

## BIOLOGIA MOLECULAR Y NEFROLOGIA

# *Contribuciones de la biología celular y molecular al estudio de la patogenia de las glomerulonefritis*

**A. Ortiz, J. Alonso y J. Egido.**

Laboratorio de Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid.

### INTRODUCCION

En las últimas décadas, la utilización de técnicas de biología molecular y celular ha permitido ampliar nuestros conocimientos acerca de los mecanismos que inician y mantienen el daño renal <sup>1</sup>. Los cambios observados en el riñón al nivel histológico y funcional (fundamentalmente alteraciones en el número de células y en el depósito de matriz extracelular) son, sin duda, un reflejo de los cambios que ocurren a nivel celular. Existen multitud de factores directamente implicados en la regulación del comportamiento celular y que participan en la patogenia de las glomerulonefritis.

El trabajo del biólogo molecular y celular, dedicado al estudio de las enfermedades renales, reside en identificar los factores involucrados en dichas patologías y el descubrimiento de nuevas terapias más específicas. Para ello se aplican técnicas de biología celular y molecular a diversos materiales biológicos. Estas técnicas permiten estudiar los mecanismos de acuniulación y depleción celular, la regulación de la expresión de genes y proteínas, la función de éstos y la búsqueda de nuevos factores implicados en el daño renal.

En esta revisión comentaremos en primer lugar los materiales biológicos en los cuales se realizan los es-

tudios; después abordaremos las técnicas de biología celular y molecular de relevancia para el estudio de las enfermedades glomerulares, y por último terminaremos con una valoración crítica de los avances que estas técnicas han propiciado en el conocimiento de la patogenia del daño glomerular, especialmente referido a las citocinas y los constituyentes de la matriz extracelular y su repercusión clínica.

### A) MATERIALES BIOLÓGICOS

Las tres fuentes fundamentales de muestras para estudios moleculares del riñón son las células en cultivo, los modelos animales y las biopsias renales de pacientes.

#### Cultivos celulares

La finalidad de los cultivos celulares es establecer poblaciones homogéneas de células que, mantenidas vivas fuera de su contexto habitual, permitan estudiar el comportamiento de un tipo celular determinado <sup>2</sup>. Existen técnicas sencillas para conseguir cultivos primarios de diversas estirpes celulares renales. En determinados estudios pueden ser útiles las líneas celulares transformadas por virus como el SV40. La inserción del genoma del virus en el genoma celular, facilita su cultivo y aumentando su disponibilidad. Sin embargo, la transformación puede alterar algunas funciones celulares. Aquí describiremos brevemente cómo se pueden obtener cultivos de células mesangiales y epiteliales glomerulares.

---

Correspondencia: Dr. Jesús Egido  
Laboratorio de Nefrología.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. Reyes Católicos, 2.  
28040 Madrid.

Para obtener células mesangiales, la corteza renal (normalmente de rata) es diseccionada en pequeños trozos y pasada a través de tamices de diferente tamaño de poro. El último tamiz posee la cualidad de retener los glomérulos excluyendo células y túbulos. Los glomérulos son separados de túbulos y células contaminantes por centrifugación suave y son digeridos con colagenasa para destruir la cápsula de Bowman. Los glomérulos digeridos se siembran en placas de cultivo con un medio compuesto de sales, aminoácidos, vitaminas y entre un 10 y un 20 % de suero de ternera fetal que provee los factores de crecimiento necesarios para la viabilidad celular. Aproximadamente a las tres semanas se obtiene un cultivo homogéneo de células mesangiales <sup>3</sup>. Estos cultivos son denominados de dos dimensiones (2D) (fig 1A). Si se desea un cultivo en tres dimensiones, las células son levantadas de la placa con una incubación con tripsina y sembradas entre dos láminas de una solución de colágeno (fig 1 B).

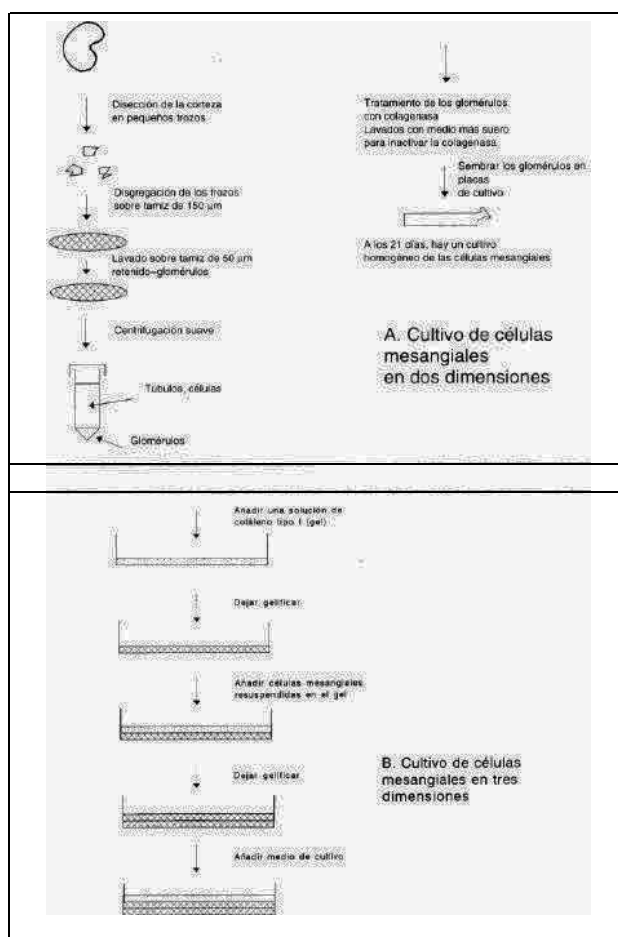


Fig. 1.—Esquemas de cultivos de células mesangiales en dos y tres dimensiones.

Para obtener células epiteliales glomerulares, los glomérulos son directamente sembrados sobre placas de cultivo recubiertas con una película de colágeno I, que facilita el crecimiento de las células epiteliales. Aproximadamente a la semana, las células epiteliales forman un adoquinado alrededor del glomérulo. En este momento los glomérulos son levantados de la placa con un suave raspado, dejando en ella solamente las células epiteliales <sup>4</sup>.

Los cultivos celulares permiten responder a varios interrogantes, como por ejemplo: qué factores pueden ser sintetizados por un tipo celular y en respuesta a qué estímulos; cuáles son los estímulos que controlan la proliferación y migración celular; qué tipos de receptores posee una determinada célula, etc.

Sin embargo, los resultados obtenidos con cultivos celulares deben ser analizados con cautela, puesto que las células se encuentran separadas de su contexto habitual. Por ejemplo, las células mesangiales en cultivo sintetizan y secretan colágeno I <sup>5</sup>, una proteína constituyente de la matriz extracelular de los tejidos intersticiales. La matriz mesangial, por el contrario, no posee colágeno tipo I en situaciones normales, sino que está formada fundamentalmente por colágeno IV, fibronectina y proteoglicanos. Esto no significa una disociación total entre datos obtenidos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las células mesangiales *in vivo* en condiciones normales no expresan  $\alpha$ -actina muscular, pero sí lo hacen *in vitro* y durante la inflamación glomerular. Es el llamado, por algunos autores, fenotipo inflamatorio o activado <sup>6</sup>.

## Modelos animales

En los modelos animales de daño glomerular se induce una enfermedad en un animal que tenga el mayor parecido posible con la situación en humanos que se desea imitar. Los animales más utilizados son ratas, conejos y ratones. Estos últimos tienen la desventaja de la limitada cantidad de material biológico que se puede obtener, pero, a cambio, hay un mejor conocimiento del genoma de ratón <sup>7</sup>. Además, la posibilidad de crear animales transgénicos y «knock-out» (ver más adelante) permiten nuevos abordajes y estudios. Existen modelos de prácticamente todas las glomerulopatías humanas (revisado en 8), pero aquí sólo nos vamos a referir a los empleados habitualmente en nuestro laboratorio. Más adelante comentaremos los nuevos modelos basados en animales transgénicos, en los que la regulación anormal de un solo gen ocasiona la lesión glomerular.

