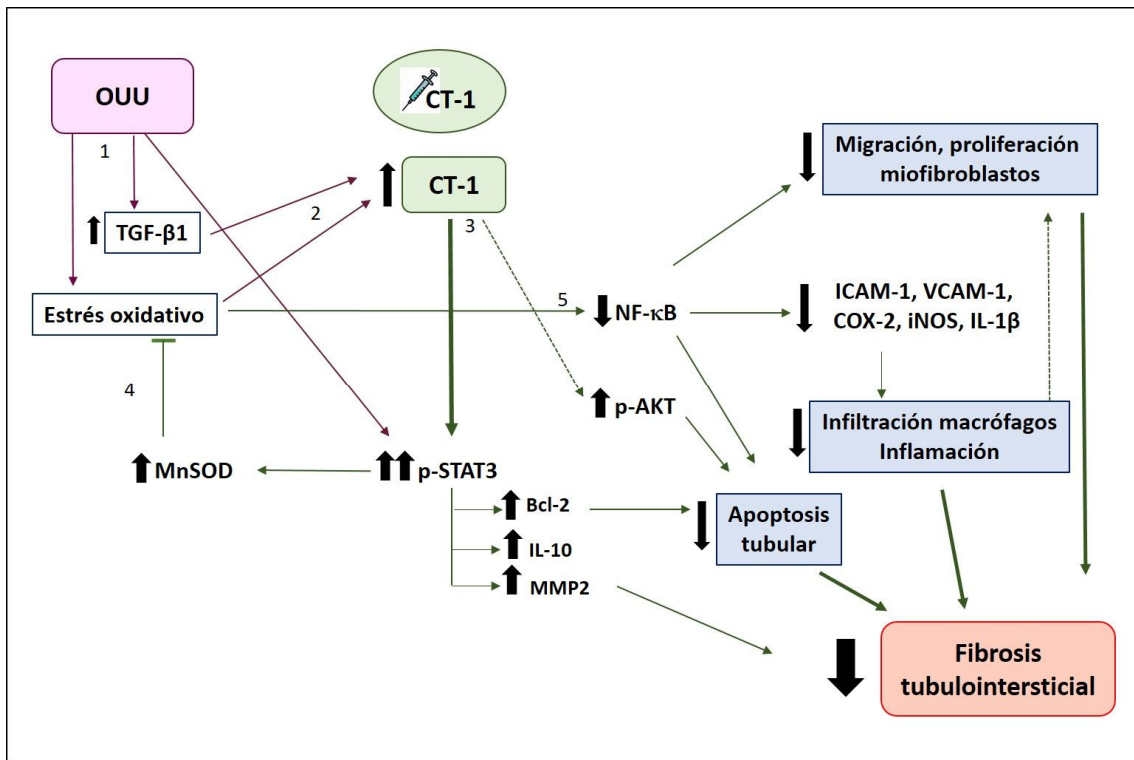


Figura 103. Esquema del papel de la CT-1 en la fibrosis tubulointersticial tras la OUU. 1) La OUU da lugar a un aumento de TGF-β1, estrés oxidativo y p-STAT3. 2) El estrés oxidativo y el aumento de expresión de TGF-β1 originan un aumento de expresión de CT-1. 3) La CT-1 tanto endógena como su administración exógena producen una mayor fosforilación de STAT3 y posiblemente de AKT, lo que origina una disminución de la apoptosis y de la fibrosis tubulointersticial. 4) La mayor fosforilación de STAT3 producida vía CT-1 origina una disminución del estrés oxidativo. 5) La disminución del estrés oxidativo da lugar a una menor activación de NF-κB, originando una menor respuesta inflamatoria y migración y proliferación de miofibroblastos dando lugar a una menor fibrosis tubulointersticial. Las flechas moradas indican los efectos iniciales de la OUU. Las flechas verdes indican los efectos generados por la CT-1. Las flechas con línea de puntos indican posibilidad. Las flechas más gruesas indican mayor efecto. AKT: proteína quinasa B, Bcl-2: célula B leucemia/linfoma 2, COX-2: ciclooxigenasa-2, CT-1: cardiotrofina-1, ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1, IL-10: interleuquina-10, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, MMP2: metaloproteasa-2, MnSOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso, NF-κB: factor de transcripción nuclear-κB, OUU: obstrucción ureteral unilateral, STAT3: transductor de señal y activador de transcripción 3, VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.

2. CT-1 en la hipertrofia de células epiteliales tubulares en cultivo

La hipertrofia renal compensadora es el incremento del tamaño y la función renal en circunstancias en las que hay una reducción del número de nefronas, de manera que se recupera la función renal completa. Esta situación se puede originar por diferentes causas: congénitas, agenesia renal unilateral o nefrectomía unilateral así como en la nefropatía obstructiva, en la que el riñón NO puede mantener o aumentar su función debido a una hipertrofia compensadora funcional y anatómica (Klahr, 2000; Klahr & Morrissey, 2002). Este proceso de hipertrofia se produce sobre todo en los túbulos proximales de la corteza renal aunque también ocurre en los glomérulos (Fong et al, 2014).

El primer efecto descrito de la CT-1 fue su papel hipertrófico en cultivos de cardiomiocitos (Pennica et al, 1995a), aunque los mecanismos implicados en este proceso no están del todo claros. Varios autores han señalado la activación de la vía JAK/STAT (Railson et al, 2002; Tian et al, 2004) como la responsable de dicho efecto hipertrófico mientras que otros implican a la vía de MEK/ERK (Takahashi et al, 2005) o la expresión de GATA 4 (He-nan et al, 2009) o de hsp56 (Jamshidi et al, 2004). Otros estudios sugieren que ERK podría desempeñar un papel indirecto en este proceso por regulación negativa de STAT3 (Tian et al, 2004).

Nuestros resultados indican que tanto la CT-1 endógena como su administración exógena ejercen un efecto hipertrófico en las células epiteliales tubulares en cultivo. También hemos observado que la activación de la vía JAK/STAT3 participa en este efecto hipertrófico de la CT-1, como se ha visto previamente en cardiomiocitos (Railson et al, 2002; Tian et al, 2004). La estimulación con CT-1 también activa AKT, que podría participar en este efecto hipertrófico, aunque se necesitan experimentos adicionales para confirmar su participación. Por otro lado, el menor tamaño observado en las células CT-1^{-/-} en condiciones basales puede ser debido a que la ausencia de CT-1 origine una menor activación de STAT3 y por consiguiente una menor inducción de genes hipertróficos, aunque también se necesitan estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

3. CT-1 en la glomerulonefritis

El modelo de glomerulonefritis inducida por SNT reproduce algunas de las características patológicas de la glomerulonefritis crescéntica humana, asociada con el depósito en los glomérulos de anticuerpos contra la membrana basal glomerular. En este proceso se origina un daño de las células glomerulares intrínsecas, incluyendo los podocitos, infiltración de leucocitos, respuesta inflamatoria, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial, y proliferación extracapilar con formación de semilunas (Pippin et al, 2009; Tam et al, 1999).

En este modelo experimental no observamos un aumento de expresión de CT-1 tras el desarrollo de la enfermedad, sino una disminución en la expresión de CT-1 en las células que se encuentran entre el ovillo glomerular y la cápsula de Bowman. Esta disminución en la expresión de CT-1 se aprecia fundamentalmente alrededor del ovillo glomerular, y es directamente proporcional a la progresión del daño glomerular. Como han apuntado otros autores en este modelo experimental (Tam et al, 1999; Vasilopoulou et al, 2016), a los 21 días aparece un daño glomerular severo (colapso de los capilares, glomeruloesclerosis, adhesión del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman o hiperplasia epitelial) y una disminución de la función renal, mientras que a los 7 días este daño glomerular es intermedio y la función renal está más preservada. Así, la disminución en la expresión de CT-1 que detectamos en la zona glomerular puede ser debida a que en el curso de la enfermedad se produce un daño y pérdida de células glomerulares, lo que origina una menor síntesis de CT-1 por parte de éstas células.

Esta menor expresión de CT-1 en la zona glomerular podría contribuir a una peor progresión de la enfermedad, y por tanto su administración exógena podría reducir la severidad de las alteraciones originadas en la función renal, inflamación y fibrosis tras la administración de SNT. Así, se ha observado en hígado que tras isquemia/reperfusión disminuye la expresión de CT-1 en hepatocitos, y su administración exógena protege frente a ese daño (Iniguez et al, 2006; Marques et al, 2007).

La administración de SNT reduce la función renal (Pippin et al, 2009; Tam et al, 1999). En nuestro estudio lo hemos confirmado observando un aumento de albuminuria, creatinina plasmática y BUN y una disminución en el aclaramiento de creatinina. Nuestros resultados indican que la administración de CT-1 previene la albuminuria inducida por la administración de SNT; otros parámetros de la función renal, como la creatinina plasmática y el BUN, mejoran de

manera leve tras la administración de CT-1. De este modo, la administración de CT-1 también parece ejercer un papel protector frente a las alteraciones producidas en la función renal por este modelo experimental. Este efecto protector parece ser debido a su influencia en la infiltración de macrófagos y la consecuente respuesta inflamatoria.

La acumulación de los macrófagos está relacionada con el desarrollo de la glomerulonefritis crescética; así, la depleción de los macrófagos disminuye el número de semilunas glomerulares, mejora la función renal y disminuye la proteinuria (Duffield et al, 2005). Además, estos autores observaron un daño tubular atenuado asociado con una disminución de la apoptosis tubular y una disminución en la fibrosis intersticial debida a la menor acumulación de miofibroblastos (Duffield et al, 2005). En nuestro estudio hemos observado que la administración de SNT aumenta el número de macrófagos activados en la zona periglomerular, aumento que se reduce notablemente tras la administración de CT-1.

Durante el daño glomerular se produce activación de NF- κ B; estudios en modelos experimentales de glomerulonefritis muestran que la inhibición o bloqueo de la activación de NF- κ B ejerce efectos beneficiosos mediante la reducción de proteinuria, de lesiones glomerulares y de la infiltración de monocitos (Lopez-Franco et al, 2002; Sanz et al, 2010). Por ello, la disminución del número de macrófagos observada en nuestro estudio podría deberse a una menor activación de NF- κ B, aunque necesitaríamos experimentos adicionales para demostrar esta afirmación.

Durante la nefritis nefrotóxica, los podocitos cambian su fenotipo de célula diferenciada a célula migratoria que forma puentes entre el ovillo glomerular y la cápsula de Bowman (Le Hir et al, 2001) y puebla las semilunas glomerulares contribuyendo así a su formación (Moeller et al, 2004; Thorner et al, 2008). En este modelo experimental, el aumento de la infiltración de podocitos hacia la cápsula de Bowman está asociado con un mayor daño glomerular y progresión de la enfermedad (Vasilopoulou et al, 2016). En nuestro estudio hemos observado que la administración de SNT redistribuye los podocitos desde el ovillo glomerular (donde en condiciones normales contribuyen a la integridad de la barrera de filtración glomerular) hacia la cápsula de Bowman, y el tratamiento con CT-1 frena esta redistribución de los podocitos.

El aumento de la migración de podocitos *in vitro* tras el silenciamiento de CT-1 está asociado con una disminución en la distribución de los filamentos de actina en fibras de estrés y una disminución en la actividad de Cdc42. Aunque se ha relacionado la disminución de las fibras

de estrés de los podocitos con un aumento de su motilidad celular (Wang et al, 2012a), otros autores han relacionado este aumento de motilidad con un aumento de las fibras de estrés (Asanuma et al, 2006; Vasilopoulou et al, 2016); con lo cual una alteración en la organización de los filamentos de actina bien sea por un aumento o disminución de sus fibras de estrés está relacionado con un daño glomerular (Kistler et al, 2012; Welsh & Saleem, 2011). Cdc42 regula fundamentalmente la dirección de la migración (Raftopoulou & Hall, 2004), y la activación de Cdc42 puede incrementar la migración de los podocitos (Gee et al, 2013), aunque otros autores no han encontrado diferencias en la activación de Cdc42 en podocitos en los que estaba aumentada la migración (Vasilopoulou et al, 2016). Además, el silenciamiento de Cdc42 en una línea celular de cáncer de mama disminuye la migración, y en otras 2 líneas celulares la aumenta inhibiendo la vía de ERK1/2 (Zuo et al, 2012). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden deberse a que la modulación de la activación de Cdc42 es diferente según el contexto biológico, ya que las Rho GTPasas regulan numerosas señales de transducción relacionadas con el citoesqueleto de actina y con la polaridad celular, transcripción génica, dinámica de los microtubulos y vías de transporte vesicular (Etienne-Manneville & Hall, 2002), y también regulan las MAP quinasas ERK1/2, JNK y p38 de una manera diferente según el tipo celular (Bishop & Hall, 2000) (Zugasti et al, 2001).

La menor cantidad de podocitos que se infiltran hacia la cápsula de Bowman tras el tratamiento con CT-1 favorece la integridad de la barrera de filtración glomerular, con lo cual este tratamiento ayuda a preservar la función renal, y por otro lado reduce la formación de las semilunas glomerulares que evolucionan hacia la fibrosis.

Así, el menor grado de glomerulosclerosis y fibrosis intersticial observado en los ratones tratados con CT-1 tras la administración de SNT puede deberse tanto al menor número de macrófagos activados en el espacio periglomerular, que a su vez promueve una menor acumulación de miofibroblastos activados, como a la menor infiltración de podocitos hacia la cápsula de Bowman que origina una menor formación de semilunas y como consecuencia un menor grado de fibrosis.

Por otro lado, cabe destacar la importancia funcional de RhoA en la función glomerular: la sobreexpresión de RhoA en podocitos induce proteinuria (Wang et al, 2012b; Zhu et al, 2011), mientras que su inhibición reduce el daño renal en modelos experimentales de nefrectomía (Babelova et al, 2013) y de glomerulonefritis crescéntica (Hidaka et al, 2008) *in vivo*. En nuestro

estudio la estimulación con CT-1 reduce la actividad de RhoA en podocitos en cultivo, lo que podría explicar en parte el efecto beneficioso de la administración de CT-1 en el daño renal tras la administración de SNT.

En resumen, la administración de CT-1 disminuye la inflamación periglomerular, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y las alteraciones en la función renal inducidas tras administración de SNT. Este efecto protector de la CT-1 puede deberse a la disminución de la activación de NF- κ B y una menor respuesta inflamatoria, así como por la modulación de la redistribución de los podocitos.

Relevancia de este estudio

Esta tesis doctoral muestra la implicación de la CT-1 en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial y de la glomerulonefritis nefrotóxica. Por un lado, estos resultados facilitan una mayor comprensión de los mecanismos de regulación de la fibrosis renal y glomerulonefritis por parte de la CT-1 tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, los datos sobre el efecto del tratamiento con CT-1 en los modelos *in vivo* pueden abrir un nuevo campo de investigación sobre el posible papel terapéutico de la administración de CT-1 en la ERC tanto de origen tubular como glomerular. La CT-1 podría ser un fármaco potencialmente adecuado para el control del proceso inflamatorio temprano que se origina en el inicio de la fibrosis tubulointersticial y de la glomerulonefritis.

