



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio comparativo de glomerulopatías en caninos y en humanos: Una aproximación morfológica y molecular

Paula Cristina Esquinas Castillo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Posgrado en Ciencias Salud Animal
Bogotá, Colombia
2020

Estudio comparativo de glomerulopatías en caninos y en humanos: Una aproximación morfológica y molecular

Paula Cristina Esquinas Castillo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Salud-Animal

Directora:

MV, MsC, Ph.D. Ligia Mercedes Jiménez Robayo

Codirector:

Doctor Rafael Enrique Andrade Pérez

Línea de Investigación:

Genética Animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Genética Animal GIGA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Posgrado en Ciencias Salud Animal

Bogotá, Colombia

2020

*Nadie nos prometió un jardín de rosas
Hablamos del peligro de estar vivos...*

A mis padres...

*Volverás a mi huerta y a mi higuera,
por los altos andamios de las flores
pajareará tu alma colmenera
de angelicales ceras y labores.
Volverás al arrullo de las rejas
de los enamorados labradores.
Al alma del almendro de nata te requiero,
que tenemos que hablar de muchas cosas,
compañero del alma, compañero.*

Miguel Hernández

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Posgrado en Salud y Producción Animal, al Instituto de Genética y al Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Departamento de Patología y Laboratorios, por permitir el desarrollo del presente trabajo de doctorado.

A todos los docentes, maestros y profesores con los que tuve algún contacto y que aportaron en la realización de este trabajo. A los tutores Rafael Andrade, Ligia Jiménez y muy especialmente a María Mercedes Torres (q.e.p.d.) por todas sus enseñanzas y cariño. A mis compañeros y amigos del laboratorio de citogenética por todos los buenos y malos momentos y su inmenso apoyo durante este tiempo, Andrea, Joel, Luisa M, Luisa T, Gonzalo y el doctor Carlos S. Un agradecimiento gigante por el apoyo invaluable recibido de los profesores Lucia Botero, Jairo Jaime y Diana Susana Vargas. A mis amigas del alma por todo lo que hacen por mí.

Y finalmente todo se lo debo a mi familia, a la familia grande, a los que están y especialmente a los que ya no están aquí... y sobre todo la familia pequeña, sin los que no hubiera logrado nada, muchas gracias por su enorme apoyo y amor infinito: Jairo, Emiliano y Luisa.

Resumen

Las glomerulopatías son consideradas actualmente como una de las causas más importantes de la falla renal crónica tanto en humanos como en caninos. Estas pueden ser inducidas por una enfermedad renal primaria, por mutaciones genéticas o por glomerulopatías secundarias ocasionadas por enfermedades sistémicas como el lupus, infecciones, tumores o como respuesta a medicamentos. Las glomerulopatías provocan importante morbilidad y mortalidad y son un factor potencialmente prevenible de enfermedad renal en etapa terminal en todas las especies, por lo que se considera vital la realización de un diagnóstico temprano. La manifestación clínica típica de las glomerulopatías es la proteinuria, la cual implica la falla del proceso de filtración glomerular. En el presente trabajo se realizó un estudio histopatológico complejo sobre especímenes renales de caninos y una posterior medición a nivel estructural y génico de las proteínas podocina, nefrina, alfa actinina-4 y factor de crecimiento transformante beta-1 en biopsias renales de humanos y de los tejidos caninos, con el fin de comparar los diferentes mecanismos de lesión podocitaria. Los resultados permitieron definir tres grupos de afecciones renales con daños glomerulares en los caninos: Displasia renal, glomeruloesclerosis focal y segmentaria y glomerulonefritis. Se determinó alto grado de similitud entre la estructura glomerular de las dos especies. Adicionalmente se pudo definir que existen cambios en la expresión y en la localización de las proteínas del diafragma de filtración y del citoesqueleto como respuesta del podocito a diferentes injurias. Se pudo determinar que la patogenia de las glomerulopatías en caninos y en humanos muestra mecanismos similares de lesión y que se puede considerar un modelo adecuado de enfermedades glomerulares espontáneas.