**Enfermedad crónica del suero:** Las ratas son inmunizadas con ovalbúmina, provocando una enfermedad crónica por inmunocomplejos <sup>9</sup>. Los inmuno-

complejos se depositan y/o se forman en el mesangio y pared glomerular, desencadenando una glomerulonefritis proliferativa y necrotizante, caracterizada por un fuerte infiltrado glomerular e intersticial, elevada proteinuria y rápida progresión a insuficiencia renal terminal <sup>10,11</sup>. La interrupción de la administración del antígeno da lugar a la resolución de la inflamación glomerular, pero la proteinuria persiste, asociada a una morfología de nefropatía membranosa <sup>12</sup>.

*Glomerulonefritis por anticuerpos anti-membrana basal glomerular (MBG):* La inyección de anticuerpos frente a la MBG o la inmunización con MBG ocasiona una glomerulonefritis rápidamente progresiva, habitualmente con semilunas, y con intenso infiltrado de células mononucleares, que recuerda a la humana. La ventaja de este modelo reside en la rapidez de su obtención.

*Glomerulonefritis por anticuerpos anti-Thy-1:* Los animales son inyectados con una única dosis de un anticuerpo frente a Thy-1, un antígeno presente en la superficie de células de la estirpe linfocítica y en células mesangiales. Esto origina una mesangiólisis inicial dependiente de complemento y elevada proteinuria, seguida por proliferación mesangial y expansión de matriz mesangial (fig. 2). La nefritis se resuelve espontáneamente en dos o tres semanas, aunque un modelo crónico puede ser establecido por repetidas inyecciones de anticuerpos. Aunque este modelo ha sido criticado porque no corresponde a ninguna enfermedad en humanos, actualmente es muy utilizado, fundamentalmente por su repetitividad, sencillez y rapidez, así como por la información que pueda aportar sobre los mecanismos de remodelación asociados a la resolución de la inflamación glomerular.

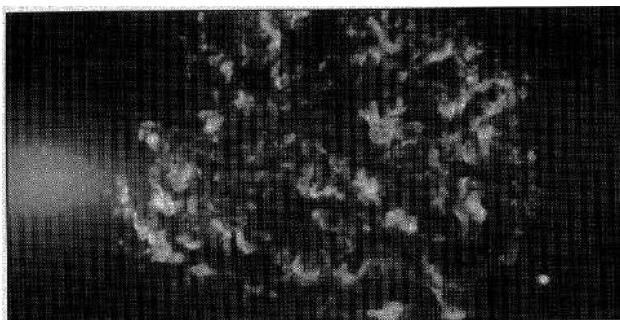


fig. 2.-Glomérulo de una ratona con glomerulonefritis producida por anticuerpos anti-Thy-1 tenido con un anticuerpo anti-fibronectina. El segundo anticuerpo utilizado estaba marcado con fluoresceína.

*Síndrome nefrótico idiopático:* Este modelo es inducido por la administración de una dosis de adriamicina o aminonucleósido de puromicina. Se caracteriza por lesión de la célula epitelial glomerular con

morfología de cambios mínimos, aunque en el modelo de puromicina hay una cierta infiltración glomerular por células mononucleares <sup>4,13,14</sup>. Ambos modelos son autolimitados, aunque la administración repetida de las drogas origina una glomerulosclerosis focal y segmentaria con síndrome nefrótico persistente.

## Enfermos

La biopsia renal es un método invasivo que suele realizarse sólo cuando es imprescindible un diagnóstico preciso y proporciona una escasa cantidad de tejido. Por esta razón, hasta la fecha sólo han sido rutinariamente realizados estudios morfológicos e inmunohistoquímicos. Sin embargo, las técnicas de hibridación *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten el estudio de la expresión génica en biopsias renales, lo que abre una nueva puerta en el diagnóstico clínico a nivel molecular.

A diferencia del tejido renal, la sangre y la orina pueden ser obtenidas en cantidad suficiente sin grandes molestias para el paciente, pero la información que aportan es, en el tema que nos ocupa, escasa.

## B) TÉCNICAS DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE RELEVANCIA PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES GLOMERULARES

Comentaremos algunas de las técnicas que han permitido estudiar los mecanismos de acumulación y depleción celular, la regulación de la expresión de genes y proteínas, la función de éstos, así como la búsqueda de nuevos factores implicados en el daño renal.

### Proliferación y muerte celular

El acúmulo de células en el glomérulo caracteriza a diversas formas de daño glomerular. La evolución crónica lleva con frecuencia a una disminución de la celularidad y obsolescencia glomerular. Las variaciones en el número de células dependen del equilibrio entre proliferación y muerte celular: Existen dos formas fundamentales de muerte celular, la apoptosis y la necrosis <sup>15</sup>. La apoptosis es una muerte fisiológica, que ocurre durante el funcionamiento normal del organismo, que requiere la participación activa de la propia célula («suicidio celular») mediante la activación de un programa genético (muerte celular programada). El hecho de que la célula apoptótica sea eliminada rápidamente por células adyacentes, y que esta forma de muerte ocurra de forma parcheada, ha dificultado su estudio. La necrosis suele estar oca-

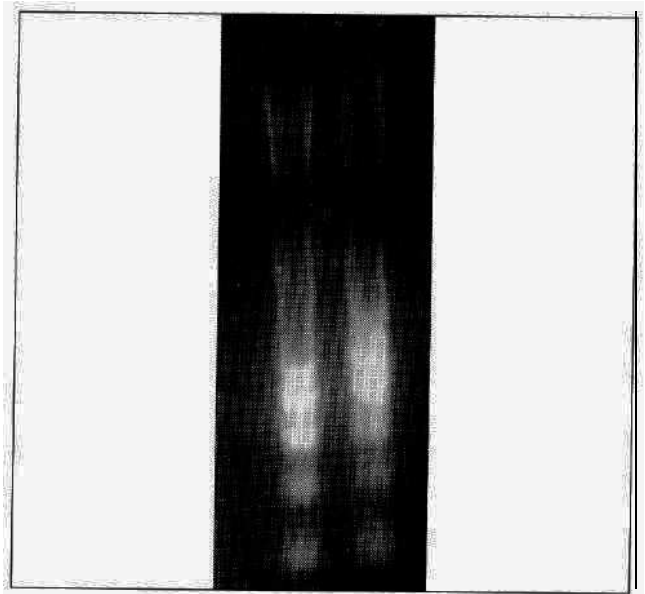
sionada por estímulos intensos, claramente patológicos, como la isquemia prolongada, y se asocia con lisis de la célula y afecta a células adyacentes. En la actualidad estamos investigando el papel respectivo de necrosis y apoptosis en el daño glomerular, así como los genes que regulan la ocurrencia de esta última <sup>16-18</sup>

En condiciones normales, el recambio celular del glomérulo es muy bajo y tan sólo ocasionalmente se observan divisiones celulares. Sin embargo, durante el daño glomerular son frecuentes las alteraciones de los índices de mitosis y muerte celular, que si no están acoplados conducen a variaciones en la dotación celular del glomérulo. La migración de células, como leucocitos y, posiblemente, fibroblastos, también colabora a los cambios de la celularidad glomerular.

Existen técnicas para estudiar el recambio celular *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* las células se pueden contar al microscopio o pueden ser cuantificadas por métodos colorimétricos, como la tinción con cristal violeta. La proliferación celular se puede cuantificar en cultivo y en el animal entero mediante la incorporación en el DNA sintetizado durante la mitosis de nucleótidos marcados (en la denominación de los ácidos nucleicos se ha preferido mantener la terminología inglesa [DNA, RNA] por su reconocido empleo). Otros métodos de medida de la proliferación celular están basados en la detección de factores asociados con fases concretas del ciclo celular, como el PCNA (antígeno nuclear ciclina relacionado con proliferación).

Existen, asimismo, varios métodos para cuantificar la muerte celular, que no distinguen entre apoptosis y necrosis. Entre éstos están la exclusión de colorantes vitales como el azul tripán o el propidio de yodo, la liberación de marcadores como el <sup>51</sup>Cr y estudios metabólicos.

Para definir la apoptosis hace falta que existan, al menos, criterios morfológicos y funcionales. La clásica morfología apoptótica de pérdida de tamaño celular, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo se puede observar por microscopía óptica y electrónica y con tinciones de ácidos nucleicos. Además, origina patrones característicos en el análisis con citometría de flujo <sup>19</sup>. Desde el punto de vista funcional, la apoptosis se caracteriza por degradación internucleosomal del DNA, que puede ser observado por electroforesis de DNA genómico extraído de esas células (fig. 3) o, en secciones tisulares, con técnicas basadas en la incorporación de nucleótidos marcados en el DNA fragmentado <sup>20</sup>. Adicionalmente, el DNA fragmentado se puede cuantificar por técnicas calorimétricas o marcando previamente la célula con timidina tritiada.