El uso terapéutico de la CT-1 viene facilitado por el hecho de que la agencia de control de fármacos de los Estados Unidos, la FDA (del inglés *US Food and Drug Administration*) la ha declarado fármaco huérfano para la protección del hígado contra el daño por isquemia/reperfusión inherente al trasplante hepático (solicitud de designación 07–2449) y para el tratamiento del fallo hepático agudo (solicitud de designación 11–3507). La Agencia Europea de Medicina, la EMA (del inglés *European Medicine Agency*) también la ha declarado medicamento huérfano para la prevención del daño por isquemia/reperfusión asociado al trasplante de órganos sólidos (EU/3/06/396) y para el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda (EU/3/11/893). Además, en Estados Unidos se ha registrado en clinicaltrials.gov un ensayo clínico (NCT01334697) para determinar la seguridad, tolerancia y farmacocinética de la CT-1 en voluntarios sanos. Todo esto facilitaría el posible uso clínico de la CT-1 para otras aplicaciones, como las enfermedades renales que se han analizado en esta tesis doctoral, y además muestra la relevancia translacional de este estudio.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. La CT-1 ejerce un papel protector frente a la respuesta inflamatoria, apoptosis y fibrosis renal inducida tras la OUU, debido principalmente a la modulación de NF- κ B y STAT3, y a la regulación de la proliferación y migración de miofibroblastos.
2. La CT-1 ejerce su acción hipertrófica en células epiteliales tubulares en cultivo a través de la vía JAK/STAT3.
3. La CT-1 reduce la fibrosis y mejora la función renal en la glomerulonefritis inducida por SNT, disminuyendo la infiltración de macrófagos y modulando la migración y reorganización del citoesqueleto de podocitos.

Conclusions

Based on the results showed in this study, we present the following conclusions:

1. CT-1 exerts a protective effect against the inflammatory response, apoptosis and renal fibrosis induced by UUO, mainly due to NF- κ B and STAT3 modulation and regulation of myofibroblasts proliferation and migration.
2. CT-1 exerts its hypertrophic role in cultured renal tubular epithelial cells through the JAK/STAT3 pathway.
3. CT-1 reduces renal fibrosis and improves renal function after NTS-induced glomerulonephritis, decreasing macrophage infiltration and modulating podocyte cytoskeleton reorganization and migration.

Bibliografía

Aguilar-Melero P, Luque A, Machuca MM, Perez de Obanos MP, Navarrete R, Rodriguez-Garcia IC, Briceno J, Iniguez M, Ruiz J, Prieto J, de la Mata M, Gomez-Villamandos RJ, Muntane J, Lopez-Cillero P (2013) Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant. *The Journal of surgical research* **181**: e83-91

Ardailou R, Chansel D, Chatziantoniou C, Dussaule JC (1999) Mesangial AT1 receptors: expression, signaling, and regulation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10 Suppl 11**: S40-46

Ardura JA, Berruguete R, Ramila D, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P (2008) Parathyroid hormone-related protein interacts with vascular endothelial growth factor to promote fibrogenesis in the obstructed mouse kidney. *American journal of physiology Renal physiology* **295**: F415-425

Asai S, Saito Y, Kuwahara K, Mizuno Y, Yoshimura M, Higashikubo C, Tsuji T, Kishimoto I, Harada M, Hamanaka I, Takahashi N, Yasue H, Nakao K (2000) The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 320-323

Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nature cell biology* **8**: 485-491

Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H (2006) Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1alpha and intracellular reactive oxygen species. *Journal of cell science* **119**: 1043-1052

Avenidaño LH (2008) *Nefrología clínica*: Ed. Médica Panamericana.

Babelova A, Jansen F, Sander K, Lohn M, Schafer L, Fork C, Ruetten H, Plettenburg O, Stark H, Daniel C, Amann K, Pavenstadt H, Jung O, Brandes RP (2013) Activation of Rac-1 and RhoA contributes to podocyte injury in chronic kidney disease. *PLoS one* **8**: e80328

Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* **336**: 1066-1071

artlett CS, Jeansson M, Quaggin SE (2016) Vascular Growth Factors and Glomerular Disease. *Annual review of physiology* **78**: 437-461

Benigni F, Sacco S, Pennica D, Ghezzi P (1996) Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells. *The American journal of pathology* **149**: 1847-1850

Berg K, Jynge P, Bjerve K, Skarra S, Basu S, Wiseth R (2005) Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free radical research* **39**: 629-636

Bessman MJ, Lehman IR, Adler J, Zimmerman SB, Simms ES, Kornberg A (1958) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Iii. The Incorporation of Pyrimidine and Purine Analogues into Deoxyribonucleic Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**: 633-640

- Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR (2005) STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *The Biochemical journal* **392**: 335-344
- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* **348 Pt 2**: 241-255
- Blackwell TS, Christman JW (1997) The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **17**: 3-9
- Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 786-801
- Boor P, Konieczny A, Villa L, Kunter U, van Roeyen CR, LaRochelle WJ, Smithson G, Arrol S, Ostendorf T, Floege J (2007a) PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22**: 1323-1331
- Boor P, Konieczny A, Villa L, Schult AL, Bucher E, Rong S, Kunter U, van Roeyen CR, Polakowski T, Hawlisch H, Hillebrandt S, Lammert F, Eitner F, Floege J, Ostendorf T (2007b) Complement C5 mediates experimental tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**: 1508-1515
- Boor P, Ostendorf T, Floege J (2010) Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nature reviews Nephrology* **6**: 643-656
- Boor P, Sebekova K, Ostendorf T, Floege J (2007c) Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22**: 3391-3407
- Bordet T, Lesbordes JC, Rouhani S, Castelneau-Ptakhine L, Schmalbruch H, Haase G, Kahn A (2001) Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Human molecular genetics* **10**: 1925-1933
- Bottinger EP, Bitzer M (2002) TGF-beta signaling in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**: 2600-2610
- Braden GL, O'Shea MH, Mulhern JG (2005) Tubulointerstitial diseases. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **46**: 560-572
- Brar BK, Stephanou A, Liao Z, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2001a) Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovascular research* **51**: 265-274
- Brar BK, Stephanou A, Pennica D, Latchman DS (2001b) CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways. *Cytokine* **16**: 93-96
- Brown HJ, Lock HR, Sacks SH, Robson MG (2006) TLR2 stimulation of intrinsic renal cells in the induction of immune-mediated glomerulonephritis. *J Immunol* **177**: 1925-1931

Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, Prieto J (2003) Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* **125**: 192-201

Castano D, Larequi E, Belza I, Astudillo AM, Martinez-Anso E, Balsinde J, Argemi J, Aragon T, Moreno-Aliaga MJ, Muntane J, Prieto J, Bustos M (2014) Cardiotrophin-1 eliminates hepatic steatosis in obese mice by mechanisms involving AMPK activation. *Journal of hepatology* **60**: 1017-1025

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**: 105-115

Cogan MG (1980) Medical Staff Conference. Tubulo-interstitial nephropathies--a pathophysiologic approach. *The Western journal of medicine* **132**: 134-140

Couser WG (1998) Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **13 Suppl 1**: 10-15

Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, McDonough PM, Glembotski CC (2000) p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *The Journal of biological chemistry* **275**: 23814-23824

Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC (2001) The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* **276**: 37621-37629

Cunard R, Kelly CJ (2003) 18. Immune-mediated renal disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* **111**: S637-644

Chen CL, Loy A, Cen L, Chan C, Hsieh FC, Cheng G, Wu B, Qualman SJ, Kunisada K, Yamauchi-Takahara K, Lin J (2007) Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in cell growth and survival of human rhabdomyosarcoma and osteosarcoma cells. *BMC cancer* **7**: 111

Chen S, Kasama Y, Lee JS, Jim B, Marin M, Ziyadeh FN (2004) Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor-beta1 in mouse podocytes. *Diabetes* **53**: 2939-2949

Chevalier RL (2006) Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nature clinical practice Nephrology* **2**: 157-168

Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA (2009) Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international* **75**: 1145-1152

de Mast Q, Beutler JJ (2009) The prevalence of atherosclerotic renal artery stenosis in risk groups: a systematic literature review. *Journal of hypertension* **27**: 1333-1340

Dessapt-Baradez C, Woolf AS, White KE, Pan J, Huang JL, Hayward AA, Price KL, Kolatsi-Joannou M, Locatelli M, Diennet M, Webster Z, Smillie SJ, Nair V, Kretzler M, Cohen CD, Long DA, Gnudi L (2014) Targeted glomerular angiotensin-1 therapy for early diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **25**: 33-42

Ding M, Cui S, Li C, Jothy S, Haase V, Steer BM, Marsden PA, Pippin J, Shankland S, Rastaldi MP, Cohen CD, Kretzler M, Quaggin SE (2006) Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nature medicine* **12**: 1081-1087

Docherty NG, Morales AI, Lopez Novoa JM, Perez Barriocanal F (2007) [The transition of epithelial cells to fibromyoblasts. Mechanisms involved and its possible relationship with renal fibrosis]. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **27**: 681-688

Duffield JS (2014) Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **124**: 2299-2306

Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, Bonventre JV, Hughes J (2005) Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *The American journal of pathology* **167**: 1207-1219

Eddy AA (1994) Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **5**: 1273-1287

Eddy AA (2000) Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* **15**: 290-301

Eddy AA, Kim H, Lopez-Guisa J, Oda T, Soloway PD (2000) Interstitial fibrosis in mice with overload proteinuria: deficiency of TIMP-1 is not protective. *Kidney international* **58**: 618-628

Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-874

Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635

Fang JY, Richardson BC (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology* **6**: 322-327

Feng Y, Fratkin JD, LeBlanc MH (2003) Inhibiting caspase-8 after injury reduces hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rat. *European journal of pharmacology* **481**: 169-173

Fischer P, Hilfiker-Kleiner D (2008) Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *British journal of pharmacology* **153 Suppl 1**: S414-427

Floege J, Eitner F, Alpers CE (2008) A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 12-23

Floege J, van Roeyen C, Boor P, Ostendorf T (2007) The role of PDGF-D in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Contributions to nephrology* **157**: 153-158

Fong D, Denton KM, Moritz KM, Evans R, Singh RR (2014) Compensatory responses to nephron deficiency: adaptive or maladaptive? *Nephrology (Carlton)* **19**: 119-128

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**: 8983-8998

Freed DH, Borowiec AM, Angelovska T, Dixon IM (2003a) Induction of protein synthesis in cardiac fibroblasts by cardiotrophin-1: integration of multiple signaling pathways. *Cardiovascular research* **60**: 365-375

Freed DH, Cunnington RH, Dangerfield AL, Sutton JS, Dixon IM (2005) Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. *Cardiovascular research* **65**: 782-792

Freed DH, Chilton L, Li Y, Dangerfield AL, Raizman JE, Rattan SG, Visen N, Hryshko LV, Dixon IM (2011) Role of myosin light chain kinase in cardiotrophin-1-induced cardiac myofibroblast cell migration. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **301**: H514-522

Freed DH, Moon MC, Borowiec AM, Jones SC, Zahradka P, Dixon IM (2003b) Cardiotrophin-1: expression in experimental myocardial infarction and potential role in post-MI wound healing. *Molecular and cellular biochemistry* **254**: 247-256

Fritzenwanger M, Foerster M, Meusel K, Jung C, Figulla HR (2008) Cardiotrophin-1 induces intercellular adhesion molecule-1 expression by nuclear factor kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. *Chinese medical journal* **121**: 2592-2598

Fritzenwanger M, Kuethe F, Haase D, Jandt E, Figulla HR (2006) Cardiotrophin-1 induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* **33**: 46-51

Fritzenwanger M, Meusel K, Foerster M, Kuethe F, Krack A, Figulla HR (2007) Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human monocytes. *Cytokine* **38**: 137-144

Fritzenwanger M, Meusel K, Jung C, Franz M, Wang Z, Foerster M, Figulla HR (2009) Cardiotrophin-1 induces tumor necrosis factor alpha synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Mediators of inflammation* **2009**: 489802

Fuentes-Calvo I, Blazquez-Medela AM, Eleno N, Santos E, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C (2012) H-Ras isoform modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts. *American journal of physiology Cell physiology* **302**: C686-697

Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T, Sugiyama K, Yamanaka Y, Nakajima K, Hirano T (1997) An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* **14**: 751-761

Fukuda A, Sato Y, Iwatsubo S, Komatsu H, Nishiura R, Fukudome K, Yamada K, Hara S, Fujimoto S, Kitamura K (2009) [Minimal change nephrotic syndrome complicated with recurrence of malignant thymoma: an interesting case with remission due to steroid therapy of both nephrotic syndrome and thymoma]. *Nihon Jinzo Gakkai shi* **51**: 130-137

Fukuzawa J, Booz GW, Hunt RA, Shimizu N, Karoor V, Baker KM, Dostal DE (2000) Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3 : an autocrine loop for hypertrophy. *Hypertension* **35**: 1191-1196

Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y, Nagai Y, Koide H (1990) Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. *Clinical nephrology* **34**: 239-246

Funamoto M, Hishinuma S, Fujio Y, Matsuda Y, Kunisada K, Oh H, Negoro S, Tone E, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2000) Isolation and characterization of the murine cardiotrophin-1 gene: expression and norepinephrine-induced transcriptional activation. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**: 1275-1284

Furuichi K, Wada T, Kaneko S, Murphy PM (2008) Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 4021-4028

Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG (2004) Immunoblotting and immunodetection. *Current protocols in molecular biology* **Chapter 10**: Unit 10 18

Gamella-Pozuelo L, Fuentes-Calvo I, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Agudo-Conde C, Fernandez-Martin JL, Cannata-Andia JB, Lopez-Novoa JM, Garcia-Ortiz L, Martinez-Salgado C (2015) Plasma Cardiotrophin-1 as a Marker of Hypertension and Diabetes-Induced Target Organ Damage and Cardiovascular Risk. *Medicine* **94**: e1218

Garcia-Cenador MB, Lopez-Novoa JM, Diez J, Garcia-Criado FJ (2013a) Effects and mechanism of organ protection by cardiotrophin-1. *Current medicinal chemistry* **20**: 246-256

Garcia-Cenador MB, Lorenzo-Gomez MF, Herrero-Payo JJ, Ruiz J, Perez de Obanos MP, Pascual J, Lopez-Novoa JM, Garcia-Criado FJ (2013b) Cardiotrophin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation. *Transplantation* **96**: 1034-1042

Gard AL, Gavin E, Solodushko V, Pennica D (2004) Cardiotrophin-1 in choroid plexus and the cerebrospinal fluid circulatory system. *Neuroscience* **127**: 43-52

Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, Hurd TW, Vega-Warner V, Fang H, Beck BB, Gribouval O, Zhou W, Diaz KA, Natarajan S, Wiggins RC, Lovric S, Chernin G, Schoeb DS, Ovunc B, Frishberg Y, Soliman NA, Fathy HM, Goebel H, Hoefele J, Weber LT, Innis JW, Faul C, Han Z, Washburn J, Antignac C, Levy S, Otto EA, Hildebrandt F (2013) ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *The Journal of clinical investigation* **123**: 3243-3253

Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews Immunology* **8**: 837-848

Gnudi L, Benedetti S, Woolf AS, Long DA (2015) Vascular growth factors play critical roles in kidney glomeruli. *Clin Sci (Lond)* **129**: 1225-1236

Gonzalez A, Lopez B, Martin-Raymondi D, Lozano E, Varo N, Barba J, Serrano M, Diez J (2005) Usefulness of plasma cardiotrophin-1 in assessment of left ventricular hypertrophy regression in hypertensive patients. *Journal of hypertension* **23**: 2297-2304

Grande MT, Fuentes-Calvo I, Arevalo M, Heredia F, Santos E, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Puyol D, Nieto MA, Lopez-Novoa JM (2010a) Deletion of H-Ras decreases renal fibrosis and myofibroblast activation following ureteral obstruction in mice. *Kidney international* **77**: 509-518

Grande MT, Lopez-Novoa JM (2009) Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nature reviews Nephrology* **5**: 319-328

Grande MT, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM (2010b) Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm (Lond)* **7**: 19

Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arevalo M, Rowe RG, Weiss SJ, Lopez-Novoa JM, Nieto MA (2015) Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature medicine* **21**: 989-997

Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, Wright EC, Dalton RN, Zakowski JJ, Miller WG (2012) Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clinical chemistry* **58**: 391-401

Greka A, Mundel P (2012) Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology* **74**: 299-323

Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A (2002) WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human molecular genetics* **11**: 651-659

Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR (2000) Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney international* **58**: 1389-1399

Haberstroh U, Zahner G, Disser M, Thaiss F, Wolf G, Stahl RA (1993) TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture: role of PDGF beta-receptor expression. *The American journal of physiology* **264**: F199-205

Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, Magaribuchi T, Kamitani S, Kuwahara K, Ishikawa M, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Shirakami G, Mori K, Inobe Y, Kishimoto I, Masuda I, Fukuda K, Nakao K (2000) Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **279**: H388-396

Hara A, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S (2006) Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney international* **69**: 1986-1995

Hashikata T, Yamaoka-Tojo M, Namba S, Kitasato L, Kameda R, Murakami M, Niwano H, Shimohama T, Tojo T, Ako J (2015) Rivaroxaban Inhibits Angiotensin II-Induced Activation in Cultured Mouse Cardiac Fibroblasts Through the Modulation of NF-kappaB Pathway. *International heart journal* **56**: 544-550

- Haussler U, von Wichert G, Schmid RM, Keller F, Schneider G (2005) Epidermal growth factor activates nuclear factor-kappaB in human proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* **289**: F808-815
- He-nan Z, Yan W, Miao-na J, Cai-hua Z, Shen L, Yu-jie J (2009) Relation of Cardiotrophin-1 (CT-1) and cardiac transcription factor GATA4 expression in rat's cardiac myocytes hypertrophy and apoptosis. *Pathology, research and practice* **205**: 615-625
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**: 1-20
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T (2008) Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *The American journal of pathology* **172**: 288-298
- Hendry L, John S (2004) Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *European journal of biochemistry* **271**: 4613-4620
- Hidaka T, Suzuki Y, Yamashita M, Shibata T, Tanaka Y, Horikoshi S, Tomino Y (2008) Amelioration of crescentic glomerulonephritis by RhoA kinase inhibitor, Fasudil, through podocyte protection and prevention of leukocyte migration. *The American journal of pathology* **172**: 603-614
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **117**: 3810-3820
- Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, Schmiedl A, Ding Z, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC, Drexler H (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circulation research* **95**: 187-195
- Hishinuma S, Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Yamauchi-Takahara K (1999) Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **264**: 436-440
- Ho DW, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, To JY, Poon RT, Fan ST (2006) Therapeutic potential of cardiotrophin 1 in fulminant hepatic failure: dual roles in antiapoptosis and cell repair. *Arch Surg* **141**: 1077-1084; discussion 1084
- Holdsworth SR, Summers SA (2008) Role of mast cells in progressive renal diseases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 2254-2261
- Honma S, Shinohara M, Takahashi N, Nakamura K, Hamano S, Mitazaki S, Abe S, Yoshida M (2014) Effect of cyclooxygenase (COX)-2 inhibition on mouse renal interstitial fibrosis. *European journal of pharmacology* **740**: 578-583

Huang XR, Tipping PG, Apostolopoulos J, Oettinger C, D'Souza M, Milton G, Holdsworth SR (1997) Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clinical and experimental immunology* **109**: 134-142

Hung HC, Lu FH, Wu HT, Ou HY, Yang YC, Wu JS, Chang CJ (2015) Cardiotrophin-1 is inversely associated with obesity in non-diabetic individuals. *Scientific reports* **5**: 17438

Ichiki T, Jougasaki M, Setoguchi M, Imamura J, Nakashima H, Matsuoka T, Sonoda M, Nakamura K, Minagoe S, Tei C (2008) Cardiotrophin-1 stimulates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **294**: H750-763

Informe de Diálisis y Trasplante 2012. Registros Autonómicos-de Enfermos Renales-ONT. Registro Español de Enfermos Renales Disponible en: www.senefro.org

Iniguez M, Berasain C, Martinez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, Avila MA, Prieto J (2006) Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *The Journal of experimental medicine* **203**: 2809-2815

Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Ruegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan KL (2011) mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2181-2196

Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Imai E (1999) Cytokines and glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **14 Suppl 1**: 30-32

Ishikawa M, Saito Y, Miyamoto Y, Harada M, Kuwahara K, Ogawa E, Nakagawa O, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Masuda I, Hashimoto T, Sakai O, Hosoya T, Nakao K (1999) A heart-specific increase in cardiotrophin-1 gene expression precedes the establishment of ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Journal of hypertension* **17**: 807-816

Ishikawa M, Saito Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Nakagawa O, Harada M, Masuda I, Nakao K (1996) cDNA cloning of rat cardiotrophin-1 (CT-1): augmented expression of CT-1 gene in ventricle of genetically hypertensive rats. *Biochemical and biophysical research communications* **219**: 377-381

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **110**: 341-350

Jamshidi Y, Zourlidou A, Carroll CJ, Sinclair J, Latchman DS (2004) Signal-transduction pathways involved in the hypertrophic effect of hsp56 in neonatal cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**: 381-392

Janjua S, Lawrence KM, Ng LL, Latchman DS (2003) The cardioprotective agent urocortin induces expression of CT-1. *Cardiovascular toxicology* **3**: 255-262

- Jiang ZS, Jeyaraman M, Wen GB, Fandrich RR, Dixon IM, Cattini PA, Kardami E (2007) High- but not low-molecular weight FGF-2 causes cardiac hypertrophy in vivo; possible involvement of cardiotrophin-1. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**: 222-233
- Jin H, Yang R, Keller GA, Ryan A, Ko A, Finkle D, Swanson TA, Li W, Pennica D, Wood WI, Paoni NF (1996) In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine* **8**: 920-926
- Jin H, Yang R, Ko A, Pennica D, Wood WI, Paoni NF (1998) Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine* **10**: 19-25
- John R, Nelson PJ (2007) Dendritic cells in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**: 2628-2635
- Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Holdsworth SR, Kitching AR (2009) IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **24**: 3024-3032
- Jougasaki M, Larsen AM, Cataliotti A, Christiansen DC, Burnett JC, Jr. (2002) Cardiotrophin-1 stimulates endothelin-1 via gp130 in vascular endothelial cells. *Peptides* **23**: 1441-1447
- Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU (1975) New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clinical chemistry* **21**: 1136-1140
- Jung JE, Kim GS, Chan PH (2011) Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke. *Stroke* **42**: 3574-3579
- Kaissling B, Le Hir M (2008) The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochemistry and cell biology* **130**: 247-262
- Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, Park AS, Tao J, Sharma K, Pullman J, Bottinger EP, Goldberg IJ, Susztak K (2015) Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nature medicine* **21**: 37-46
- Kang YS, Li Y, Dai C, Kiss LP, Wu C, Liu Y (2010) Inhibition of integrin-linked kinase blocks podocyte epithelial-mesenchymal transition and ameliorates proteinuria. *Kidney international* **78**: 363-373
- Kang YS, Park YG, Kim BK, Han SY, Jee YH, Han KH, Lee MH, Song HK, Cha DR, Kang SW, Han DS (2006) Angiotensin II stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor through the p38 mitogen activated protein kinase pathway in cultured mouse podocytes. *Journal of molecular endocrinology* **36**: 377-388
- Kato T, Mizuno S, Nakamura T (2011) Preservations of nephrin and synaptopodin by recombinant hepatocyte growth factor in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. *Nephrology (Carlton)* **16**: 310-318

Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M (1999) Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* **56**: 1004-1013

Kelly CJ (1999) Cellular immunity and the tubulointerstitium. *Seminars in nephrology* **19**: 182-187

Khan SB, Cook HT, Bhangal G, Smith J, Tam FW, Pusey CD (2005) Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney international* **67**: 1812-1820

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**: 1243-1254

Kistler AD, Altintas MM, Reiser J (2012) Podocyte GTPases regulate kidney filter dynamics. *Kidney international* **81**: 1053-1055

Kitta K, Day RM, Kim Y, Torregroza I, Evans T, Suzuki YJ (2003) Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4705-4712

Klahr S (2000) Obstructive nephropathy. *Intern Med* **39**: 355-361

Klahr S (2001) Urinary tract obstruction. *Seminars in nephrology* **21**: 133-145

Klahr S, Morrissey J (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *American journal of physiology Renal physiology* **283**: F861-875

Koesters R, Kaissling B, Lehir M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hahnel B, Hosser H, Grone HJ, Kriz W (2010) Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *The American journal of pathology* **177**: 632-643

Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M, Fukami K, Yoshimura A, Okuda S (2014) Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Clin Immunol* **150**: 78-87

Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, Kiribayashi K, Yokoyama Y, Arakawa T, Yorioka N, Kohno N (2007) Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Nephrology (Carlton)* **12**: 565-571

Kurien BT, Everds NE, Scofield RH (2004) Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory animals* **38**: 333-361

Kurogi Y (2003) Mesangial cell proliferation inhibitors for the treatment of proliferative glomerular disease. *Medicinal research reviews* **23**: 15-31

Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ (2013) The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews Immunology* **13**: 738-753

- Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Nakao K (2000) Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**: 1385-1394
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Latanich CA, Toledo-Pereyra LH (2009) Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **22**: 301-315
- Latchman DS (1999) Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *International journal of experimental pathology* **80**: 189-196
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA (2001) Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nature medicine* **7**: 1291-1297
- Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hahnel B, Hosser H, Kriz W (2001) Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **12**: 2060-2071
- LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature medicine* **19**: 1047-1053
- Lee J, Bae EH, Ma SK, Kim SW (2016) Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam medical journal* **52**: 81-90
- Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, Myers BD (2002) Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney international* **61**: 1475-1485
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G (2003) National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine* **139**: 137-147
- Li BX, Tang YT, Wang W, Xie YY, Wang NS, Yuan QJ, Zhang FF, Peng ZZ, Hu GY, Tao LJ (2011) Fluorofenidone attenuates renal interstitial fibrosis in the rat model of obstructive nephropathy. *Molecular and cellular biochemistry* **354**: 263-273
- Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *The American journal of pathology* **172**: 299-308
- Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2002) Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovascular research* **53**: 902-910
- Liu B, Preisig PA (2002) Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney international* **62**: 1650-1658

- Liu SF, Ye X, Malik AB (1997) In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* **159**: 3976-3983
- Liu Y (2004) Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *American journal of physiology Renal physiology* **287**: F7-16
- Liu Y (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology* **7**: 684-696
- Long DA, Kolatsi-Joannou M, Price KL, Dessapt-Baradez C, Huang JL, Papakrivopoulou E, Hubank M, Korstanje R, Gnudi L, Woolf AS (2013) Albuminuria is associated with too few glomeruli and too much testosterone. *Kidney international* **83**: 1118-1129
- Lopez-Andres N, Rousseau A, Akhtar R, Calvier L, Inigo C, Labat C, Zhao X, Cruickshank K, Diez J, Zannad F, Lacolley P, Rossignol P (2012) Cardiotrophin 1 is involved in cardiac, vascular, and renal fibrosis and dysfunction. *Hypertension* **60**: 563-573
- Lopez-Diez EC, Winder CL, Ashton L, Currie F, Goodacre R (2005) Monitoring the mode of action of antibiotics using Raman spectroscopy: investigating subinhibitory effects of amikacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical chemistry* **77**: 2901-2906
- Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, Blanco J, Hernandez-Vargas P, Yo Y, Kopp J, Egido J, Gomez-Guerrero C (2002) Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *The American journal of pathology* **161**: 1497-1505
- Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM (2012) Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and tissue research* **347**: 141-154
- Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Hernandez FJ (2010) Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics* **128**: 61-81
- Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Pena AB, Ortiz A, Martinez-Salgado C, Lopez Hernandez FJ (2011) Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *Journal of translational medicine* **9**: 13
- Lopez-Yoldi M, Fernandez-Galilea M, Laiglesia LM, Larequi E, Prieto J, Martinez JA, Bustos M, Moreno-Aliaga MJ (2014) Cardiotrophin-1 stimulates lipolysis through the regulation of main adipose tissue lipases. *Journal of lipid research* **55**: 2634-2643
- Lopez-Yoldi M, Marcos-Gomez B, Romero-Lozano MA, Sainz N, Prieto J, Martinez JA, Bustos M, Moreno-Aliaga MJ (2016) Cardiotrophin-1 Regulates Adipokine Production in 3T3-L1 Adipocytes and Adipose Tissue from Obese Mice. *Journal of cellular physiology*
- Lopez-Yoldi M, Moreno-Aliaga MJ, Bustos M (2015) Cardiotrophin-1: A multifaceted cytokine. *Cytokine & growth factor reviews* **26**: 523-532