Palabras clave: biopsia renal, caninos, glomerulopatías, podocitos, proteínas

Abstract

Glomerulopathies are currently considered one of the most important causes of chronic renal failure in both humans and dogs. These can be induced by a primary kidney disease, by genetic mutations or by secondary glomerulopathies caused by systemic diseases such as lupus, infections, tumors or in response to medications. Glomerulopathies cause significant morbidity and mortality and are a potentially preventable factor of end-stage renal disease in all species, so early diagnosis is considered vital. The typical clinical manifestation of glomerulopathies is proteinuria, which implies the failure of the glomerular filtration process. In the present work, a complex histopathological study on renal specimens of canines was carried out and a subsequent structural and gene level measurement of podocin, nephrine, alpha actinin-4 proteins and transforming growth factor beta-1 in human kidney biopsies and canine tissues, in order to compare the different mechanisms of podocyte injury. The results allowed to define three groups of renal conditions with glomerular damage in the canines: renal dysplasia, focal and segmental glomerulosclerosis and glomerulonephritis. High degree of similarity was determined between the glomerular structure of the two species. Additionally, it was possible to define that there are changes in the expression and location of the filtration diaphragm and cytoskeleton proteins as a response of the podocyte to different injuries. It was determined that the pathogenesis of glomerulopathies in canines and humans shows similar mechanisms of injury and that can be considered an adequate model of spontaneous glomerular diseases.

Keywords: canines, glomerulopathies, podocytes, renal biopsy, podocyte proteins

Contenido

	Pág.
Introducción.....	1
1. Glomerulopatías en caninos y en humanos: marco teórico	3
2. Hallazgos histopatológicos, de ultraestructura y patrones de inmunofluorescencia en muestras renales de caninos con proteinuria en la ciudad de Bogotá.....	39
3. Expresión de nefrina, podocina, alfa-actinina y TGF-B1 en caninos y humanos con glomerulopatías	85
4. Discusión General.....	111
5. Conclusiones y recomendaciones.....	116

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1. Microfotografías animales grupo control	56
Figura 2-2. Microfotografías de muestras del grupo de GEFS.....	58
Figura 2-3. Microfotografías de tejidos de casos con displasia renal.....	60
Figura 2-4. Microfotografías de especímenes caninos con glomerulonefritis.....	62
Figura 3-1. IHQ con peroxidasa para proteínas podocitarias y TGFB1.....	93
Figura 3-2, Microscopía confocal. Localización y patrones de marcación de moléculas en perros y humanos.	95

Lista de gráficas

Gráfica 2-1. Número de frecuencias y porcentajes de la variable rango de edad	45
Gráfica 2-2. Interacción entre diagnóstico histopatológico y raza-tamaño	49
Gráfica 2-3. Interacción entre diagnóstico histopatológico y diagnóstico clínico	51
Gráfica 3-1. Intensidad de la marcación en pacientes sanos y con glomerulopatías para cada grupo de proteínas.....	94
Gráfica 3-2. Intensidad de la fluorescencia y colocalización de las proteínas en caninos	96
Gráfica 3-3. Niveles de expresión de los genes en caninos. Cuantificaciones ARNm.....	97

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Datos y características de los pacientes de las muestras obtenidas.....	42
Tabla 2-2. Número de frecuencias y porcentajes de la variable grado de proteinuria	45
Tabla 2-3. Número de frecuencias y porcentajes de la variable rango de edad	46
Tabla 2-4. Número de frecuencias y porcentajes de la variable raza-tamaño	46
Tabla 2-5. Número de frecuencias y porcentajes de la variable diagnóstico histopatológico	46
Tabla 2-6. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de proteinuria	47
Tabla 2-7. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grupo etario edad grupo	48
Tabla 2-8. Interacción entre diagnóstico histopatológico y raza-tamaño	49
Tabla 2-9. Interacción entre diagnóstico histopatológico y diagnóstico clínico	50
Tabla 2-10. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de afección de lesión mediante microscopía óptica	52
Tabla 2-11. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de afección de lesión mediante microscopía electrónica	53
Tabla 3-1. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia indirecta (IFI)	90
Tabla 3-2. Secuencias y condiciones de los primers utilizados en muestras renales de caninos.....	91
Tabla 3-3. Secuencias y condiciones de los primers utilizados en muestras renales de humanos	92