**Fig. 3.-Electroforesis en gel de agarosa de DNA genómico obtenido de células epiteliales tubulares proximales tratadas con TNF $\alpha$ . Observese la escalera de DNA, cuyos peldaños están formados por fragmentos de DNA de 780 pares de bases (peldaño inferior) o múltiplos. Este patrón corresponde a la degradación internucleosomal de DNA característico de la muerte celular por apoptosis.**

### Expresión de genes

La expresión de genes a nivel de RNA puede ser cuantificada por diversas técnicas. La utilización de sondas de ADN o RNA complementarias al ARN a estudiar es la base del Northern blot, ensayo de *protección de RNAsa*, y *dot blot* (fig. 4) <sup>1,21</sup>. Estas son técnicas relativamente sencillas y ampliamente utilizadas. Todas ellas requieren cantidades relativamente elevadas de la muestra de RNA.

La *transcripción inversa acoplada a PCR* (RT-PCR) consiste en la síntesis de un DNA complementario (cDNA) a un RNA, que posteriormente es amplificado con la ayuda de «primers» específicos. Esta técnica es extremadamente sensible y permite estudiar la expresión de un gen a partir de pequeñas muestras como glomérulos o túbulos individuales <sup>22</sup>. Sin embargo, es difícil de estandarizar a fin de obtener resultados cuantitativos. En nuestro laboratorio hemos utilizado repetidamente esta técnica para la fabricación de sondas (fig. 5) <sup>16-18</sup>.

La *hibridación in situ* permite el estudio de la expresión de genes a nivel de células individuales en secciones histológicas. Está también basada en la complementariedad de la sonda de DNA que se emplea con el RNA que se quiere estudiar, y permite determinar las células responsables de la expresión de un determinado gen <sup>23</sup>.

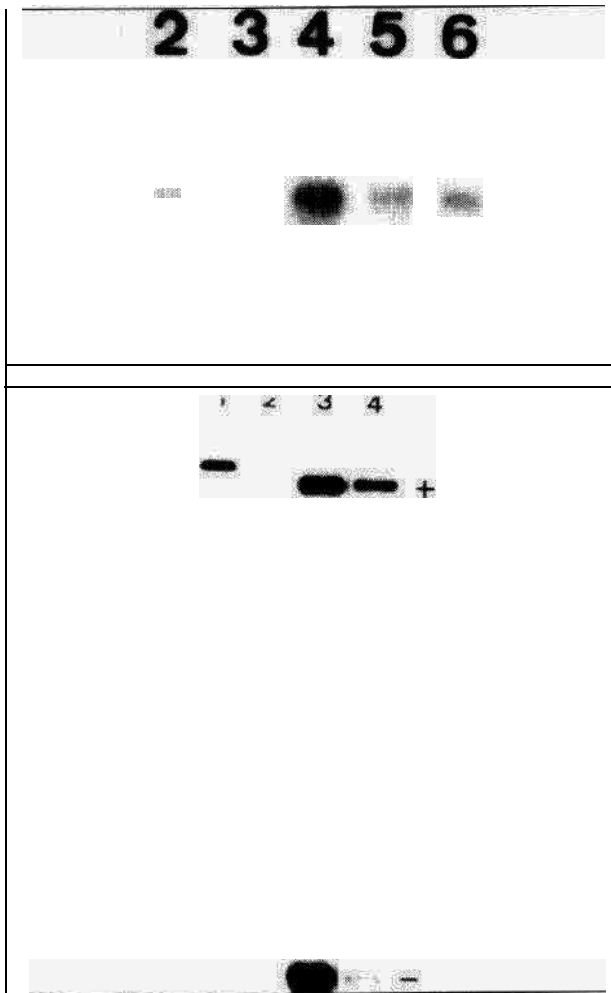


Fig. 4.-A) Northern-blot de RNA de células mesangiales en cultivo estimuladas con diferentes citocinas. (De izquierda a derecha: basal, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , PDGF-BB, bFGF). El blot fue hibridado con una sonda para fibronectina. B) Ensayo de protección por ribonucleasas: se diseñó una ribosonda para detectar el exón IIIIB del gen de la FN, susceptible de sufrir un procesamiento (splicing) alternativo. La ribosonda detecta la presencia (+) o ausencia (-) de dicho exón. Línea 1: ribosonda sin digerir; línea 2: control negativo (RNA transferente de levadura); línea 3: RNA de células mesangiales de rata; línea 4: RNA de células epiteliales glomerulares. Las células mesangiales expresan preferentemente mRNA que incluye el exón IIIIB, al contrario que las células epiteliales glomerulares.

Tanto la RT-PCR como la hibridación in situ, así como técnicas híbridas de PCR-hibridación in situ, pueden ser aplicadas a pequeñas muestras de tejido como biopsias renales. Un método de RT-PCR cuantitativo fue empleado por el grupo de Striker y cols. para demostrar la presencia de mRNA para colágeno I, así como la elevación de los niveles de mRNA para colágeno IV, en glomérulos aislados de ratones transgénicos para la hormona del crecimiento <sup>22</sup>. La hibri-

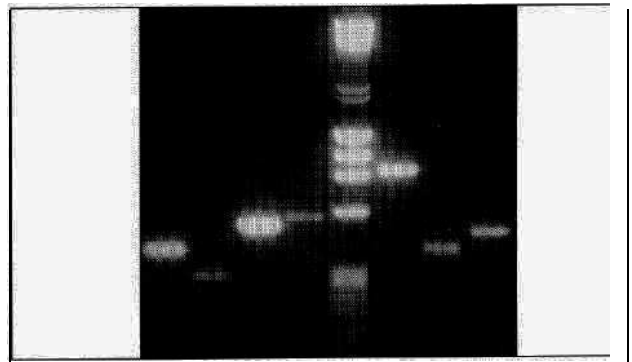


Fig. 5.-Productos de RT-PCR separados en un gel de agarosa. Estos productos corresponden a genes que regulan la presencia de apoptosis, expresados en células tubulares renales. De izquierda a derecha: bc12, bclx, bax, p53, marcadores de peso molecular, Fas, tcl30 y clusterina. A fin de confirmar su identidad es aconsejable secuenciar los productos obtenidos.

dación in situ ha permitido demostrar la expresión de mRNA de diversas citocinas tanto por células mesangiales como por leucocitos infiltrantes en glomérulos de pacientes con nefropatía IgA <sup>23</sup> y en otras glomerulopatías, confirmando la capacidad de las células renales intrínsecas para participar en la inflamación glomerular.

#### Síntesis de proteínas

Las células son capaces de responder a estímulos solubles de diversa naturaleza y de interactuar con proteínas de su entorno extracelular y con otras células a través de receptores específicos presentes en la membrana celular. El análisis de proteínas permite identificar si un determinado factor es o no sintetizado, la cantidad que está siendo producida y su velocidad de síntesis <sup>1,24</sup>. Nos referiremos a algunas de las técnicas bioquímicas que permiten responder a estos interrogantes.

**Electroforesis:** La electroforesis permite la separación de proteínas en virtud de su peso molecular o tamaño y así obtener información sobre los cambios ocurridos en los niveles de proteína. La técnica consiste en someter a una mezcla de proteínas (en nuestro caso un medio de cultivo procedente de células o un homogenizado de tejido renal) a un campo eléctrico. Las proteínas son desnaturalizadas por calor y aplicadas a un gel poroso de poliácridamida (PAGE) que contiene SDS (dodecil sulfato sódico). El SDS se une a las proteínas confiriéndoles una carga negativa, proporcional al tamaño de la proteína. La aplicación de un campo eléctrico hace migrar las proteínas cargadas negativamente hacia el electrodo positivo. La distancia recorrida por cada proteína será inversa-

mente proporcional al tamaño de ésta. Finalizado el proceso, el gel se tiñe para visualizar las bandas de proteínas. Las bandas no pueden ser identificadas como una proteína en particular; sin embargo, su patrón de migración es clave para su identificación. De este modo podemos detectar la presencia o ausencia de una determinada banda y si ésta aumenta o disminuye en el tiempo o con la adición de diferentes estímulos. Si deseamos identificar una proteína concreta, será necesario utilizar anticuerpos específicos y realizar ensayos de Western-blot y/o inmunoprecipitación.