- Lopez N, Diez J, Fortuno MA (2005) Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine* **30**: 282-292
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**: 265-275
- Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, Scheller J, Mittrucker HW, Rose-John S, Stahl RA, Panzer U, Steinmetz OM (2015) Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **26**: 1597-1607
- Ma FY, Liu J, Kitching AR, Manthey CL, Nikolic-Paterson DJ (2009) Targeting renal macrophage accumulation via c-fms kinase reduces tubular apoptosis but fails to modify progressive fibrosis in the obstructed rat kidney. *American journal of physiology Renal physiology* **296**: F177-185
- Ma H, Togawa A, Soda K, Zhang J, Lee S, Ma M, Yu Z, Ardito T, Czyzyk J, Diggs L, Joly D, Hatakeyama S, Kawahara E, Holzman L, Guan JL, Ishibe S (2010) Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**: 1145-1156
- Macconi D, Sangalli F, Bonomelli M, Conti S, Condorelli L, Gagliardini E, Remuzzi G, Remuzzi A (2009) Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ACE inhibition. *The American journal of pathology* **174**: 797-807
- Manson SR, Niederhoff RA, Hruska KA, Austin PF (2011) The BMP-7-Smad1/5/8 pathway promotes kidney repair after obstruction induced renal injury. *The Journal of urology* **185**: 2523-2530
- Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Valles P (2004) Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney international* **65**: 2091-2107
- Manucha W, Valles PG (2008) Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric oxide : biology and chemistry* **18**: 204-215
- Marques JM, Belza I, Holtmann B, Pennica D, Prieto J, Bustos M (2007) Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology* **45**: 639-648
- Martinka S, Bruggeman LA (2006) Persistent NF-kappaB activation in renal epithelial cells in a mouse model of HIV-associated nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology* **290**: F657-665
- Mathieson PW (2011) The podocyte as a target for therapies--new and old. *Nature reviews Nephrology* **8**: 52-56
- Matsui F, Rhee A, Hile KL, Zhang H, Meldrum KK (2013) IL-18 induces profibrotic renal tubular cell injury via STAT3 activation. *American journal of physiology Renal physiology* **305**: F1014-1021

Mauer J, Denson JL, Bruning JC (2015) Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in immunology* **36**: 92-101

May CJ, Saleem M, Welsh GI (2014) Podocyte dedifferentiation: a specialized process for a specialized cell. *Frontiers in endocrinology* **5**: 148

Meldrum KK, Metcalfe P, Leslie JA, Misseri R, Hile KL, Meldrum DR (2006) TNF-alpha neutralization decreases nuclear factor-kappaB activation and apoptosis during renal obstruction. *The Journal of surgical research* **131**: 182-188

Meng XM, Chung AC, Lan HY (2013) Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)* **124**: 243-254

Meng XM, Huang XR, Chung AC, Qin W, Shao X, Igarashi P, Ju W, Bottinger EP, Lan HY (2010) Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**: 1477-1487

Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chen HY, Zhong X, Chung AC, Lan HY (2012a) Diverse roles of TGF-beta receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *The Journal of pathology* **227**: 175-188

Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chung AC, Qin W, Chen HY, Lan HY (2012b) Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney international* **81**: 266-279

Meng XM, Wang S, Huang XR, Yang C, Xiao J, Zhang Y, To KF, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2016) Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis. *Cell death & disease* **7**: e2495

Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (2000) Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *The Journal of cell biology* **148**: 325-332

Misaki T, Yamamoto T, Suzuki S, Fukasawa H, Togawa A, Ohashi N, Suzuki H, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A (2009) Decrease in tumor necrosis factor-alpha receptor-associated death domain results from ubiquitin-dependent degradation in obstructive renal injury in rats. *The American journal of pathology* **175**: 74-83

Mitsumoto H, Klinkosz B, Pioro EP, Tsuzaka K, Ishiyama T, O'Leary RM, Pennica D (2001) Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease. *Muscle & nerve* **24**: 769-777

Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, Le Hir M, Wiggins R, Kriz W, Holzman LB (2004) Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**: 61-67

Molitoris BA (2014) Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *The Journal of clinical investigation* **124**: 2355-2363

- Moon JA, Kim HT, Cho IS, Sheen YY, Kim DK (2006) IN-1130, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney international* **70**: 1234-1243
- Moreno-Aliaga MJ, Perez-Echarri N, Marcos-Gomez B, Larequi E, Gil-Bea FJ, Viollet B, Gimenez I, Martinez JA, Prieto J, Bustos M (2011) Cardiotrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism. *Cell metabolism* **14**: 242-253
- Morris E, Chrobak I, Bujor A, Hant F, Mummery C, Ten Dijke P, Trojanowska M (2011) Endoglin promotes TGF-beta/Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *Journal of cellular physiology* **226**: 3340-3348
- Morrissey J, Klahr S (1998a) Transcription factor NF-kappaB regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction. *Seminars in nephrology* **18**: 603-611
- Morrissey JJ, Klahr S (1997) Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney international* **52**: 926-933
- Morrissey JJ, Klahr S (1998b) Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis. *The American journal of physiology* **274**: F580-586
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**: 55-63
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273
- Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W (1997a) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *The Journal of cell biology* **139**: 193-204
- Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R (1997b) Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Experimental cell research* **236**: 248-258
- Munoz-Felix JM, Gonzalez-Nunez M, Lopez-Novoa JM (2013) ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine & growth factor reviews* **24**: 523-537
- Munoz-Felix JM, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C (2014a) Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney international* **85**: 319-332
- Munoz-Felix JM, Perretta-Tejedor N, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C (2014b) ALK1 heterozygosity increases extracellular matrix protein expression, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* **1843**: 1111-1122

Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**: 2623-2629

Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2207-2211

Nam NH (2006) Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry* **6**: 945-951

Natal C, Fortuno MA, Restituto P, Bazan A, Colina I, Diez J, Varo N (2008) Cardiotrophin-1 is expressed in adipose tissue and upregulated in the metabolic syndrome. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **294**: E52-60

Nath KA (1992) Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **20**: 1-17

Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2001) Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* **104**: 979-981

Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2000) Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovascular research* **47**: 797-805

Nitta K, Uchida K, Kimata N, Honda K, Horita S, Hayashi T, Ishizuka T, Kobayashi H, Kawashima A, Yumura W, Nihei H (1999) Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in human crescentic glomerulonephritis. *Clinical nephrology* **52**: 76-82

Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA (2017) Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo* **31**: 1-22

Nomura N, Asano M, Saito T, Sasaki S, Suzuki H, Manabe T, Mishima A (2003) Cardiotrophin-1 is a prophylactic against the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *The Annals of thoracic surgery* **76**: 237-243

Obeidat M, Ballermann BJ (2012) Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. *Experimental cell research* **318**: 964-972

Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA, Molkenin JD (2006) Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation research* **98**: 837-845

Olin JW (2002) Atherosclerotic renal artery disease. *Cardiology clinics* **20**: 547-562, vi

- Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, Holtmann B, Gotz R, Pennica D, Sendtner M (2001) Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 1283-1291
- Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J (2005) STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovascular research* **65**: 428-435
- Ostendorf T, Rong S, Boor P, Wiedemann S, Kunter U, Haubold U, van Roeyen CR, Eitner F, Kawachi H, Starling G, Alvarez E, Smithson G, Floege J (2006) Antagonism of PDGF-D by human antibody CR002 prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**: 1054-1062
- Ozbek E, Ilbey YO, Ozbek M, Simsek A, Cekmen M, Somay A (2009) Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF- κ B expression. *Journal of endourology* **23**: 1165-1173
- Pagalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW (1997) Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *The Journal of clinical investigation* **99**: 342-348
- Pang M, Ma L, Gong R, Tolbert E, Mao H, Ponnusamy M, Chin YE, Yan H, Dworkin LD, Zhuang S (2010) A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney international* **78**: 257-268
- Pecoits-Filho R, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P (2003) Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **18**: 1042-1045
- Peng H, Sola A, Moore J, Wen T (2010) Caspase inhibition by cardiotrophin-1 prevents neuronal death in vivo and in vitro. *Journal of neuroscience research* **88**: 1041-1051
- Pennica D, Arce V, Swanson TA, Vejsada R, Pollock RA, Armanini M, Dudley K, Phillips HS, Rosenthal A, Kato AC, Henderson CE (1996a) Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* **17**: 63-74
- Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, et al. (1995a) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1142-1146
- Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI (1995b) Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *The Journal of biological chemistry* **270**: 10915-10922

Pennica D, Swanson TA, Shaw KJ, Kuang WJ, Gray CL, Beatty BG, Wood WI (1996b) Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* **8**: 183-189

Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996c) Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine & growth factor reviews* **7**: 81-91

Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T, Shankland SJ (2009) Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *American journal of physiology Renal physiology* **296**: F213-229

Plum W, Tschaharganeh DF, Kroy DC, Corsten E, Erschfeld S, Dierssen U, Wasmuth H, Trautwein C, Streetz KL (2010) Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis. *The American journal of pathology* **176**: 2236-2246

Prieto M, Rodriguez-Pena AB, Duwel A, Rivas JV, Docherty N, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Vary CP, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Eleno N (2005) Temporal changes in renal endoglin and TGF-beta1 expression following ureteral obstruction in rats. *Journal of physiology and biochemistry* **61**: 457-467

Pulido EJ, Shames BD, Pennica D, O'Leary R M, Bensard DD, Cain BS, McIntyre RC, Jr. (1999) Cardiotrophin-1 attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *The Journal of surgical research* **84**: 240-246

Quiros Y, Blanco-Gozalo V, Sanchez-Gallego JI, Lopez-Hernandez FJ, Ruiz J, Perez de Obanos MP, Lopez-Novoa JM (2016) Cardiotrophin-1 therapy prevents gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological research* **107**: 137-146

Quiros Y, Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Morales AI, Lopez-Novoa JM (2013) Cardiotrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **132**: 493-501

Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology* **265**: 23-32

Railson J, Lawrence K, Stephanou A, Brar B, Pennica D, Latchman D (2000) Cardiotrophin-1 reduces stress-induced heat shock protein production in cardiac myocytes. *Cytokine* **12**: 1741-1744

Railson JE, Liao Z, Brar BK, Buddle JC, Pennica D, Stephanou A, Latchman DS (2002) Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathways in cardiac myocytes. *Cytokine* **17**: 243-253

Ransom RF, Lam NG, Hallett MA, Atkinson SJ, Smoyer WE (2005) Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney international* **68**: 2473-2483

- Reiser J, Sever S (2013) Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annual review of medicine* **64**: 357-366
- Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A (2006) Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *The Journal of clinical investigation* **116**: 288-296
- Ricardo SD, Ding G, Eufemio M, Diamond JR (1997) Antioxidant expression in experimental hydronephrosis: role of mechanical stretch and growth factors. *The American journal of physiology* **272**: F789-798
- Rihal CS, Textor SC, Breen JF, McKusick MA, Grill DE, Hallett JW, Holmes DR, Jr. (2002) Incidental renal artery stenosis among a prospective cohort of hypertensive patients undergoing coronary angiography. *Mayo Clinic proceedings* **77**: 309-316
- Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouplard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H (1997) Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *The Journal of biological chemistry* **272**: 4855-4863
- Rodriguez-Pena A, Eleno N, Duwell A, Arevalo M, Perez-Barriocanal F, Flores O, Docherty N, Bernabeu C, Letarte M, Lopez-Novoa JM (2002) Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension* **40**: 713-720
- Rodriguez-Pena A, Prieto M, Duwel A, Rivas JV, Eleno N, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Smith JD, Vary CP, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2001) Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **16 Suppl 1**: 34-39
- Rodriguez-Pena AB, Grande MT, Eleno N, Arevalo M, Guerrero C, Santos E, Lopez-Novoa JM (2008) Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* **74**: 196-209
- Ruixing Y, Dezhai Y, Jiaquan L (2004) Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction. *The journal of medical investigation : JMI* **51**: 29-37
- Ruixing Y, Jinzhen W, Dezhai Y, Jiaquan L (2007) Cardioprotective role of cardiotrophin-1 gene transfer in a murine model of myocardial infarction. *Growth Factors* **25**: 286-294
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, Egido J (2003) Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney international Supplement*: S21-26
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J (2006) Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **21**: 16-20

Ruperez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J (2003) Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *The American journal of pathology* **163**: 1937-1947

Sabeh F, Li XY, Saunders TL, Rowe RG, Weiss SJ (2009) Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion. *The Journal of biological chemistry* **284**: 23001-23011

Sanchez-Lopez E, Rayego S, Rodrigues-Diez R, Rodriguez JS, Rodriguez-Vita J, Carvajal G, Aroeira LS, Selgas R, Mezzano SA, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M (2009a) CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **20**: 1513-1526

Sanchez-Lopez E, Rodrigues Diez R, Rodriguez Vita J, Rayego Mateos S, Rodrigues Diez RR, Rodriguez Garcia E, Lavoz Barria C, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Selgas R (2009b) [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **29**: 382-391

Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T, Ogawa S (2000) Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* **275**: 29717-29723

Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2010) NF-kappaB in renal inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**: 1254-1262

Sanz AB, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2008) Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 1634-1642

Satchell SC, Buchatska O, Khan SB, Bhangal G, Tasman CH, Saleem MA, Baker DP, Lobb RR, Smith J, Cook HT, Mathieson PW, Pusey CD (2007) Interferon-beta reduces proteinuria in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**: 2875-2884

Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A (2003) Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1486-1494

Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, Grunheck F, Hescheler J, Wartenberg M (2004) Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Experimental cell research* **294**: 313-324

Scott RP, Quaggin SE (2015) Review series: The cell biology of renal filtration. *The Journal of cell biology* **209**: 199-210

Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and cellular biology* **22**: 6247-6260

Schmitt R, Marlier A, Cantley LG (2008) Zag expression during aging suppresses proliferation after kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 2375-2383
Sean Eardley K, Cockwell P (2005) Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney international* **68**: 437-455

Sharpe CC, Dockrell ME (2012) Primary culture of human renal proximal tubule epithelial cells and interstitial fibroblasts. *Methods Mol Biol* **806**: 175-185

Sharpe CC, Dockrell ME, Noor MI, Monia BP, Hendry BM (2000) Role of Ras isoforms in the stimulated proliferation of human renal fibroblasts in primary culture. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **11**: 1600-1606

Skiniotis G, Lupardus PJ, Martick M, Walz T, Garcia KC (2008) Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Molecular cell* **31**: 737-748

Snively CS, Gutierrez C (2004) Chronic kidney disease: prevention and treatment of common complications. *American family physician* **70**: 1921-1928

Song J, Zhang YW, Yao AH, Yu Y, Hua ZY, Pu LY, Li GQ, Li XC, Zhang F, Sheng GQ, Wang XH (2008) Adenoviral cardiotrophin-1 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat small-for-size liver transplantation model. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **21**: 372-383

Song Y, Zhao L, Tao W, Laties AM, Luo Z, Wen R (2003) Photoreceptor protection by cardiotrophin-1 in transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter. *Investigative ophthalmology & visual science* **44**: 4069-4075

Stephanou A, Brar B, Heads R, Knight RD, Marber MS, Pennica D, Latchman DS (1998) Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**: 849-855

Stetler-Stevenson WG (1996) Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *The American journal of pathology* **148**: 1345-1350

Stevens PE, Levin A (2013) Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of internal medicine* **158**: 825-830

Strutz F, Zeisberg M (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**: 2992-2998

Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K (2005) Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**: 185-192

Talwar S, Choudhary SK (2003) Tuberculous aneurysms of the aorta. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **125**: 1184