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α	Alfa		
β	Beta		

Abreviatura	Término
GP	Glomerulopatías
DF	Diafragma de filtración
MBC	Membrana basal capilar

Introducción

Los estudios de enfermedades renales en animales y humanos muestran diversos mecanismos degenerativos e inflamatorios, gobernados por cambios genéticos y epigenéticos implicados en su progresión y pronóstico, los cuales no están aun completamente entendidos. La mayoría de las glomerulopatías tienen una patogénesis compleja que involucra la interacción de diversos factores genéticos y ambientales asociados a cambios en los perfiles de expresión génica de los diferentes tipos de células involucradas (He, Chuang, Ma'Ayan, & Iyengar, 2012; Reddy, Park, & Natarajan, 2012).

La biopsia renal es una de las herramientas más importantes utilizadas para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con patología renal, ya que permite realizar el estudio histopatológico, ultraestructural e inmunológico y proporciona material para estudios genéticos. Las biopsias renales en humanos se evalúan rutinariamente con microscopía de luz (ML) utilizando un grupo de técnicas histológicas y coloraciones especiales, microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunofluorescencia (IF). En contraste, la evaluación en veterinaria se ha basado principalmente en ML y es de utilidad limitada por la falta de un estudio completo (Lees, Cianciolo, & Clubb, 2011; Liapis & Gaut, 2013).

Dentro de las nefropatías humanas, las glomerulopatías son las entidades más frecuentemente diagnosticadas en Colombia, siendo 59,8% formas primarias y 41.2% secundarias. Estas generalmente conllevan a pérdida progresiva de nefronas funcionales y terminan en insuficiencia renal crónica y Enfermedad Renal en Etapa Terminal (ERET). Esta última es considerada un problema de salud pública en el ámbito mundial, aumentando el riesgo de mortalidad y constituyendo un alto costo para cualquier sistema de salud, dado el requerimiento de tratamientos prolongados, costosos y de infraestructura y tecnología muy especializadas (Andrade et al., 2013; Serna et al., 2010).

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) progresa a ERET y puede aumentar el riesgo de desarrollo de enfermedades complejas como la diabetes y la hipertensión. Un aumento en el número de pacientes con ERC no sólo se ha observado en humanos sino también en animales de compañía, como resultado de las formas de vida y el envejecimiento. De modo

similar a los seres humanos, la ERC es una de las causas más común de muerte en perros y gatos (Ichii et al., 2011).

En nefrología, las enfermedades genéticas constituyen un problema de salud de primer orden, al representar una causa importante de morbimortalidad. Se estima que el 10-20% de los adultos con ERC tienen una enfermedad genética de base, cifra que se considera muy inferior a la real, ya que las enfermedades genéticas subyacentes están infra-diagnosticadas. Las nefropatías hereditarias más conocidas son las monogénicas, pero las más frecuentes son las complejas, entre las que se incluyen las asociadas a hipertensión, diabetes o a enfermedades autoinmunes (Guillén-Navarro, Ballesta-Martínez, & López-González, 2011).

Los modelos animales son herramientas esenciales para el estudio de los mecanismos de acción, las anomalías en los componentes individuales de las células y las vías implicadas en el desarrollo de las enfermedades. En años recientes, una variedad de modelos *in vivo* han sido desarrollados para dilucidar componentes genéticos de las enfermedades que son de vital importancia para el estudio del comportamiento de la enfermedad y la evaluación de nuevos enfoques (Tsai, Clark, & Murphy, 2007; Breen & Modiano, 2008; Simic, 2012).

El modelo canino ofrece numerosas ventajas con respecto a otros modelos animales de laboratorio, pero especialmente es de interés en el estudio de enfermedades complejas, puesto que generalmente comparte efectos ambientales similares por tener entornos comunes con el ser humano y por el aumento en la expectativa de vida (Gross & Kashtan, 2009; Rørtveit et al., 2012; Tsai et al., 2007).