**Marcaje metabólico:** El marcaje metabólico de células es una técnica muy utilizada para conocer las proteínas que están siendo sintetizadas de novo. Consiste en añadir al medio de cultivo un precursor radiactivo que se incorporará a la molécula que queremos determinar a medida que ésta vaya siendo sintetizada. El tipo de precursor utilizado depende de la naturaleza del producto a estudiar. De este modo, utilizaremos un aminoácido para estudiar proteínas (usualmente metionina marcada con  $^{35}\text{S}$ )<sup>25</sup> y sulfato inorgánico para detectar proteoglicanos. En el caso de las proteínas, éstas pueden ser almacenadas por la célula, secretadas al medio o depositadas en la matriz extracelular. El material que contiene las proteínas radiomarcadas es entonces sujeto a electroforesis SDS-PAGE o inmunoprecipitada y sometida posteriormente a electroforesis (ver más adelante). El gel seco es expuesto a una película de rayos X que será impresionada por la radiación. Esta película impresionada se llama autorradiografía o fluorografía y consistirá en un conjunto de bandas correspondiente a aquellas proteínas que han sido sintetizadas durante el período de incubación.

**Inmunoprecipitación:** Esta técnica permite aislar una proteína determinada que es reconocida por un anticuerpo específico. La mezcla de proteínas en solución es incubada con el anticuerpo. Tras este período de incubación los complejos proteína-anticuerpo son incubados con proteína-A unida a bolitas de sefarosa. La proteína-A se une específicamente a las inmunoglobulinas formando un complejo ternario proteína-anticuerpo-proteína-A. Los complejos son lavados varias veces para eliminar uniones inespecíficas y sometidos a electroforesis. Si el material de partida proviene de un marcaje metabólico, la proteína es fácilmente detectada por autorradiografía. La intensidad de las bandas puede ser cuantificada mediante un densitómetro. En nuestro laboratorio hemos observado que la endotelina puede regular la síntesis de fibronectina en células mesangiales en cultivo. In vivo, la síntesis de fibronectina está elevada en glomérulos inflamados (fig. 6)<sup>25,26</sup>.

**Bioensayos:** En determinadas ocasiones la identificación de una proteína por sus cualidades immuno-

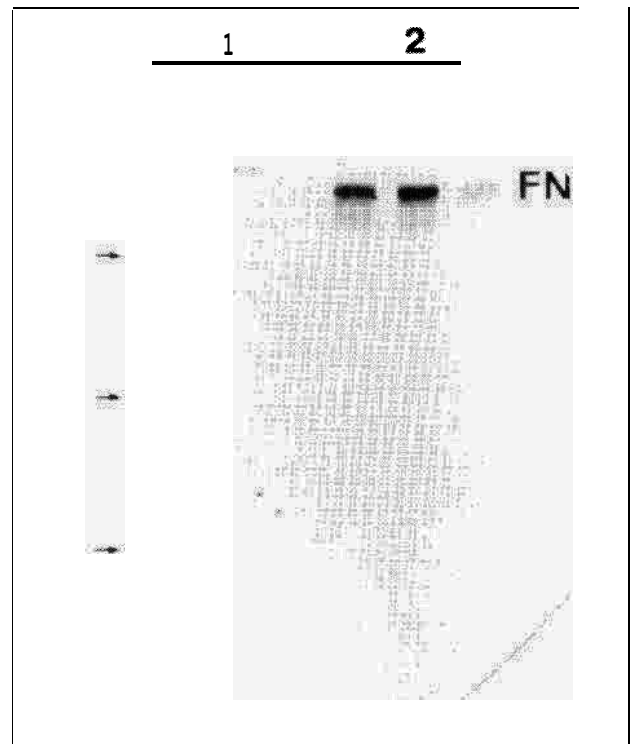


Fig. 6.-Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de fibronectina de glomérulos de ratas sanas (1) y ratas con enfermedad crónica del suero (2).

génicas no es suficiente. Existen técnicas que permiten conocer si una proteína es o no biológicamente activa. Los bioensayos utilizan líneas celulares que son sensibles a un determinado factor. Por ejemplo, el  $\text{TNF}\alpha$  es citotóxico sobre la línea celular L929, la IL-6 es imprescindible para la proliferación de la línea B9 y el  $\text{TGF}\beta$  es un inhibidor del crecimiento de una línea epitelial de pulmón. El  $\text{TGF}\beta$  constituye un ejemplo de la importancia que pueden tener los bioensayos, ya que puede encontrarse en forma activa o inactiva. La activación fisiológica del  $\text{TGF}\beta$  ocurre por eliminación de un pequeño trozo de la molécula por una endopeptidasa. La producción de  $\text{TGF}\beta$  bioactivo está aumentada respecto a controles en el modelo de glomerulonefritis proliferativa anti-MBG<sup>27</sup>. Tanto el córtex como los glomérulos produjeron actividad  $\text{TGF}\beta$ , que no aumentó cuando el medio condicionado fue tratado para activar el  $\text{TGF}\beta$  latente, indicando que casi todo el  $\text{TGF}\beta$  estaba en forma activa. Por el contrario, la actividad  $\text{TGF}\beta$  del medio condicionado de glomérulos controles alcanzó valores similares a los inflamados después del tratamiento de activación, indicando que en los riñones controles existe  $\text{TGF}\beta$  inactivo. Experimentos adicionales de-

mostraron también la presencia de un inhibidor del TGF $\beta$  en glomérulos normales <sup>27</sup>. Utilizando el bioensayo para el TNF $\alpha$  hemos demostrado que los glomérulos de ratas con enfermedad crónica del suero producen más TNF $\alpha$  que los controles y que el pico de máxima producción coincide con el inicio de la proteinuria<sup>10</sup>. Obtuvimos similares resultados con glomérulos de ratas con síndrome nefrótico de cambios mínimos <sup>4</sup>.

**Inmunohistoquímica:** Esta técnica permite identificar la presencia de una proteína en un tejido. El tejido es cortado en finas láminas e incubado con un anticuerpo frente a una proteína. Un segundo anticuerpo frente al primer anticuerpo es entonces añadido. El segundo anticuerpo está acoplado a una sustancia fluorescente o a una enzima que en presencia de un sustrato adecuado formará un compuesto coloreado. La muestra es entonces examinada en un microscopio de fluorescencia u óptico respectivamente. En colaboración con Daniel Serón y Francisco Mampaso hemos utilizado la inmunohistoquímica para caracterizar el infiltrado inflamatorio glomerular e intersticial en diversos modelos de glomerulonefritis experimentales <sup>10,14</sup>.

### Estudios funcionales de genes

Estudiar la función de algunas proteínas es relativamente sencillo. Por ejemplo, la adición de una citocina recombinante a células cultivadas permite conocer sus efectos sobre éstas, y este efecto se puede antagonizar por medio de anticuerpos o antagonistas específicos. Sin embargo, el estudio de la función de proteínas intracelulares es más difícil. La biología molecular permite incrementar o disminuir los niveles de estas proteínas mediante el empleo de técnicas antisentido y de transfección de genes, a fin de observar cambios en el fenotipo de las células. Las técnicas de terapia génica y de animales transgénicos y «knock-out» permiten ampliar estas observaciones al animal entero, así como estudiar el efecto de la hiperexpresión local o carencia de citocinas in vivo y establecer relaciones con los datos in vitro.

**Oligonucleótidos antisentido:** Son secuencias cortas de DNA que se unen por complementariedad, de forma específica, al RNA del gen a estudiar y, por diversos mecanismos, impiden la síntesis de la proteína correspondiente y aportan información sobre su función <sup>28</sup>. Estos oligonucleótidos se pueden emplear sin modificar o con diversas modificaciones que aumentan su vida media. Pueden ser utilizados in vitro e in vivo, si bien esto último plantea problemas que no han sido resueltos satisfactoriamente hasta el momento. La estrategia antisentido puede adoptar otras

formas. El DNA antisentido puede ser también un fragmento largo, incorporado a la célula mediante un plásmido (ver transfección de genes). Alternativamente se pueden emplear ribozimas, moléculas de RNA que se unen por complementariedad al RNA objetivo y que poseen una unidad catalítica que lo destruye. También se han diseñado oligonucleótidos que interaccionan con la doble cadena de DNA e impiden la transcripción o que se unen a e inactivan polimerasas y factores de transcripción <sup>28</sup>.