Tam FW, Smith J, Morel D, Karkar AM, Thompson EM, Cook HT, Pusey CD (1999) Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **14**: 1658-1666

Tan RJ, Zhou D, Liu Y (2016) Signaling Crosstalk between Tubular Epithelial Cells and Interstitial Fibroblasts after Kidney Injury. *Kidney Dis (Basel)* **2**: 136-144

Taneda S, Hudkins KL, Topouzis S, Gilbertson DG, Ophascharoensuk V, Truong L, Johnson RJ, Alpers CE (2003) Obstructive uropathy in mice and humans: potential role for PDGF-D in the progression of tubulointerstitial injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **14**: 2544-2555

Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J (2017) TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medical science monitor basic research* **23**: 141-149

Tashiro K, Tamada S, Kuwabara N, Komiya T, Takekida K, Asai T, Iwao H, Sugimura K, Matsumura Y, Takaoka M, Nakatani T, Miura K (2003) Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor kappaB. *International journal of molecular medicine* **12**: 587-592

Thorner PS, Ho M, Eremina V, Sado Y, Quaggin S (2008) Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 495-502

Tian ZJ, Cui W, Li YJ, Hao YM, Du J, Liu F, Zhang H, Zu XG, Liu SY, Chen L, An W (2004) Different contributions of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin-1. *Acta pharmacologica Sinica* **25**: 1157-1164

Tunon MJ, San Miguel B, Crespo I, Riezu-Boj JI, Larrea E, Alvarez M, Gonzalez I, Bustos M, Gonzalez-Gallego J, Prieto J (2011) Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of virology* **85**: 13124-13132

Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2014) Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *International urology and nephrology* **46**: 765-776

U.S. Renal Data System, USRDS. Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2002

Vaccaro F, Mule G, Cottone S, Soresi M, Giannitrapani L, Vadala A, Sparacino V, Calabrese S, Picone FP, Montalto G, Cerasola G (2007) Circulating levels of adhesion molecules in chronic kidney disease correlate with the stage of renal disease and with C-reactive protein. *Archives of medical research* **38**: 534-538

Van Waes C, Yu M, Nottingham L, Karin M (2007) Inhibitor-kappaB kinase in tumor promotion and suppression during progression of squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 4956-4959

Vasilopoulou E, Kolatsi-Joannou M, Lindenmeyer MT, White KE, Robson MG, Cohen CD, Sebire NJ, Riley PR, Winyard PJ, Long DA (2016) Loss of endogenous thymosin beta4 accelerates glomerular disease. *Kidney international* **90**: 1056-1070

Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Barbero A (2008) L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *Journal of cell science* **121**: 913-919

- Veron D, Bertuccio CA, Marlier A, Reidy K, Garcia AM, Jimenez J, Velazquez H, Kashgarian M, Moeckel GW, Tufro A (2011) Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf(1)(6)(4)) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **54**: 1227-1241
- Wada T, Pippin JW, Marshall CB, Griffin SV, Shankland SJ (2005) Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **16**: 2615-2625
- Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA (2008) Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **23**: 2025-2032
- Wang L, Ellis MJ, Gomez JA, Eisner W, Fennell W, Howell DN, Ruiz P, Fields TA, Spurney RF (2012a) Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney international* **81**: 1075-1085
- Wang L, Kwak JH, Kim SI, He Y, Choi ME (2004) Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 33213-33219
- Wang L, Shearer GC, Budamagunta MS, Voss JC, Molfino A, Kaysen GA (2012b) Proteinuria decreases tissue lipoprotein receptor levels resulting in altered lipoprotein structure and increasing lipid levels. *Kidney international* **82**: 990-999
- Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2016) Chronic Kidney Disease. *Lancet*
- Welsh GI, Saleem MA (2011) The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nature reviews Nephrology* **8**: 14-21
- Wiggins RC (2007) The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney international* **71**: 1205-1214
- Wolf G (2006) Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney international* **70**: 1914-1919
- Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, Vernallis AB, Heath JK, Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996) Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* **271**: 9535-9545
- Xing CY, Saleem MA, Coward RJ, Ni L, Witherden IR, Mathieson PW (2006) Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney international* **70**: 1038-1045
- Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research* **19**: 156-172

- Xu S, Zhao Y, Yu L, Shen X, Ding F, Fu G (2011) Rosiglitazone attenuates endothelial progenitor cell apoptosis induced by TNF-alpha via ERK/MAPK and NF-kappaB signal pathways. *Journal of pharmacological sciences* **117**: 265-274
- Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY (2009) Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and - independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension* **54**: 877-884
- Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV (2010) Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature medicine* **16**: 535-543, 531p following 143
- Yang N, Luo M, Li R, Huang Y, Zhang R, Wu Q, Wang F, Li Y, Yu X (2008a) Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **23**: 91-100
- Yang ZF, Lau CK, Ngai P, Lam SP, Ho DW, Poon RT, Fan ST (2008b) Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **28**: 622-631
- Yoo KH, Thornhill BA, Forbes MS, Coleman CM, Marcinko ES, Liaw L, Chevalier RL (2006) Osteopontin regulates renal apoptosis and interstitial fibrosis in neonatal chronic unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* **70**: 1735-1741
- Yu Z, Zhang W, Kone BC (2002) Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *The Biochemical journal* **367**: 97-105
- Yuan HT, Tipping PG, Li XZ, Long DA, Woolf AS (2002) Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Kidney international* **61**: 2078-2089
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**: 2282-2287
- Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, Kalluri R (2003) Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *American journal of physiology Renal physiology* **285**: F1060-1067
- Zeisberg M, Kalluri R (2004) The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* **82**: 175-181
- Zeisberg M, Kalluri R (2013) Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology* **304**: C216-225
- Zeisberg M, Neilson EG (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**: 1819-1834

- Zeisberg M, Strutz F, Muller GA (2001) Renal fibrosis: an update. *Current opinion in nephrology and hypertension* **10**: 315-320
- Zhou D, Zheng X, Wang L, Stelmack G, Halayko AJ, Dorscheid D, Bai TR (2003) Expression and effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in human airway smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* **140**: 1237-1244
- Zhu G, Huang Y, Wu C, Wei D, Shi Y (2016) Activation of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Inhibits the Migration of Human Non-small Cell Lung Cancer Cells via IKK-beta/NF-kappaB Signals. *DNA and cell biology* **35**: 434-442
- Zhu L, Jiang R, Aoudjit L, Jones N, Takano T (2011) Activation of RhoA in podocytes induces focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**: 1621-1630
- Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, Stroud RE, Thompson SB, McClure CD, Mehurg SM, Spinale FG (2011) Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *Circulation Heart failure* **4**: 246-256
- Ziyadeh FN, Wolf G (2008) Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current diabetes reviews* **4**: 39-45
- Zolk O, Engmann S, Munzel F, Krajcik R (2005) Chronic cardiotrophin-1 stimulation impairs contractile function in reconstituted heart tissue. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **288**: E1214-1221
- Zugasti O, Rul W, Roux P, Peyssonnaud C, Eychene A, Franke TF, Fort P, Hibner U (2001) Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Molecular and cellular biology* **21**: 6706-6717
- Zuo Y, Wu Y, Chakraborty C (2012) Cdc42 negatively regulates intrinsic migration of highly aggressive breast cancer cells. *Journal of cellular physiology* **227**: 1399-1407
- Zvonic S, Hogan JC, Arbour-Reily P, Mynatt RL, Stephens JM (2004) Effects of cardiotrophin on adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 47572-47579

Summary

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) comprises a group of pathologies characterised by a progressive decrease in glomerular filtration rate that eventually leads to renal failure. CKD may start in renal tubules and interstitium (tubulointerstitial diseases), in the glomeruli (glomerular diseases) or in the vascular tree (renovascular diseases) (Lopez-Novoa et al, 2010). Tubulointerstitial fibrosis, the major determinant of CKD is characterised by tubular cell apoptosis followed by tubular atrophy, inflammatory cell infiltration including lymphocytes and macrophages, excessive deposition of extracellular matrix (ECM) in the renal interstitium possibly due to fibroblast accumulation (Grande & Lopez-Novoa, 2009) and rarefaction of the peritubular microvasculature (Zeisberg & Neilson, 2010). Glomerular disease involves morphological changes in podocytes resulting in defective filtration and proteinuria accompanied by inflammation and fibrosis (Greka & Mundel, 2012; Kurts et al, 2013). Several cytokines are necessary to induce these pathologic processes.

Cardiotrophin-1 (CT-1) is a member of the interleukin-6 family of cytokines originally identified as a protein capable of inducing hypertrophy in neonatal ventricular cardiomyocytes through the JAK/STAT pathway (Pennica et al, 1995). CT-1 signaling pathway includes glycoprotein 130 (GP130) and leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) (Pennica et al, 1996) and interactions with the JAK/STAT, MAPK ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. CT-1 mRNA is expressed in several tissues including the heart, lung, kidney, brain, liver and skeletal muscle (Pennica et al, 1995).

CT-1 has a protective effect in several organs, as it promotes survival of cardiomyocytes (Liao et al, 2002; Railson et al, 2000) and neurons (Oppenheim et al, 2001), and exerts antiapoptotic effects in different experimental models of liver, renal and neuronal damage (Aguilar-Melero et al, 2013; Bustos et al, 2003; Garcia-Cenador et al, 2013; Peng et al, 2010). In addition, administration of CT-1 provides protection against ischaemia/reperfusion liver damage (Iniguez et al, 2006), hepatic failure (Ho et al, 2006) and hepatitis of viral origin (Tunon et al, 2011). Some reports have shown that CT-1 attenuates the expression of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in several models of tissue damage, including a model of endotoxemia (Benigni et al, 1996) in orthotopic liver transplantation (Aguilar-Melero et al, 2013) and in a model of ischaemia/reperfusion renal injury via nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibition (Garcia-Cenador et al, 2013). CT-1 prevents renal toxicity

induced by iodinated contrast media in rats (Quiros et al, 2013) as well as gentamicin-induced nephrotoxicity (Quiros et al, 2016). However, little is known about the precise role of CT-1 in the development of tubulointerstitial and glomerular damage.

Thus, the aim of our study has been to elucidate the role of CT-1 in the development of tubulointerstitial fibrosis, tubular hypertrophy and glomerular damage.

METHODS

To assess the role of endogenous and exogenous administration of CT-1 in tubulointerstitial fibrosis, we have performed unilateral ureteral obstruction (UUO)- an experimental model of tubulointerstitial fibrosis- in CT-1 deficient mice and their respective controls. On the other hand, to elucidate the role of CT-1 on ECM synthesis, proliferation and migration, we generated primary cultures of myofibroblast isolated from these mice.

The role of CT-1 in tubular hypertrophy and proliferation was analysed with primary cultures of tubular epithelial cells isolated from CT-1^{-/-} and CT-1^{+/+} mice.

We have studied the role of CT-1 in a mouse model of nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis (NTS). Moreover, we have analysed the role of CT-1 on migration, proliferation and the actin cytoskeleton organization in mature mouse podocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

1. CT-1 deficiency is associated with a higher degree of tubulointerstitial fibrosis

We observed that CT-1, LIFR and GP130 are expressed in kidney.

CT-1 is upregulated in the obstructed (O) kidneys after UUO (figure 1), as assessed by qPCR and immunohistochemistry. O kidneys from CT-1^{-/-} mice develop more fibrosis after UUO than O kidneys from CT-1^{+/+} mice, evaluated by Masson's trichrome and Sirius Red staining, total collagen synthesis and by the protein expression of collagen I, fibronectin and CTGF. Moreover, O kidneys from CT-1^{+/+} mice show more expression of p-STAT3 and more matrix metalloproteinase-2 activity than O kidneys from CT-1^{-/-} mice (figure 1), which leads to a higher degradation of ECM proteins. All these data show that CT-1 deficiency increases UUO-induced tubulointerstitial renal fibrosis.

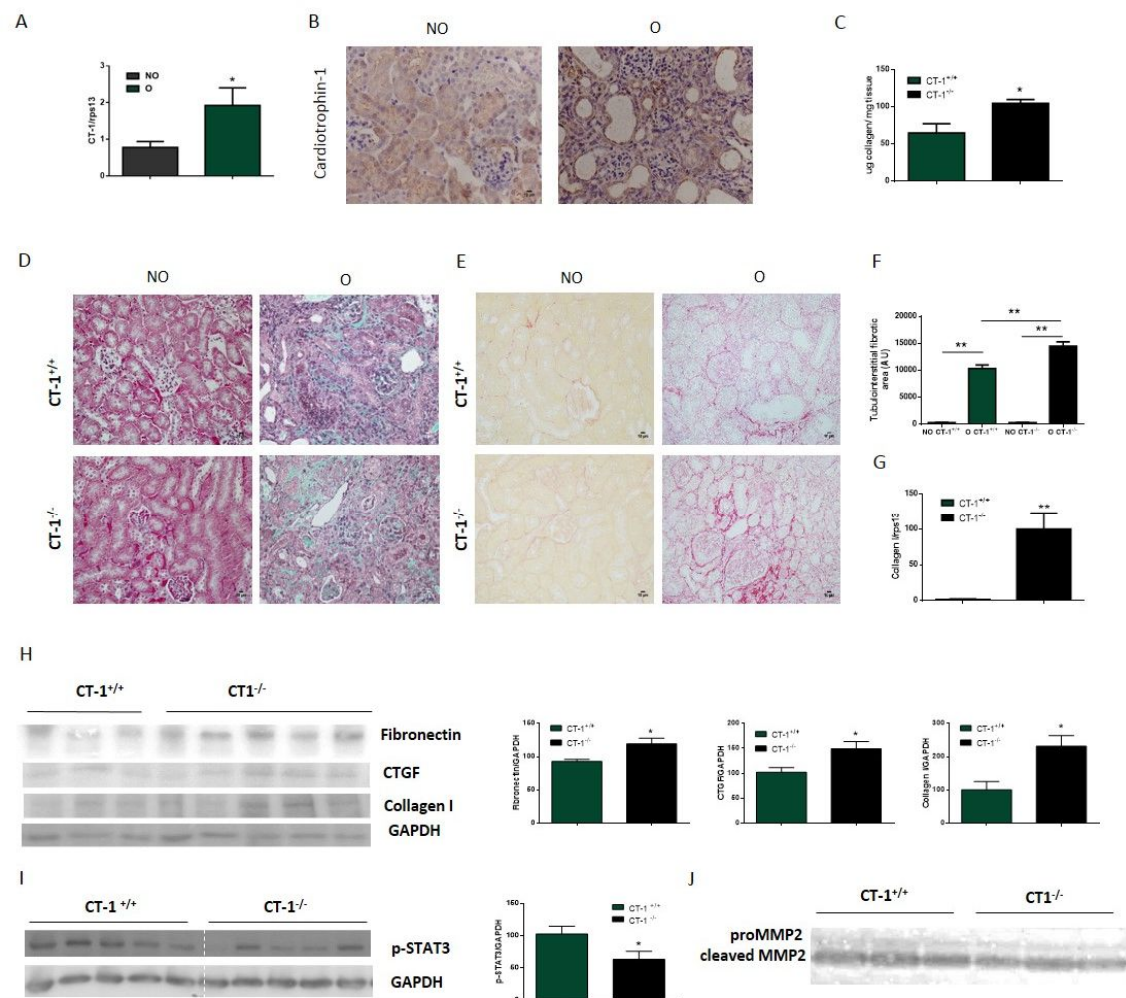


Figure 1. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) deficiency in interstitial fibrosis after 15 days of unilateral ureteral obstruction. A) Quantification of CT-1 mRNA levels in non obstructed (NO) and obstructed (O) kidneys from CT-1^{+/+} mice. B) Representative images of CT-1 immunohistochemistry in NO and O kidneys from CT-1^{+/+} mice. C) Total collagen synthesis in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Masson's trichrome (D) and Sirius Red staining (E) in NO and O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. F) Image-Pro Plus quantification of Sirius red stained area. (G) Collagen I mRNA levels in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Western blot analysis of fibronectin, CTGF, collagen I (H) and p-STAT3 protein expression in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. J) Gelatin zymography analysis of metalloproteinase-2 (MMP2) activity in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Data represent the average \pm S.E.M. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). *p<0.05, **p<0.01 vs groups indicated by the line. Magnification: 400X.