Debido al avance de las tecnologías bioinformáticas para identificar especies moleculares, las interacciones con el genoma y la secuenciación, es teóricamente factible generar una imagen global de las funciones celulares en el riñón a partir de una perspectiva molecular y vincular el fenotipo clínico a las redes moleculares que gobiernan los cambios fisiopatológicos. Desde este punto de vista, se presenta la oportunidad de identificar las principales vías y genes operativos en la salud y la enfermedad y caracterizar los mecanismos que contribuyen a la respuesta fenotípica. Además, la capacidad de utilizar datos genómicos de una manera más asequible y rápida nos permite dilucidar mejor el papel de la variación genómica en la manifestación de la enfermedad en diversas condiciones ambientales (He et al., 2012; Iyengar, Freedman, & Sedor, 2007; Reddy et al., 2012).

1. Glomerulopatías en caninos y en humanos: marco teórico

Paula Esquinas, Ligia Jiménez

1.1 Resumen

Las glomerulopatías en el perro han adquirido recientemente gran importancia, no solo por la alta incidencia en caninos y en felinos, ya que son observadas frecuentemente en la clínica como una forma común de insuficiencia renal, sino por los esfuerzos para facilitar el reconocimiento temprano, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades proteinúricas renales 1–5. Entre las entidades clásicas que afectan a los glomérulos y que se consideran de mayor prevalencia en animales domésticos se encuentran las glomerulonefritis y la amiloidosis glomerular, sin embargo, actualmente se han descrito y diagnosticado otras que incluyen las glomeruloesclerosis y las nefropatías hereditarias 4,6,7.

La pérdida de proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, a través de los capilares glomerulares dañados resulta en proteinuria. Este es el signo clínico clásico de la enfermedad glomerular y cuando ésta se acompaña de hipoalbuminemia, hipercolesterolemia y edema o ascitis se denomina “síndrome nefrótico” 6–9. La evidencia sugiere que además de ser un marcador de enfermedad, la proteinuria persistente se asocia con lesiones glomerulares y tubulointersticiales progresivas 10–12.

Los mecanismos que subyacen a los orígenes y la progresión de las glomerulopatías no se han entendido completamente. La mayoría tienen una patogénesis compleja tanto en animales como en humanos y muestran diversos mecanismos degenerativos e inflamatorios, gobernados por cambios genéticos y epigenéticos implicados en su progresión y pronóstico 13,14. La biopsia renal es una de las herramientas más importantes utilizadas para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con patología renal,

ya que permite realizar el estudio histopatológico, ultraestructural e inmunológico y proporciona material para estudios genéticos. Las biopsias renales en humanos se evalúan rutinariamente con microscopía de luz (ML) utilizando un grupo de técnicas histológicas y coloraciones especiales, microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunofluorescencia (IF). En contraste, la evaluación en veterinaria se ha basado principalmente en ML y es de utilidad limitada por la falta de un estudio completo (Lees et al., 2011; Liapis & Gaut, 2013).

En nefrología, las enfermedades genéticas constituyen un problema de salud de primer orden, al representar una causa importante de morbilidad. Se estima que el 10-20% de los adultos con ERC tienen una enfermedad genética de base, cifra que se considera muy inferior a la real, ya que las enfermedades genéticas subyacentes están infra-diagnosticadas. Las nefropatías hereditarias más conocidas son las monogénicas, pero las más frecuentes son las complejas, entre las que se incluyen las asociadas a hipertensión, diabetes o a enfermedades autoinmunes (Guillén-Navarro, Ballesta-Martínez, & López-González, 2011).

Los modelos animales son herramientas esenciales para el estudio de los mecanismos de acción, las anomalías en los componentes individuales de las células y las vías implicadas en el desarrollo de las enfermedades. En años recientes, una variedad de modelos *in vivo* han sido desarrollados para dilucidar componentes genéticos de las enfermedades que son de vital importancia para el estudio del comportamiento de la enfermedad y la evaluación de nuevos enfoques (Tsai, Clark, & Murphy, 2007; Breen & Modiano, 2008; Simic, 2012).