Recientemente se ha propuesto un papel para la colagenasa de tipo IV en la regulación del fenotipo de las células mesangiales con datos procedentes de este tipo de experimentos <sup>29</sup>. En efecto, las células mesangiales que expresaban de forma constitutiva un DNA antisentido frente al gen de la colagenasa, y que a consecuencia de esto carecían de esta enzima, poseían, en cultivo, un fenotipo similar al de las células mesangiales de glomérulos normales. El nuevo fenotipo difería del habitual fenotipo «inflamatorio» de las típicas células mesangiales en cultivo por ser quiescentes, con poca expresión de colágenos intersticiales y mayor expresión de colágeno tipo IV <sup>29</sup>.

**Transfección de genes:** Existen técnicas, como la coprecipitación del DNA con fosfato de calcio, para incorporar minigenes a células en cultivo de forma transitoria o, mediante la inclusión de marcadores selectivos en el vector empleado, a líneas celulares permanentes. Estas técnicas pueden ser utilizadas para estudiar la función del gen, mediante la unión de éste a un promotor fuerte que obligue a la célula a expresarlo en grandes cantidades (fig. 7). En la actualidad estamos poniendo a punto esta técnica para estudiar la participación en patología glomerular de los dos transcritos del gen bcl-x; esto es, bcl-xL, que protege de la muerte celular por apoptosis, y bcl-xS, que favorece la apoptosis <sup>30</sup>. También se puede unir el promotor del gen a estudiar a un gen marcador, cuyo producto sea fácilmente detectable y cuantificable. Para este fin se utiliza el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La cuantificación requiere demostrar la actividad enzimática mediante el empleo de sustratos marcados que son separados por cromatografía y autorradiografiados. Últimamente tiene más aceptación la luciferasa, cuantificable mediante un simple ensayo luminométrico. Esto permite estudiar la regulación transcripcional de genes poco abundantes. En la Universidad de Pennsylvania se han generado varios minigenes con diferentes fragmentos del promotor del colágeno IV. La incorporación de estos minigenes a células mesangiales y tubulares en cultivo permite, de una forma sencilla, estudiar la regulación transcripcional del colágeno IV <sup>31</sup>. De forma similar estamos caracterizando la regulación transcripcional de la intercrina RANTES <sup>32</sup>.

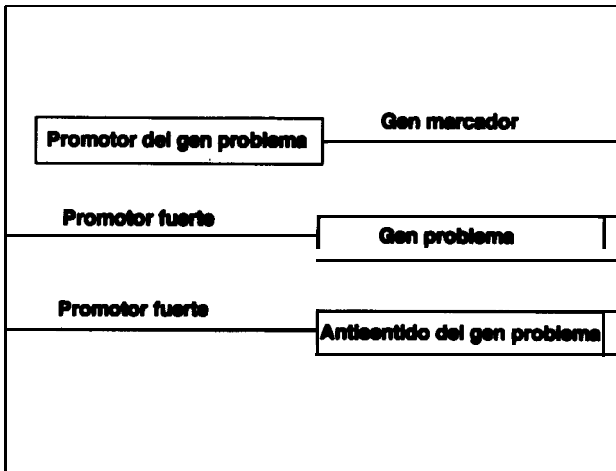


Fig. 7.-En la figura están representados distintos tipos de <minigén<u>esu</u> utilizables en estudios de transfección in vitro e in vivo y en la generación de animales transgénicos.

Existen técnicas para la incorporación de genes selectivamente en riñones. Ricardo Bosch demostró que es posible incorporar un gen marcador en células tubulares in vivo<sup>33</sup>. Para ello inyectó en el riñón un retrovirus, un vector que requiere que la célula esté proliferando, e indujo proliferación celular renal mediante la inyección de una dosis masiva de ácido fólico. Sin embargo, la proliferación de células renales en condiciones normales es mínima. Más recientemente se ha comunicado la utilización de células mesangiales como vector<sup>34</sup>. En este experimento células mesangiales portadoras del gen marcador beta-galactosidasa fueron inyectadas en la arteria renal. Como resultado, el 40 % de los glomérulos atraparon células mesangiales y se consiguió mantener la expresión del gen durante al menos 8 semanas. Es más, la expresión del gen se incrementó cuando se indujo proliferación mesangial mediante un anticuerpo anti-mesangial<sup>34</sup>. La utilización de la inyección en la arteria renal de liposomas también resultó en la expresión de grandes cantidades de TGFβ o PDGF-B en el 30-40 % de los glomérulos de riñones de rata, y condujo al desarrollo de glomerulosclerosis<sup>35</sup>. El efecto de la hiperexpresión de estos genes fue ya evidente al cabo de tres días y se caracterizó por un incremento en la celularidad y matriz mesangial<sup>35</sup>. La optimización de las técnicas de transfección de genes y de oligonucleótidos antisentido puede extender su utilidad más allá del estudio de la participación de citoquinas en patología glomerular y aportar una nueva modalidad terapéutica clínica en el futuro<sup>36,37</sup>.

Ratones transgénicos y «knock-OH». Los animales transgénicos (habitualmente ratones) expresan un gen introducido artificialmente en su genoma<sup>38</sup>. Para estudiar la función de un gen, éste se une a un promo-

tor potente, que provoca la hiperexpresión del gen. La elección del promotor puede dirigir la expresión del gen a una o varias estirpes celulares. Así, por ejemplo, la utilización del promotor de la insulina permite inducir la expresión de citoquinas selectivamente en los islotes pancreáticos<sup>39,40</sup>. Estos experimentos han demostrado que la hiperexpresión local de TNF induce insulinitis, pero no diabetes, y que el IFN induce ambas. En este sentido, la carencia de promotores totalmente específicos de células renales dificulta la aplicación de esta técnica al estudio de la patología renal. Sin embargo, existen ratones en los que el «transgén» se expresa entre otros órganos, en el riñón. La tabla I resume algunos ejemplos de patología glomerular inducida por la hiperexpresión local o sistémica de «transgenes»<sup>42-45</sup>. La hiperexpresión en linfocitos B de bcl-2, un gen que previene la apoptosis y aumenta la supervivencia celular, causa una activación policlonal de células B, y una glomerulonefritis proliferativa autoinmune similar a la lúpica<sup>46</sup>. Estos ratones pueden utilizarse como modelos experimentales de las citadas patologías.

**Tabla I.** Ratones transgénicos y «knock-out» de relevancia para el estudio de la patogenia de las enfermedades glomerulares

Ratones transgénicos con hiperexpresión del gen		
Gen	Función	Patología glomerular
Antígeno T grande del SV40	Gen viral	Glomerulosclerosis
Hormona del crecimiento	Hormona	Glomerulosclerosis
IL-6	Citocina	Proliferación mensangial Aumento de matriz
Pax-2	Factor de transcripción	Síndrome nefrótico congénito
HIV	Virus	Glomerulosclerosis
Transtirretina mutada	Proteína plasmática	Amiloidosis
bel-2	Previene apoptosis	Glomerulonefritis autoinmune
Ratones <knock-out>: no expresan el gen		
Gen	Función	Patología glomerular
1,7 Kb bcl-2	Desconocida Previene apoptosis	Glomerulosclerosis Poliquistosis renal Proliferación glomerular
MHC clase II	Reconocimiento inmune	No desarrolla nefritis lúpica

Los ratones transgénicos pueden diseñarse también para monitorizar la expresión de un gen problema. Para ello se inserta un minigén compuesto por el promotor del gen problema y un gen cuya expresión pueda ser fácilmente estudiada, incluso a nivel de células individuales, como el gen de la β-galactosidasa. La inducción de distintos modelos de nefropa-



tía en estos animales permite estudiar fácilmente la expresión del gen en distintas células renales. Un ejemplo son los ratones en los que el promotor del PDGF está unido al gen de la CAT, lo que permite monitorizar la activación de la expresión del PDGF en diversas situaciones patológicas<sup>47</sup>.