We evaluated tubular cell injury and apoptosis, interstitial inflammation and myofibroblast abundance due to the fact that these processes are the key molecular mechanisms promoting early kidney injury and renal fibrosis in the UUO experimental model (Ucero et al, 2014). We observed that in the early stages after UUO, O kidneys from CT-1^{-/-} mice

show higher tubular damage assessed by hematoxylin-eosin staining and higher degree of apoptosis assessed by cleaved caspase-3 expression and TUNEL staining. Moreover, O kidneys from CT-1^{-/-} mice show higher myofibroblast abundance (evaluated by alpha smooth muscle actin, α -SMA, and vimentin expression). O kidneys from CT-1^{-/-} mice show lesser expression of p-STAT3 than O kidneys from CT-1^{+/+} mice which might be related with the increased apoptosis observed in CT-1^{-/-} mice (figure 2) as it has been previously described in experimental models of liver injury (Iniguez et al, 2006; Marques et al, 2007).

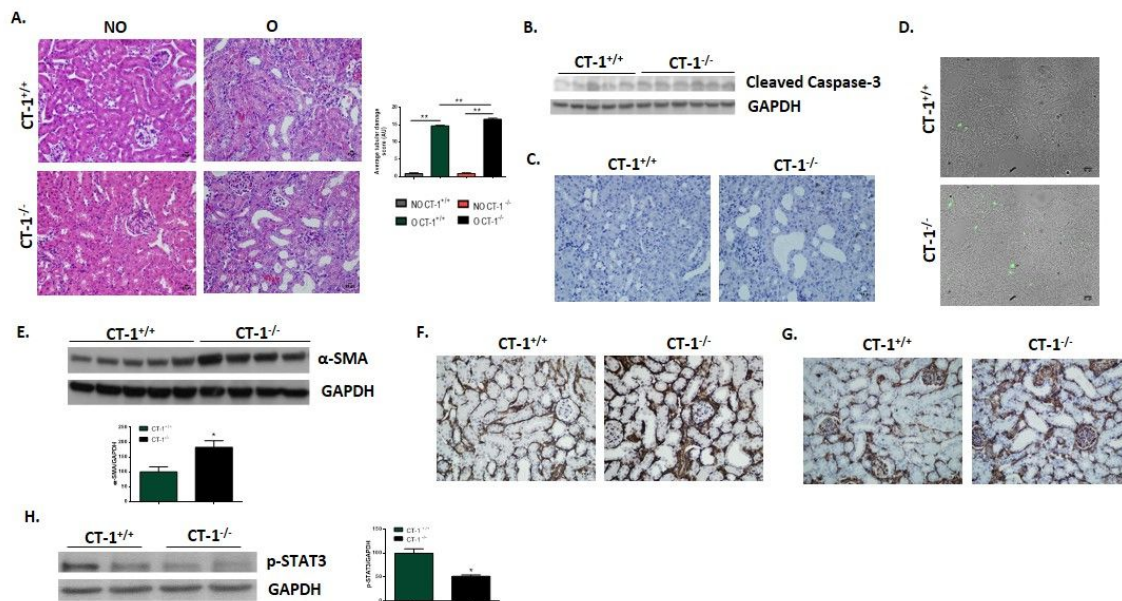


Figure 2. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) deficiency in tubular damage and myofibroblast abundance after 3 days of unilateral ureteral obstruction. A) Hematoxylin-eosin staining in non obstructed (NO) and obstructed (O) kidneys from CT-1^{+/+} and CT1^{-/-} mice and quantification of the tubular damage score. Western blot analysis of cleaved caspase-3 (B), alpha smooth muscle actin (α -SMA) (E) and p-STAT3 (H) protein expression. Representative immunohistochemistry images for cleaved caspase-3 (C), α -SMA (F) and vimentin (G) in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. D) Representative images of TUNEL staining in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Data represent the average \pm S.E.M. CT-1^{+/+} NO (n=6), CT-1^{+/+} O (n=6), CT-1^{-/-} NO (n=6), CT-1^{-/-} O (n=6). *p<0.05, **p<0.01 vs groups indicated by the line. Magnification: 400X.

Tubulointerstitial fibrosis is conditioned by infiltration of inflammatory cells (predominantly macrophages and leukocytes) and local expression of different cytokines (such as TNF- α), chemokines and membrane adhesion molecules (Zeisberg & Neilson, 2010). After 3 days of OUU, O kidneys from CT-1^{-/-} mice show a higher degree of inflammation than O kidneys from CT-1^{+/+}, evaluated by ICAM-1, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression and Cd68 mRNA expression; these effects may be caused by the

increased activation of NF- κ B observed in O kidneys from CT-1^{-/-} mice compared with CT-1^{+/+} mice (figure 3).

All these data show that the higher degree of renal fibrosis observed in CT-1^{-/-} mice with respect to CT-1^{+/+} mice may be due to increased apoptosis, macrophage infiltration, inflammation and myofibroblasts accumulation. Therefore, the increased CT-1 expression detected after UUO indicates that CT-1 acts as an endogenous protective mechanism against renal fibrosis.

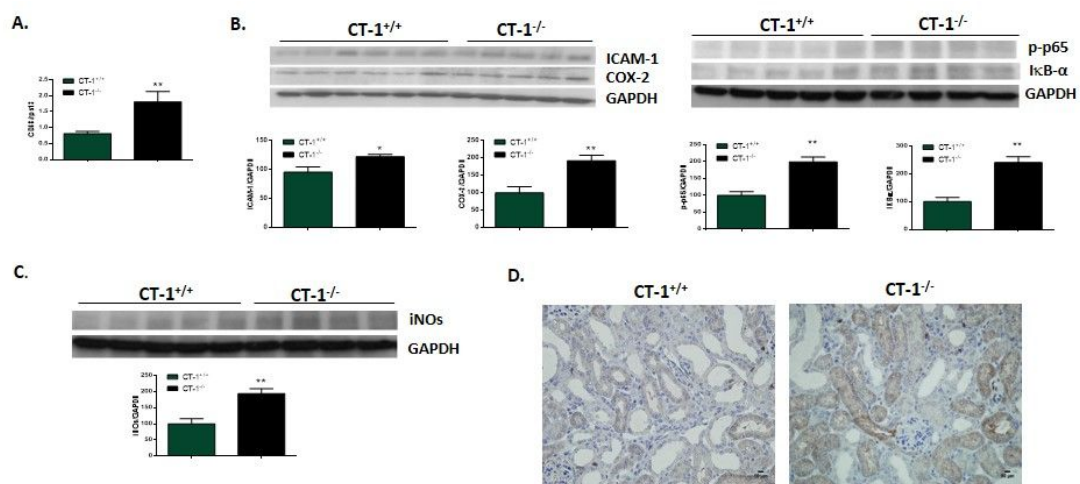


Figure 3. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) deficiency in the inflammatory response after 3 days of unilateral ureteral obstruction. A) Quantification of Cd68 mRNA levels in obstructed (O) kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Western blot analysis of ICAM-1, COX-2, p-p65, I κ B- α (B) and iNOS (C) protein expression in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. D) Representative immunohistochemistry images for iNOS in O kidneys from CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} mice. Data represents the average \pm S.E.M. CT-1^{+/+} (n=6), CT-1^{-/-} (n=6). *p<0.05, **p<0.01 vs CT-1^{+/+}. Magnification: 400X.

2. *CT-1 treatment ameliorates tubulointerstitial fibrosis*

We administered CT-1 (100 and 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) every 2 days after UUO in CT-1^{+/+} mice.

O kidneys from CT-1 treated mice show a significantly lower degree of renal fibrosis than O kidneys from non treated mice, as assessed by Masson's trichrome and Sirius Red staining and by fibronectin, collagen I and CTGF protein expression. Moreover, in the early stages of UUO-induced disease CT-1 treatment decreases tubular damage (assessed by hematoxylin-eosin staining) and apoptosis (assessed by cleaved casapase-3 expression and TUNEL staining) and myofibroblast abundance (assessed by α -SMA and vimentin expression). Regarding the expression of inflammatory mediators, CT-1 treatment significantly reduces Cd68 and IL-1 β mRNA expression, the expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and COX-2 and iNOs expression. On the other hand, p-p65 and I κ B- α expressions are higher in non-treated O kidneys than in CT-1 treated O kidneys (figure 4).

All these data indicate that CT-1 treatment ameliorates the early tubular damage and apoptosis, as well as the inflammatory response and myofibroblast abundance induced by UUO during three days, which leads to a reduced renal fibrosis in the later stages (15 days) of disease.

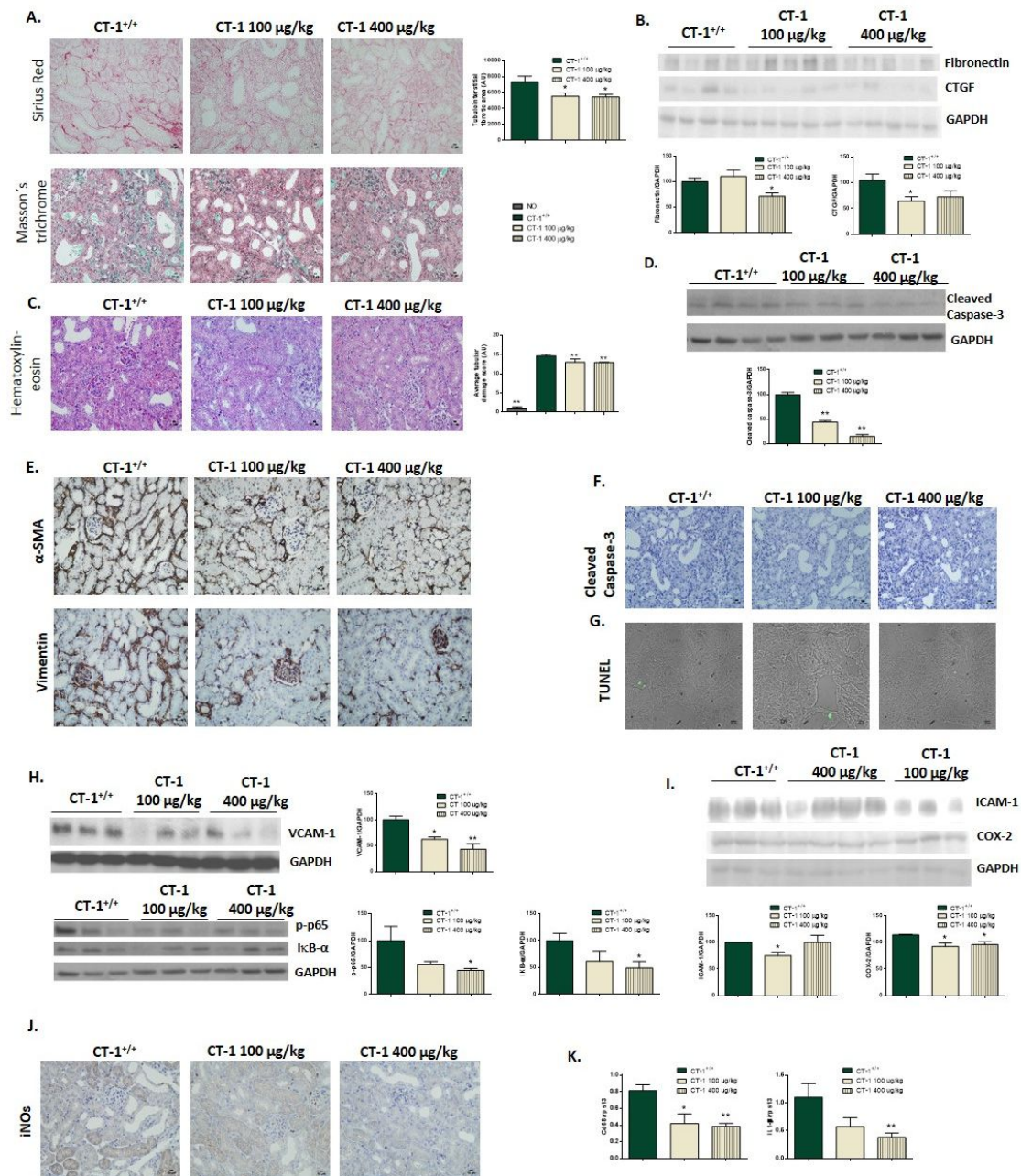


Figure 4. Effects of cardiotoxin-1 (CT-1) treatment in tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UO) in CT-1^{+/+} mice. A) Representative immunohistochemistry images for Sirius Red and Masson's trichrome staining in obstructed (O) kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 15 days of UO and quantification by Image-pro Plus. B) Western blot analysis of fibronectin and CTGF protein expression in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 15 days of UO. C) Representative immunohistochemistry images for hematoxylin-eosin staining in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 3 days of UO and quantification of tubular damage score. Western blot analysis of cleaved caspase-3 (D), VCAM-1, p-p65, I κ B- α (H), ICAM-1 and COX-2 (I) protein expression in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 3 days of UO. Representative immunohistochemistry images for alpha smooth muscle actin (α -SMA), vimentin (E) and iNOS (J) in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 3 days of UO. G) Representative images of TUNEL staining in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 3 days of UO. K) Quantification of Cd68 and IL-1 β mRNA levels in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated mice after 3 days of UO. Data represent the average \pm S.E.M. 15 days UO: CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=4). 3 days UO: CT-1^{+/+} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=6). *p<0.05, **p<0.01 vs CT-1^{+/+}. Magnification: 400X.