El modelo canino ofrece numerosas ventajas con respecto a otros modelos animales de laboratorio, pero especialmente es de interés en el estudio de enfermedades complejas, puesto que generalmente comparte efectos ambientales similares por tener entornos comunes con el ser humano y por el aumento en la expectativa de vida (Gross & Kashtan, 2009; Rørtveit et al., 2012; Tsai et al., 2007).

Debido al avance de las tecnologías bioinformáticas para identificar especies moleculares, las interacciones con el genoma y la secuenciación, es teóricamente factible generar una imagen global de las funciones celulares en el riñón a partir de una perspectiva molecular y vincular el fenotipo clínico a las redes moleculares que gobiernan los cambios

fisiopatológicos. Desde este punto de vista, se presenta la oportunidad de identificar las principales vías y genes operativos en la salud y la enfermedad y caracterizar los mecanismos que contribuyen a la respuesta fenotípica. Además, la capacidad de utilizar datos genómicos de una manera más asequible y rápida nos permite dilucidar mejor el papel de la variación genómica en la manifestación de la enfermedad en diversas condiciones ambientales (He et al., 2012; Iyengar et al., 2007; Reddy et al., 2012).

1.2 Filtración renal, el glomérulo

El riñón es el órgano especializado en el mantenimiento del equilibrio hídrico y electrolítico. Es indispensable para la homeostasis corporal ya que lleva a cabo una serie de funciones vitales como el control de la osmolaridad, la excreción de desechos metabólicos y sustancias nocivas, además de la secreción de hormonas con acciones muy diversas como la eritropoyetina y la renina. Su unidad funcional se denomina nefrona, la cual consta de un glomérulo y un sistema tubular. El riñón forma la orina a partir del ultrafiltrado del plasma en el ovillo capilar o penacho glomerular a través de la barrera de filtración, la cual está constituida por tres capas: el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular (MBG) y la célula epitelial o podocito (Kawachi et al., 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010; Zhang et al., 2004).

El glomérulo se compone de tres tipos celulares principales, las células mesangiales, los podocitos y las células endoteliales. El mesangio proporciona el marco de la matriz extracelular sobre el cual se construye el glomérulo. Las células mesangiales tienen propiedades similares a las células musculares lisas, son capaces de regular el flujo capilar, además de llevar a cabo una función fagocítica con eliminación y degradación de algunos desechos del filtrado. Las células mesangiales juegan papeles importantes en muchas enfermedades renales, incluyendo la nefropatía diabética. Éstas son responsables de la acumulación de matriz extracelular y la expansión mesangial observada en la fibrosis glomerular, asociadas a cambios en los perfiles de expresión génica de estas células (Brunskill & Potter, 2012).

Una citoquina clave, íntimamente involucrada en la patogénesis de la glomeruloesclerosis y la fibrosis tubulointersticial, es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); este mediador estimula la producción de las proteínas de la matriz mesangial, mientras que al mismo tiempo actúa sobre la degradación de la matriz. La activación sostenida del TGF- β , como ocurre en la cicatrización renal, se traduce en un círculo vicioso de la deposición de matriz y la lesión tisular. La inhibición de la bioactividad de TGF- β atenúa el depósito de matriz extracelular (ECM) y la progresión de la fibrosis en injuria renal de tipo experimental. Sin embargo, la inhibición directa a largo plazo de esta citoquina en el entorno clínico, presenta varios problemas debido a que posee también actividad anti-proliferativa y anti-inflamatoria (Gupta, Clarkson, Duggan, & Brady, 2000).