Los ratones «knock-out» están manipulados genéticamente de tal manera que no expresan, selectivamente, determinado gen. Cada vez es mayor el número de ratones «knock-out» para diversas citocinas y sus receptores. Quizá la primera sorpresa que han originado estos animales es que muchos de ellos son fenotípicamente normales, aun a pesar de que estudios previos habían sugerido un papel para la citocina en cuestión en el desarrollo normal. Esto podría deberse al solapamiento de las acciones de diversas citocinas y a la existencia de mecanismos compensadores. Sin embargo desconocemos estudios en los que se hayan inducido enfermedades renales a ratones carentes, por ejemplo, de TGF $\beta$ <sup>48</sup> o del receptor 55pTNFR<sup>49</sup>. Estos estudios podrían aportar información sobre la participación de estas y otras citocinas en el daño renal. Existen ya modelos en que la inactivación de un gen origina o previene la patología renal (tabla I)<sup>50-52</sup>. En el Laboratorio de Nefrología de la Universidad de Pennsylvania estamos trabajando en la actualidad en la puesta a punto de varios ratones transgénicos y «knock-out» que permitan estudiar más detalladamente los mecanismos de reclutamiento leucocitario en las nefritis, la fibrosis renal y la regulación de la supervivencia de las células renales.

Desde hace años se conoce la existencia de nefritis hereditarias humanas y experimentales. Estas enfermedades pueden ser, en algunos casos, modelos «knock-out» naturales, y la reciente caracterización de los genes alterados puede aportar información sobre el papel de éstos en el daño glomerular. El síndrome de Alport está ocasionado por diversas mutaciones en los genes que codifican las cadenas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  (autosómico recesivo) o  $\alpha 5$  (ligado a X) del colágeno IV<sup>53,54</sup>. La identificación de transcritos de colágeno IV en linfocitos circulantes puede facilitar el estudio, mediante RT-PCR, de mutaciones en los genes del colágeno IV en el síndrome de Alport. La «mutación lpr» acelera la nefropatía autoinmune de los ratones MRL. Esta «mutación» no es tal, sino el resultado de la inserción de un endotransposón en el segundo intrón del gen Fas, lo que altera su procesamiento (splicing) y conduce a la expresión de niveles muy bajos del receptor (el gen Fas es inductor de apoptosis en células T)<sup>55</sup>. Esto facilita la supervivencia de clones autoinmunes. Estudios de nuestro laboratorio sugieren que las células renales de estos ratones expresan niveles normales de mRNA de Fas (Ortiz y cols., manuscrito en preparación). Esto puede tener implicaciones para el mejor conocimiento de las enfermeda-

des humanas ocasionadas por transposones, así como para el estudio del papel del receptor Fas en patología renal.

### Búsqueda de nuevos genes

El capítulo de los genes que participan en el daño renal no está cerrado. Continúan descubriéndose moléculas cuyo papel puede ser fundamental para la patogenia de las glomerulonefritis.

Existen varios métodos para buscar nuevos genes. De entre ellos destacamos los basados en bibliotecas de cDNA y la PCR diferencial (differential display)<sup>56</sup>.

Las bibliotecas de cDNA se fabrican a partir de mRNA purificado de la muestra a estudiar. Esta puede ser una estirpe celular concreta con o sin estimulación, o un órgano o parte de un órgano en condiciones basales o de enfermedad. El estudio de una biblioteca de cDNA resultará en el aislamiento de uno o varios cDNAs, que se secuencian y se comparan con las secuencias de genes conocidos, depositadas en bases de datos como Cenbank. Ese cDNA puede ser utilizado como sonda para analizar la expresión de RNA y para el aislamiento del gen y de la región promotora a partir de bibliotecas de DNA genómico, para estudiar su función mediante técnicas de tranfección y para expresar la proteína en sistemas *in vitro* y producir anticuerpos que permitan caracterizar la expresión de la proteína. Existen varias estrategias de estudio de las bibliotecas de cDNA. La hibridación diferencial y la hibridación sustractiva permiten comparar dos bibliotecas de cDNA y buscar cDNAs que están presentes en una pero no en otra o que sean más abundantes en una que en otra, indicando diferencias en la expresión del mRNA (figura 8). Se pueden comparar, por ejemplo, fibroblastos y células tubulares, células mesangiales en condiciones basales o tras ser estimuladas por una citoquina, glomérulos de animales normales o con glomerulonefritis. Este método permitió la identificación de la proteína específica de fibroblastos FSP-1, obtenida de una biblioteca de fibroblastos renales, y que permitirá caracterizar el origen y papel patogénico de los fibroblastos en las glomerulonefritis<sup>57</sup>. La estrategia de búsqueda puede ser más selectiva. Así, por ejemplo, se puede utilizar una sonda de un gen conocido para buscar otros de la misma familia, o utilizar la sonda del gen de una especie para buscar el homólogo en otra especie. La sonda del RANTES (Scya 5) humano permitió clonar el cDNA de RANTES murino, a partir de una biblioteca de cDNA de células epiteliales tubulares<sup>58</sup>, y este cDNA, utilizado como sonda génica, ha permitido estudiar la participación de esta quemoquina en glomerulonefritis experimentales<sup>59</sup>. Asimismo se puede emplear un

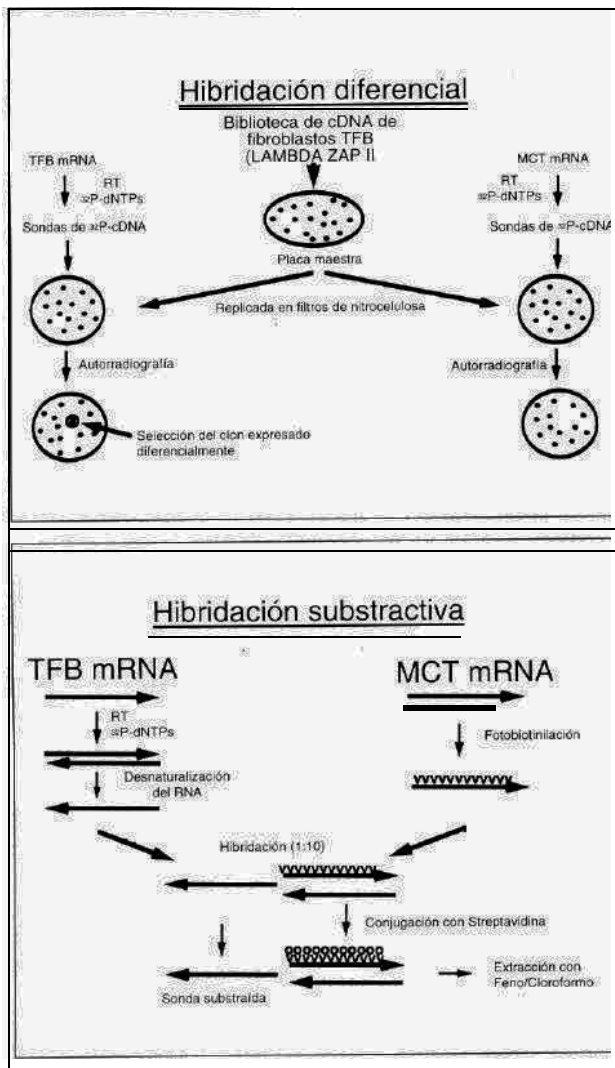


Fig. 8.-Esquema representativo de las técnicas de hibridación diferencial (A) y subtractiva (B) para la búsqueda de cDNAs expresados de forma diferente en dos bibliotecas de cDNA.

anticuerpo para buscar el gen que codifica su objetivo en una biblioteca de expresión. Este método ha sido utilizado para caracterizar el cDNA de la podocalixina, específica de las células epiteliales glomerulares<sup>60</sup>, así como para clonar el gen que codifica el autoantígeno de la glomerulonefritis membranosa experimental, gp330<sup>61</sup>.