3. CT-1 administration in CT-1^{-/-} mice ameliorates tubulointerstitial fibrosis

CT-1 administration reduces the interstitial renal fibrosis induced after 15 days of UUO in CT-1^{-/-} mice, according to Masson's trichrome, Sirius Red staining and fibronectin, collagen I and CTGF protein expression. Moreover, O kidneys from CT-1 treated CT-1^{-/-} mice show lower myofibroblast abundance than O kidneys from non-treated CT-1^{-/-} mice, evaluated by α -SMA and vimentin expression. Regarding the tubulointerstitial damage induced in the early stages of disease, CT-1 administration ameliorates the tubular damage (evaluated by hematoxylin-eosin staining) and apoptosis (evaluated by cleaved caspase-3 expression and TUNEL staining) induced after 3 days of UUO in CT-1^{-/-} mice. Moreover, CT-1 administration reduces the inflammatory response as assessed by Cd68 and IL-1 β mRNA expression and VCAM-1, I κ B- α , COX-2 and iNOs protein expression (figure 5).

These data show that supplementation of CT-1 levels in CT-1^{-/-} mice ameliorates the tubular damage and apoptosis and the inflammatory response induced after 3 days UUO, which leads to a reduced tubulointerstitial fibrosis in the later stages of disease.

In conclusion, our results show that endogenous CT-1 attenuates the early damage induced by obstructive nephropathy acting as a protective mechanism against cell apoptosis, inflammation and renal fibrosis. Although endogenous CT-1 is not enough to restore all the damage, exogenous administration of CT-1 contributes to provide protection against UUO induced injury by the same mechanisms of endogenous CT-1. These results suggest that CT-1 treatment may be used as a therapeutic alternative to ameliorate the tubulointestinal fibrosis induced by obstructive nephropathy.

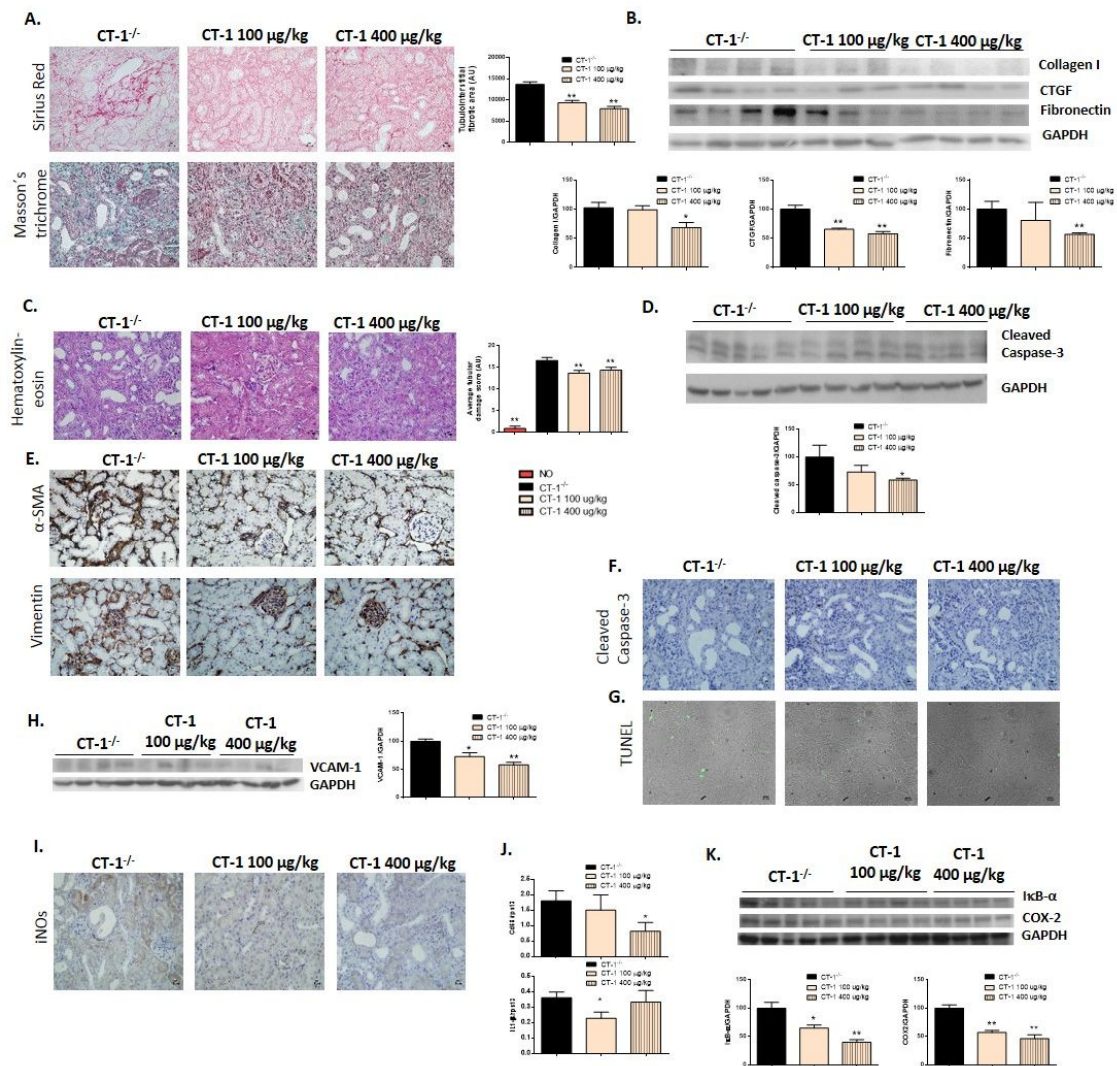


Figure 5. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) administration in tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in CT-1^{-/-} mice. A) Representative images for Sirius Red and Masson's trichrome staining in obstructed (O) kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 15 days of UUO and quantification by Image-pro Plus. B) Western blot analysis of collagen I, fibronectin and CTGF protein expression in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 15 days of UUO. C) Representative images for hematoxylin-eosin staining in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 3 days of UUO and quantification of tubular damage score. Western blot analysis of cleaved caspase-3 (D), VCAM-1 (H), COX-2, and IκB-α (K) protein expression in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 3 days of UUO. Representative immunohistochemistry images for alpha smooth muscle actin (α-SMA), vimentin (E) and iNOs (I) in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 3 days of UUO. G) Representative images of TUNEL staining in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 3 days of UUO. J) Quantification of Cd68 and IL-1β mRNA levels in O kidneys from CT-1 100 µg/kg and 400 µg/kg treated CT-1^{-/-} mice after 3 days of UUO. Data represent the average ± S.E.M. 15 days UUO: CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=5). 3 days UUO: CT-1^{-/-} (n=6), CT-1 100 µg/kg (n=5), CT-1 400 µg/kg (n=6). *p<0.05, **p<0.01 vs CT-1^{-/-}. Magnification: 400X.

4. CT-1-deficient myfibroblasts show increased ECM protein synthesis, migration and proliferation

Myfibroblasts play a relevant role in renal fibrosis, being responsible for ECM proteins synthesis (Peng et al, 2010; Strutz & Zeisberg, 2006). We observed that renal myfibroblasts express CT-1, LIFR and GP130; stimulation with CT-1 40 ng/mL induces STAT3 phosphorylation in myfibroblasts cultures.

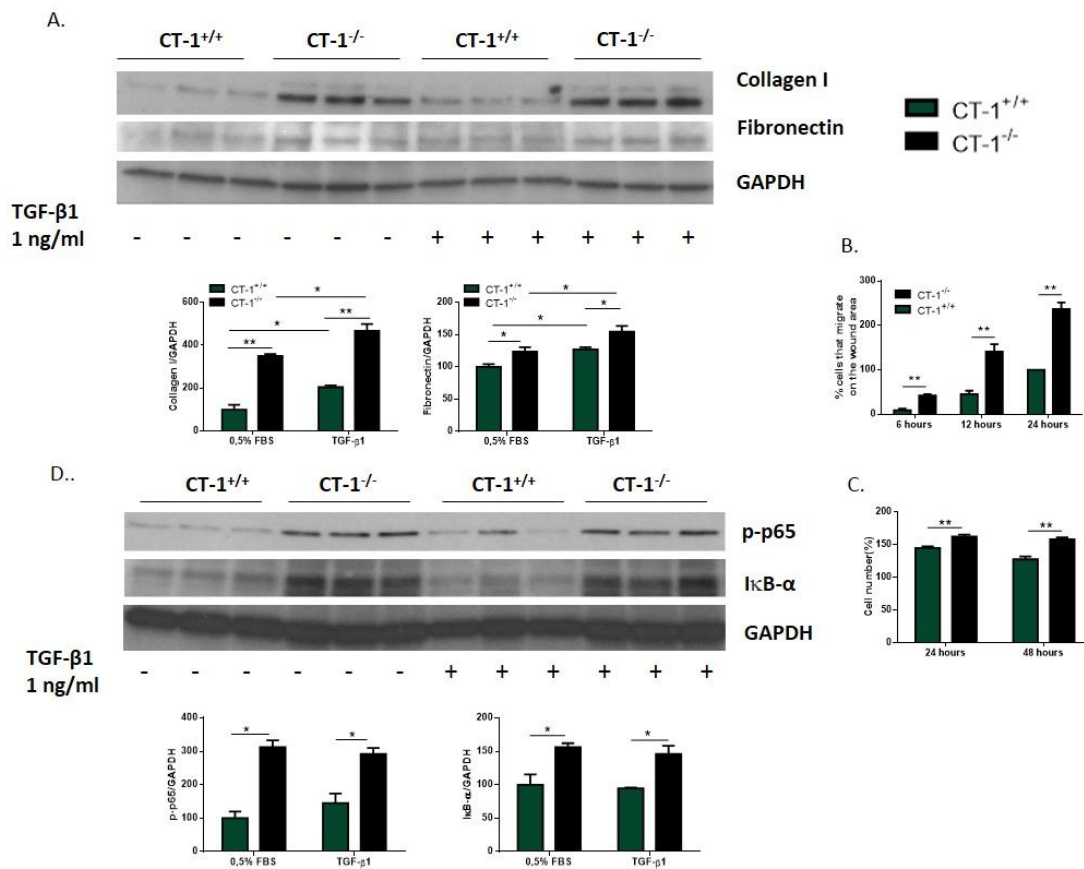


Figure 6. Role of cardiotrophin-1 (CT-1) in extracellular matrix protein synthesis, proliferation and migration. Western blot analysis of collagen I, fibronectin (A), pp65 and IκB-α (D) protein expression in CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} renal myfibroblasts after TGF-β1 (1 ng/mL) stimulation. B) Quantification of cells that migrate into the wound area at 6, 12 and 24 hours in CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} myfibroblasts. C) Cell proliferation measured at 0, 24 and 48 h by the MTT assay in CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} myfibroblasts. Data represent the average ± S.E.M of 3 different experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 vs groups indicated by the line.

CT-1^{-/-} renal myfibroblasts show a higher expression of collagen I and fibronectin, both in basal conditions and after TGF-β1 stimulation (1 ng/mL), than CT-1^{+/+} renal myfibroblasts. On

the other hand, CT-1^{-/-} myofibroblasts proliferate and migrate more than CT-1^{+/+} myofibroblasts in basal conditions.

These *in vitro* data indicate that CT-1 deficiency in renal myofibroblasts promotes a profibrotic phenotype which could be mediated by the NF-κB pathway, as we have observed higher NF-κB activation in CT-1^{-/-} myofibroblasts than in CT-1^{+/+} myofibroblasts in basal conditions and after TGF-β1 stimulation (1 ng/mL). These results support the *in vivo* observed effects in which CT-1^{-/-} mice showed higher degree of renal fibrosis after UUO than CT-1^{+/+} mice.

5. CT-1 exerts a hypertrophic effect in renal tubular epithelial cells

We assessed that renal tubular epithelial cells from CT-1^{-/-} and CT-1^{+/+} mice express CT-1, LIFR and GP130; stimulation with CT-1 (40 ng/mL) induced STAT3 and AKT phosphorylation. CT-1 (40 ng/mL) induces hypertrophy in both CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} epithelial cells through JAK/STAT3 pathway as it has been previously described in cardiomyocytes (Railson et al, 2002; Tian et al, 2004). STAT3 inhibition with S3I-201 reverts the CT-1-induced hypertrophy. Moreover, CT-1 deficiency leads to a reduced cell area in basal conditions possible due to a lower STAT3 activation in these cells (figure 7).

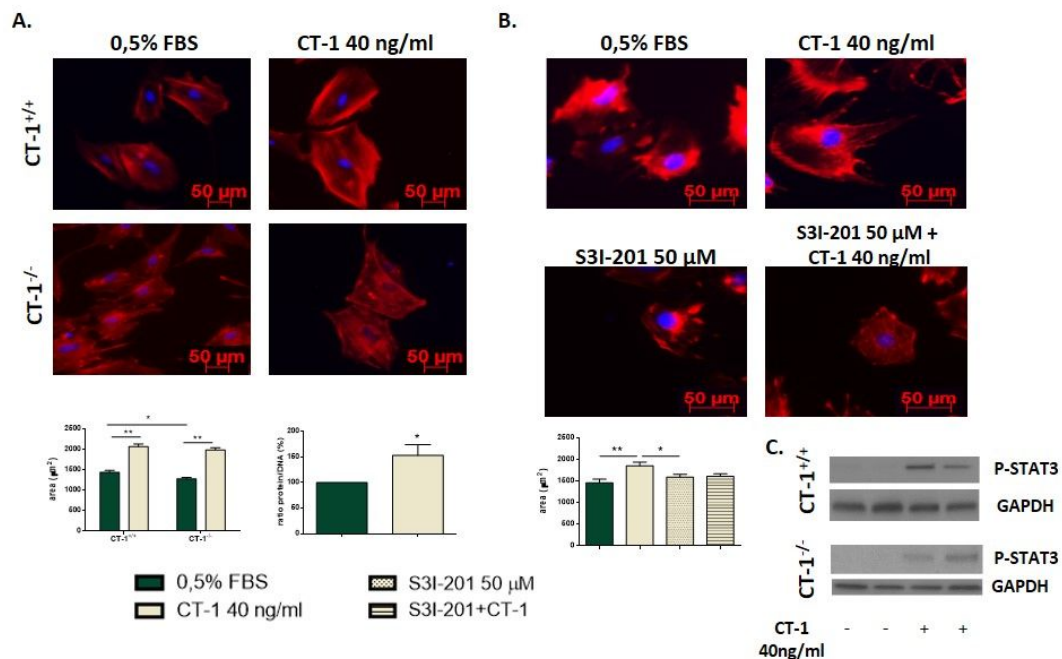


Figure 7. Role of cardiostrophin-1 (CT-1) in tubular epithelial cells hypertrophy. A) Representative phalloidin immunofluorescence in CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} cells in basal conditions and after 48 hours of CT-1 (40ng/mL) stimulation; area quantification by Fiji software and quantification of protein/DNA ratio. Magnification: 50X B) Representative phalloidin immunofluorescence in CT-1^{+/+} cells in basal conditions and after S3I-201 (50 μM) or CT-1 (40 ng/mL) stimulation; area quantification by Fiji software. Magnification: 100X. C) Western blot analysis of p-STAT after CT-1 (40 ng/ml) stimulation in CT-1^{+/+} and CT-1^{-/-} cells. Data represent the average ± S.E.M of 3 different experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs groups indicated by the line.

6. CT-1 treatment ameliorates glomerulonephritis induced by nephrotoxic serum (NTS)

Healthy kidneys show significantly higher CT-1 expression around the glomerulus than diseased kidneys, suggesting that there is a downregulation of CT-1 glomerular expression in the NTS model, probably caused by the loss of glomerular cells after NTS administration.

CT-1 treatment improve the renal function according to the reduced albuminuria observed in CT-1 treated mice compared with non-treated animals. Moreover, CT-1 treated mice show reduced glomerulosclerosis and interstitial fibrosis assessed by Sirius Red staining (figure 8).

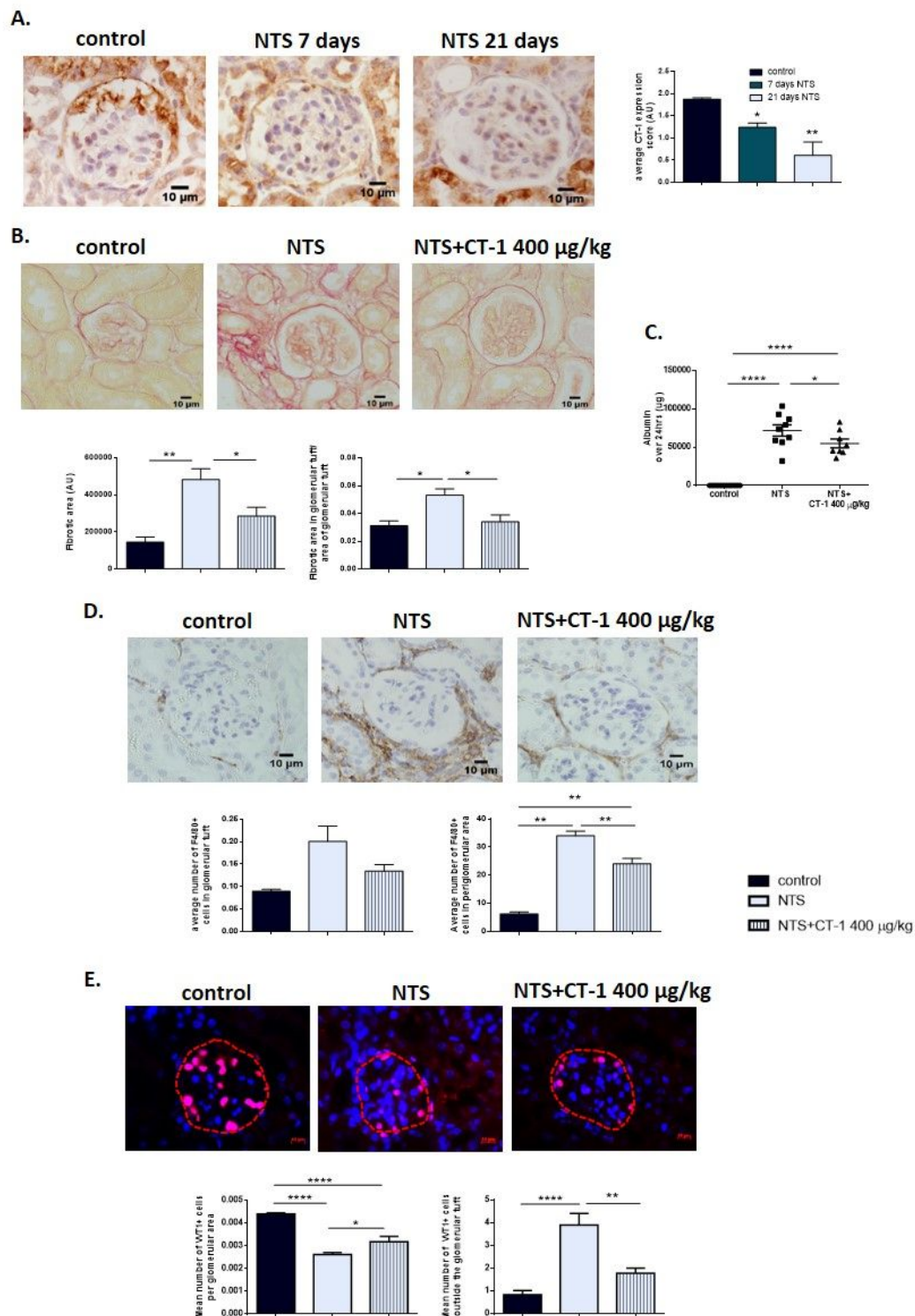


Figure 8. Effects of cardiostrophin-1 (CT-1) treatment in glomerulonephritis induced by nephrotoxic serum (NTS). A) Representative immunohistochemistry images for CT-1 in kidneys 7 and 21 days after NTS administration; quantification of CT-1 expression score. Control (n=6), NTS 7 days (n=6), NTS 21 days (n=5). B) Representative images for Sirius Red staining in kidneys 21 days after NTS and CT-1 (400 µg/kg) administration, and quantification by image-pro Plus. C) Twenty-four–hours albumin excretion in urine 21 days after NTS and CT-1 (400 µg/kg) administration. D) Representative immunohistochemistry images for F4/80 in kidneys 21 days after NTS and CT-1 (400 µg/kg) administration. E) Representative images of glomeruli stained for WT1 in kidneys 21 days after NTS and CT-1 (400 µg/kg) administration. Data represent the average ± S.E.M. Control (n=6), NTS (n=9), NTS+CT-1 400 µg/kg (n=8). *p<0,05; **p<0,01, ****p<0,0001 vs groups indicated by the line. Magnification: 400X.

CT-1 treatment also reduced periglomerular inflammation assessed by the number of F4/80+ (macrophage marker) positive cells. On the other hand, CT-1 treatment reduced the NTS-induced redistribution of podocytes (assessed by WT1 immunofluorescence) from the glomerular tuft toward the Bowman's capsule, where they contribute to the integrity of the filtration barrier (figure 8).

Summarizing, CT-1 treatment improves renal function and renal fibrosis in the NTS-induced glomerulonephritis experimental model, probably as a consequence of the reduced inflammation and podocyte redistribution observed in CT-1 treated mice.

7. CT-1 affects migration and shape of podocytes

Podocytes play a key role maintaining glomerular function; hypermotility, hypomotility and abnormalities of the podocyte actin cytoskeleton could lead to foot process effacement and proteinuria (Welsh & Saleem, 2011). We previously described the effect of CT-1 in podocyte redistribution after NTS administration.

We demonstrated that CT-1, LIFR and GP130 are expressed in primary cultures of podocytes and in immortalised mature mouse podocytes.

We transfected immortalised mouse podocytes with siRNA against CT-1. Knockdown of endogenous CT-1 does not affect podocyte viability but significantly increases migration after 24 hours, reduces the percentage of cells with stress actin fiber organization and reduces Cdc42 activity. Moreover, knockdown of CT-1 reduces cellular area (figure 9).

Exogenous administration of CT-1 in these cells does not modify viability, motility or the percentage of cells with stress actin fiber organization, but reduces RhoA activity, and increases cell area (figure 9).

Therefore, CT-1 deficiency modifies podocytes functionality, increases migration and alters stress fiber organization and cellular area possibly because of the reduced Cdc42 activity. On the other hand, CT-1 stimulation does not modify migration and stress fiber organization.

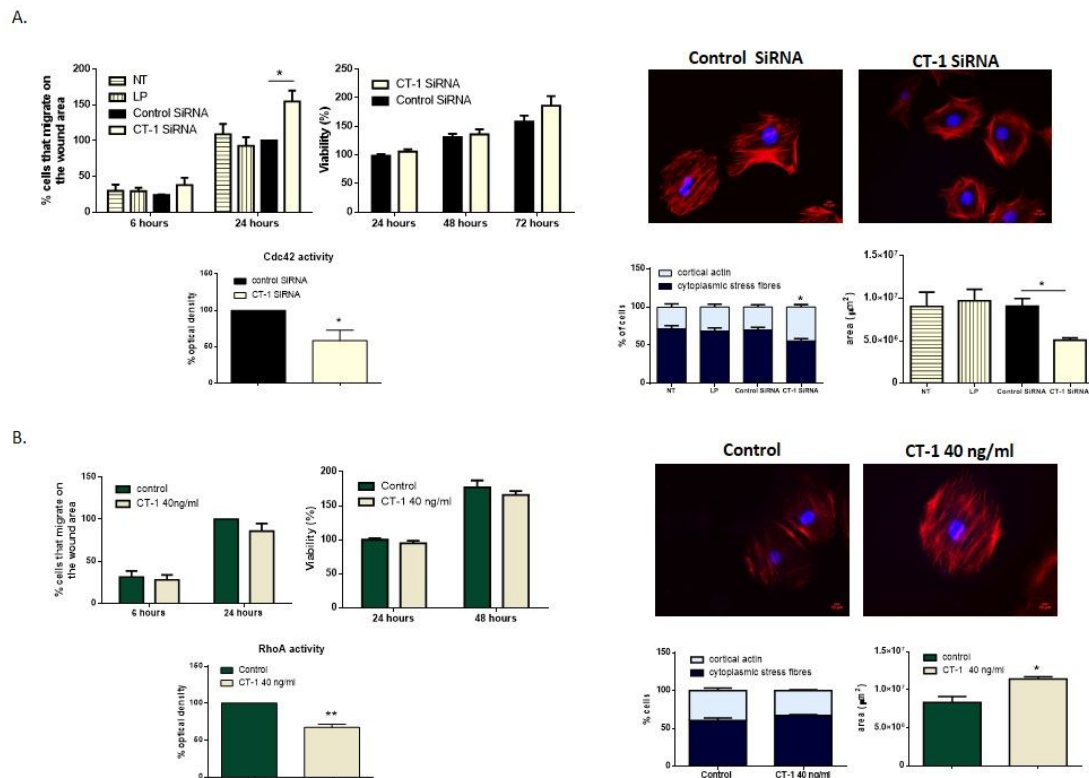


Figure 9. Effects of the absence (A) and stimulation (B) with cardiotrophin-1 (CT-1) in podocyte migration, viability and cytoskeleton structure. Podocyte migration after knockdown of endogenous CT-1 or after CT-1 stimulation was assessed by a wound-healing assay. Cell viability after knockdown of endogenous CT-1 or CT-1 stimulation was assessed by MTT assay. Representative phalloidin immunofluorescence in podocytes after knockdown of endogenous CT-1 or after CT-1 stimulation; the percentage of cells with predominantly cytoplasmic stress fibers or cortical actin formation and the cell area (by Fiji software) were quantified. Quantification of active RhoA and active Cdc42. Data represent the average \pm S.E.M of 3-5 different experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs groups indicated by the line. Magnification: 200X.

CONCLUSIONS

Based on the results showed in this study, we present the following conclusions:

1. CT-1 exerts a protective effect against the inflammatory response, apoptosis and renal fibrosis induced by UUO, mainly due to NF- κ B and STAT3 modulation and regulation of myofibroblasts proliferation and migration.
2. CT-1 exerts its hypertrophic role in cultured renal tubular epithelial cells through the JAK/STAT3 pathway.
3. CT-1 reduces renal fibrosis and improves renal function after NTS-induced glomerulonephritis, decreasing macrophage infiltration and modulating podocyte cytoskeleton reorganization and migration.

REFERENCES

Aguilar-Melero P, Luque A, Machuca MM, Perez de Obanos MP, Navarrete R, Rodriguez-Garcia IC, Briceno J, Iniguez M, Ruiz J, Prieto J, de la Mata M, Gomez-Villamandos RJ, Muntane J, Lopez-Cillero P (2013) Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant. *The Journal of surgical research* 181: e83-91

Benigni F, Sacco S, Pennica D, Ghezzi P (1996) Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells. *The American journal of pathology* 149: 1847-1850

Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, Prieto J (2003) Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 125: 192-201

Garcia-Cenador MB, Lorenzo-Gomez MF, Herrero-Payo JJ, Ruiz J, Perez de Obanos MP, Pascual J, Lopez-Novoa JM, Garcia-Criado FJ (2013) Cardiotrophin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation. *Transplantation* 96: 1034-1042

Grande MT, Lopez-Novoa JM (2009) Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nature reviews Nephrology* 5: 319-328

Greka A, Mundel P (2012) Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology* 74: 299-323

Ho DW, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, To JY, Poon RT, Fan ST (2006) Therapeutic potential of cardiotrophin 1 in fulminant hepatic failure: dual roles in antiapoptosis and cell repair. *Arch Surg* 141: 1077-1084; discussion 1084

Iniguez M, Berasain C, Martinez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, Avila MA, Prieto J (2006) Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *The Journal of experimental medicine* 203: 2809-2815

Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ (2013) The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews Immunology* 13: 738-753

Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2002) Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovascular research* 53: 902-910

Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Hernandez FJ (2010) Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics* 128: 61-81

Oppenheim RW, Wiese S, Prevet D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, Holtmann B, Gotz R, Pennica D, Sendtner M (2001) Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 1283-1291

Peng H, Sola A, Moore J, Wen T (2010) Caspase inhibition by cardiotrophin-1 prevents neuronal death in vivo and in vitro. *Journal of neuroscience research* 88: 1041-1051

Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, et al. (1995) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1142-1146

Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996) Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine & growth factor reviews* 7: 81-91

Quiros Y, Blanco-Gozalo V, Sanchez-Gallego JI, Lopez-Hernandez FJ, Ruiz J, Perez de Obanos MP, Lopez-Novoa JM (2016) Cardiotrophin-1 therapy prevents gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological research* 107: 137-146

Quiros Y, Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Morales AI, Lopez-Novoa JM (2013) Cardiotrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 132: 493-501

Railson J, Lawrence K, Stephanou A, Brar B, Pennica D, Latchman D (2000) Cardiotrophin-1 reduces stress-induced heat shock protein production in cardiac myocytes. *Cytokine* 12: 1741-1744

Strutz F, Zeisberg M (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 17: 2992-2998

Tunon MJ, San Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaria E, Alvarez M, Prieto J, Gonzalez-Gallego J (2011) Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal of pineal research* 50: 38-45

Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2014) Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *International urology and nephrology* 46: 765-776

Welsh GI, Saleem MA (2011) The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nature reviews Nephrology* 8: 14-21

Zeisberg M, Neilson EG (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 21: 1819-1834