La PCR diferencial<sup>56</sup> tiene la ventaja de que no requiere la creación inicial de una biblioteca de DNA, aunque ésta puede ser necesaria más adelante para caracterizar los productos de PCR aislados. Esta técnica emplea «primers» aleatorios, que suelen contener una cola de poli-A, de alrededor de 10 bases, para amplificar mRNA de las dos muestras a comparar, usando bases marcadas radiactivamente. Empí-

ricamente se ha determinado que esto amplificará unos 150 genes. Los productos de PCR son separados en un gel de poliacrilamida y autorradiografiados. El DNA de las bandas cuya densidad difiera entre las dos muestras es aislado y se puede emplear para secuenciarlo y como sonda para estudios de RNA y para búsquedas en bibliotecas de DNA. Las ventajas de esta técnica son la necesidad de poco ARN y la rapidez del aislamiento inicial de productos de PCR expresados de forma diferencial. Los problemas vienen a la hora de caracterizar los productos de PCR aislados. En nuestra experiencia y en la que fue presentada en la Reunión de la Sociedad Americana de Nefrología de 1993 por otros autores, con frecuencia no es posible encontrar un RNA que hibride con la sonda de PCR obtenida, lo que plantea la duda de si se trata de un gen poco expresado o de «basura» genética. Tan sólo el grupo de Brenner comunicó resultados prometedores con la aplicación de esta técnica al aislamiento de genes implicados en la hipertrofia renal compensadora postnecrectomía<sup>62</sup>, así como en el estudio de la patología mesangial<sup>63</sup>.

### C) PARTICIPACION DE CITOCINAS Y MATRIZ EXTRACELULAR EN LA PATOGENIA DEL DAÑO RENAL

El número de genes involucrados en patología glomerular ha ido en aumento en los últimos años. De entre éstos destacamos los que codifican las citocinas y proteínas de matriz extracelular.

Las citocinas engloban interleucinas, factores de crecimiento y hormonas (tabla II)<sup>64-67</sup>. Las citocinas ejercen su función a través de receptores específicos de membrana, que, a su vez, están sujetos a una compleja regulación. Las citocinas regulan la prolife-

Tabla II. Citocinas que podrían participar en el daño glomerular

TNF $\alpha$	NGF
IL-6	PDGF
TGF $\beta$	IL-8
IP-10	MCP-1
GM-CSF	IGF-1
M-CSF	

ración y supervivencia celular, la síntesis de proteínas de matriz y la producción y liberación de diversos mediadores inflamatorios, entre otros. Los componentes de la matriz extracelular, aunque menos estudiados, también pueden regular estas funciones, así como modular los efectos de las citocinas. En efecto, las proteínas de matriz extracelular (tabla III) no son un mero soporte físico de las células dentro

**Tabla III.** Proteínas de matriz extracelular glomerulares

Colágeno tipo IV	Laminina
Proteoglicanos	Nidogén/entactina
Osteonectina/SPARC/BM40	Amiloide P
Acetilcolinesterasa	Trombospondina
Fibronectina	vitronectina
Factor de Von Willebrand	

de los tejidos. Hoy sabemos que la matriz extracelular es una estructura extraordinariamente dinámica, cuyo equilibrio está controlado por un complejo balance entre síntesis y degradación, y que interacciona con las células a través de receptores específicos, regulando acciones tan importantes como la proliferación o la migración celular.

Los estudios in vitro con células renales en cultivo (células mesangiales, epiteliales y endoteliales) han permitido estudiar de una manera simplificada cuáles son los efectos de diversas citocinas y matriz sobre estas células y si éstos pueden ser sintetizados por células glomerulares intrínsecas y en respuesta a qué estímulos. Estudios in vivo han demostrado que los niveles renales o urinarios de varias citocinas están elevados durante el daño glomerular. Se ha propuesto, sin embargo, una serie de criterios adicionales para considerar que una citocina juega un papel en el daño renal, resumidos en la [tabla IV](#), y que son reminiscentes de los postulados de Koch para agentes infecciosos.

**Tabla IV.** Criterios sugeridos para implicar a una citocina en patología glomerular

1. Capacidad de tener un efecto relevante para la patología renal en células o tejidos.
2. Presencia de receptores funcionales en tejido o células renales recién aisladas.
3. Capacidad para inducir manifestaciones patológicas tras su administración in vivo o cuando se hiperexpresan en un animal transgénico.
4. Relación temporal entre la expresión de la citocina y la patología renal.
5. Atenuación o abolición de la enfermedad al neutralizar los efectos biológicos de la citocina.

## D) CONCLUSIONES

Prácticamente todos los conceptos actuales sobre la participación de citocinas y matriz extracelular en la patogenia del daño glomerular se deben a la aplicación de técnicas de biología celular y molecular. Estas técnicas han trascendido ya a la práctica clínica habitual en otros campos de la Nefrología, como por ejemplo el empleo de eritropoyetina humana recom-

binante. Sin embargo, y llamativamente, estos avances no se han materializado en innovaciones terapéuticas de aplicación clínica en las glomerulonefritis humanas. Desde el punto de vista experimental existen, sin embargo, prometedoras terapias basadas en nuestro entendimiento de la lesión glomerular, que pretenden ser más selectivas que los actuales inmunosupresores inespecíficos, como el empleo de anticuerpos frente a citocinas, receptores solubles y antagonistas de citocinas recombinantes, oligonucleótidos antisentido y terapia génica. Sólo el paso de los años permitirá saber si son merecedoras de las esperanzas puestas en ellas.

## Agradecimientos

Los trabajos de los autores citados en el texto han sido financiados por las ayudas o becas: FISS (91/162; 92/5277; 93/5389 y 94/370), Ministerio de Educación y Ciencia (PM 92/42), Fundación Renal y Fundación Conchita Rábago.

## Bibliografía

1. Miller DE, Noble NA, Yu X y Border WA: Molecular and cellular biological techniques in the study of glomerular diseases. *Semin Nephrol* 12:506-511, 1992.
2. Striker GE y Striker LJ: Biology of disease: glomerular cell culture. *Lab Invest* 53:122-131, 1985.
3. Gómez-Guerrero C, González E y Egido J: Evidence for a specific IgA receptor in rat and human mesangial cells. *Immunology* 151:7172-7181, 1993.
4. Gómez-Chiarri M, Ortiz A, Lerma JL, Mampaso F, González E y Egido E: Involvement of tumor necrosis factor and platelet activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab Invest* (en prensa).
5. Wolf G, Haberstroh U y Neilson EG: Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140:95-107, 1992.
6. McPherson BR, Leslie KO, Lizaso KV y Schwartz JE: Contractile cells of the kidney in primary glomerular diseases: an immunohistochemical study using an anti-alpha smooth muscle actin monoclonal antibody. *Hum Pathol* 24:710-716, 1993.
7. Chapman VM y Nadeau JH: The mouse genome: an overview. *Curr Opin Genet Dev* 2:406-411, 1992.
8. Hoedemaeker PJ, Aten J, Hogendoorn PC, Kawasaki K, Van Leer EH, De Heer E y Fleuren GJ: Pathogenesis of glomerulonephritis: experimental models revisited. *Adv Nephrol Necker Hosp* 20:73-90, 1991.
9. Sánchez Crespo M, Alonso F, Barat A y Egido J: Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane. *Cl in Exp Immunol* 49:631-638, 1982.
10. Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Alonso J, Lerma JL, Quirós J, Serón D, López-Armada MJ, González E y Egido J: Production and expression of cytokines and extracellular matrix, and PAF synthesis, in immune-complex proliferative glomerulonephritis. Effect of methylprednisolone and exogenous fibronectin. *J Am Soc Nephrol* 3:609, 1992. (Abstract.)

## A. ORTIZ y cols.

11. Quirós J, González-Cabrero J, Egido J, Herrero-Beaumont G y Martínez-Montero MJ: Beneficial effect of fibronectin administration on chronic serum sickness in rats. *Arthritis Rheum* 33:685-692, 1990.
12. Ortiz A, Egido J, Gómez-Chiarri M, Bustos C, Alonso J y González E: La participación de citoquinas y matriz extracelular en la progresión del daño renal. *Nefrología* 15:22-32, 1992.
13. Egido J, Robles A, Ortiz A, Ramírez F, González E, Mampaso F, Sánchez Crespo M, Braquet P y Hernando L: Role of platelet activating factor in Adriamycin-induced nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 138:119-123, 1987.
14. Mampaso FM, Egido J, Martínez Montero JC, Bricio T, González E, Cobo ME, Pirotzky E, Braquet P y Hernando L: Interstitial mononuclear cell infiltrates in experimental nephrosis: effect of PAF antagonists. *Nephrol Dial Transplant* 4:1037-1 044, 1989.
15. Ortiz A y Neilson EG: Apoptosis or programmed cell death: toward a new therapeutic approach to renal disease? (sometime a publicación).
16. Ortiz A, Karp SL, Danoff TM y Neilson EG: Expression of survival promoting bc1 2 oncogene by renal cells and whole kidney. *J Am Soc Nephrol* 4:742, 1993. (Abstract).
17. Ortiz A y Neilson EG: Apoptosis-related Fas mRNA is expressed by renal cells and increased in renal damage. *J Am Soc Nephrol*, 4:496 1993. (Abstract).
18. Ortiz A, Karp SL y Neilson EG: Clusterin (SGP2) mRNA expression by mesangial cells and its regulation by cytokines. *J Am Soc Nephrol* 4:626, 1993. (Abstract).
19. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F y Riccardi C: A rapid method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279, 1991.
20. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H y Lassmann H: Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 41:1023-1030, 1993.
21. Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Press, 1989.
22. Peten EP, Striker LJ, García-Pérez A y Striker GE: Studies by competitive PCR of glomerulosclerosis in growth hormone transgenic mice. *Kidney Int* (Supl. 39):S55-S58, 1993.
23. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Yagi K, Miyazato H, Matsushima K y Maki S: In situ expression of cytokines in IgA nephritis. *Kidney Int* 44:825-833, 1993.
24. Harlow E y Lane D: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Press, 1988.
25. Alonso J, Ortiz A, López-Armada MJ, Serón D, Condom E, Gómez-Chiarri M, González E y Egido J: Modifications in the glomerular patterns of fibronectin isoforms in rats with chronic nephritis. A possible regulatory role of cytokines. *J Am Soc Nephrol* 4:645, 1993. (Abstract).
26. Ruiz-Ortega M, Gómez-Garre D, Palacios I, Bustos C, González S, González E y Egido J: Effect of angiotensin II and endothelin on matrix protein synthesis by cultured mesangial cells. A complicated network of interactions. *J Am Soc Nephrol* 4:664, 1993. (Abstract).
27. Coimbra T, Wiggins R, Noh IW, Merritt S y Phan SH: Transforming growth factor beta production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am J Pathol* 138:223-234, 1991.
28. Ghosh MK y Cohen JS: Oligodeoxynucleotides as antisense inhibitors of gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 42:79-1 26, 1992.
29. Turck J, Pollock AS, Lee LK y Lovett DH: Probing the biologic role of type IV collagenase: an antisense approach. *J Am Soc Nephrol* 4:668, 1993. (Abstract).
30. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Núñez G y Thompson CB: bel-x, a bc1-2-related gene that functions as a dominant regulator of cell death. *Cell* 74:597-608, 1993.
31. Fumo P, Kuncio GS y Zidaveh FN: A reporter mesangial cell line transfected with alfa 1 (IV) collagen minigene: evidence for transcriptional activation by high glucose levels. *J Am Soc Nephrol* 4:794, 1993. (Abstract).
32. Danoff TM, Chiang MY, Ortiz A y Neilson EG: Transcriptional regulation of murine RANTES in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol*, 4:599 1993. (Abstract).
33. Bosch RJ, Woolf A y Fine LG: Gene transfer into the mammalian kidney: direct retrovirus transduction of regenerating tubular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1:49-54, 1993.
34. Kitamura M, Taylor S, Shimizu F y Fine LG: Gene transfer into the glomerulus via a mesangial cell vector. *J Am Soc Nephrol* 4:468, 1993. (Abstract).
35. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T y Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92:2597-2601, 1993.
36. Miller AD: Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455-460, 1992.
37. Anderson WF: Human gene therapy. *Science* 256:808-813, 1992.
38. Striker LJ, Doi T y Striker GE: Transgenic mice in renal research. *Adv Nephrol Necker Hosp* 20:91-1 08, 1991.
39. Picarella DE, Kratz A, Li CB, Ruddle NH y Flavell RA: Transgenic tumor necrosis factor alpha production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes. Distinct patterns of inflammation in TNF-alpha and TNF-beta transgenic mice. *J Immunol* 150:4136-4150, 1993.
40. Sarvetnick N, Shizuru Jy Liggitt D: Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* 346:844-847, 1990.
41. Horii Y, Iwano M, Hirata E, Shiiki M, Fujii Y, Dohi K y Ishikawa H: Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* (Supl. 39):S71-S75, 1993.
42. Dressler CR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simins L y Westphal H: Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 362:65-67 1993.
43. Tashiro F, Yi S y Wakasugi S: Role of serum amyloid P component for systemic amyloidosis in transgenic mice carrying human mutant transthyretin gene. *Gerontology* (Supl. 37):1:56-62, 1991.
44. Dickie P, Felser Jy Eckhaus M: HIV-associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes. *Virology* 185:109-119, 1991.
45. MacKay K, Striker LJ, Stauffer JW, Agodoa LY y Striker GE: Relationship of glomerular hypertrophy and sclerosis: studies in SV40 transgenic mice. *Kidney Int* 37:741-748, 1990.
46. Strasser A, WS, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S y Harris AW: Enforced bel-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8661-8665, 1991.
47. Fries JW y Collins T: Platelet-driven growth factor expression in a transgenic model. *Kidney Int* 41:584-589, 1992.
48. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Djebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G y Calvin D: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor beta-1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699, 1992.
49. Pfeffer K, Matsuura T y Kundig TM: Mice deficient for the 55p tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73:457-467, 1993.

50. Weiher H, Noda T, Gray DA, Sharpe AH y Jaenisch R: Transgenic mouse model of kidney disease: insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell* 62:425-434, 1990.
51. Veis DJ Sorenson CM, Shutter JR y Korsmeyer SJ: Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240, 1993.
52. Jevnikar AM, Grusby MJ y Grincher LH: MHC class II deficient MRL-lpr mice do not develop autoimmune lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 4:608, 1993. (Abstract).
53. Mochizuki T, Pirson Y y Reeders ST: Identification of mutations in the  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  type IV collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 4:819, 1993. (Abstract).
54. Trygvason K, Zhou J, Hostikka SL y Shows TB: Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int* 43:38-44, 1993.
55. Kobayashi S, Hirano T y Kakinuma M: Transcriptional repression and differential splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune LPR mice. *Biochem Biophys Res Commun* 19:617-624, 1993.
56. Liang P y Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971, 1992.
57. Strutz F, Tomaszewski J, Heeger PH, Karp SL y Neilson EG: Generation of a murine fibroblast-specific antibody. *J Am Soc Nephrol* 4:666, 1993. (Abstract).
58. Heeger PS, Wolf G, Meyer CM, Sun MI, O'Farrel SC, Krensky A y Neilson EG: Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelial cells encoding murine rantes. *Kidney Int* 41:220-225, 1992.
59. Wolf C, Aberle S y Thaiss F: TNF  $\alpha$  induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int* 44:795-804, 1993.
60. Kershaw D, Thomas P, Goyal M, Wharram B, Wiggins J y Wiggins R: Isolation of glomerular epithelial cell podocalyxin cDNA. *J Am Soc Nephrol* 4:610, 1993. (Abstract).
61. Luca ME, Geus B, Sahali DJ, Verroust P y Heer E: Molecular cloning and sequencing of cDNA coding for gp330, the autoantigen involved in Heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol* 4:617, 1993. (Abstract).
62. Kojima R, Troy J, Brenner BM y Gullans SR: Identification and characterization of novel genes induced by uninephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 4:774, 1993. (Abstract).
63. Matsubara M, Kojima R, Brenner BM, Gullans SR y Brady HR: Analysis of differential expression of mesangial cell mRNAs during hyperglycemia. *J Am Soc Nephrol* 4:798, 1993. (Abstract).
64. Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Bustos C, Alonso J, Gómez-Guerrero C, Gómez-Garre D, López-Armada MJ, González E y Egido J: The role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of glomerular diseases. *Adv Nephrol Necker Hosp (en prensa)*.
65. Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Bustos C, Alonso J, Gómez-Guerrero C, González E y Egido J: The potential role of inflammatory mediators and fibrogenic cytokines in the pathogenesis of glomerular diseases. *J Lipid Med (en prensa)*.
66. Abboud HE: Growth factors in glomerulonephritis. *Kidney Int* 43:252-267, 1993.
67. Gómez-Chiarri M, Ortiz A, Serón D, González E y Egido J: The intercrine superfamily and renal disease. *Kidney Int (Supl)* 39:S81-S85, 1993.