El glomérulo renal en los mamíferos es un lecho vascular muy desarrollado que actúa como un tamiz, lo que permite la filtración de pequeñas moléculas, tales como agua, azúcares, electrolitos y proteínas pequeñas, las cuales pasan a través de una barrera que retiene las proteínas de alto peso molecular y las células de la circulación. El desarrollo adecuado y preservación de esta estructura durante toda la vida es esencial para la prevención de graves enfermedades. En los últimos años han ocurrido numerosos avances en la comprensión del desarrollo y la función glomerular. Los podocitos, las células epiteliales viscerales del glomérulo son ahora reconocidos como un tipo celular importante, cuya lesión puede iniciar la cicatrización glomerular. Varios trastornos genéticos renales son causados por mutaciones en genes que codifican proteínas que tienen funciones muy especializadas en los podocitos, especialmente en el mantenimiento de la barrera de filtración, que evita la pérdida masiva de proteínas de la circulación. La membrana basal glomerular (MBG) y sus receptores también han servido como uno de los modelos claves para el estudio de cómo se desarrolla una lámina basal e interactúa con las células epiteliales adyacentes. Por otra parte, la investigación glomerular ha llevado a grandes avances en el entendimiento de cómo se requieren varios tipos de señales entre las células vecinas para el correcto desarrollo y mantenimiento de la integridad estructural de un órgano a lo largo de la vida. La

regeneración *de novo* de toda una nefrona en conjunto con el glomérulo, nunca se ha documentado en los mamíferos. De hecho, aparte de la reparación de los túbulos proximales dañados en situaciones agudas, el riñón tiene una capacidad muy limitada para repararse a sí mismo en comparación con muchos otros órganos (Quaggin & Kreidberg, 2008).

La filtración de moléculas depende de su tamaño (peso molecular), configuración (radiomolecular) y carga eléctrica. Para moléculas relativamente esféricas, la filtración es muy limitada cuando el radio molecular es superior a 2 nm, y casi nula si es mayor de 4,2 nm, gracias a la ordenada disposición de las fibrillas de colágeno tipo IV y de la matriz glicoproteica de la MBG. La contribución principal a la selección del paso de moléculas en función de la carga es la presencia de abundantes polianiones. Dado que la mayoría de las proteínas séricas tienen carga negativa al pH normal de la sangre, éstas tienden a ser rechazadas por fuerzas electrostáticas cuando intentan atravesar la barrera de filtración, incluso con independencia de su peso molecular (Deen et al, 2001; Arrizabalaga, 2005; Miner et al, 2011; D'Agati et al., 2011).

El proceso de filtración se da desde el interior de los capilares glomerulares hacia el espacio urinario rodeado por la cápsula de Bowman. Las células endoteliales que recubren internamente los vasos tienen un citoplasma aplanado y fenestrado. Las fenestras o "ventanas" transcelulares, presumiblemente permiten que el plasma fluya a través de los capilares para llegar a la MBG. Estos poros miden de 70 a 100 nm de diámetro y constituyen del 20 a 50% del área de superficie capilar glomerular. Los principales componentes de la capa superficial o glicocálix, que recubren el endotelio, son glicoproteínas cargadas negativamente, glicosaminoglicanos y proteoglicanos asociados a membrana, de tal manera que contribuyen a la selectividad del filtro por su carga negativa (Fogo & Kon, 2010; Patrakka & Tryggvason, 2010; Quaggin & Kreidberg, 2008).

La MBG es la base estructural y componente de matriz extracelular de los capilares glomerulares, sirve como anclaje para las células endoteliales y los podocitos,

células especializadas encargadas de sintetizar sus componentes. Al igual que en todas las membranas basales, los principales componentes incluyen colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos y nidogen. Las moléculas de colágeno de tipo IV están formadas por una triple hélice de las cadenas $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ en la MBG madura. La red de colágeno de tipo IV altamente reticulado proporciona resistencia a la tracción de la pared capilar, sin embargo, se cree que juega un papel menor en la selectividad de la filtración (Kruegel, Rubel, & Gross, 2013; Miner, 2013; Patrakka & Tryggvason, 2010). Las lamininas son proteínas heterotriméricas presentes en todas las membranas basales, en donde forman una red que está íntimamente asociada a las moléculas de colágeno. En la MBG madura, la principal es la laminina-521 (compuesta por las cadenas A5, B2, C1). (Delimont et al., 2014; Patrakka & Tryggvason, 2010).

La capa más externa de la barrera de filtración está formada por las células podocitarias o podocitos. Estas son células altamente especializadas, poseen un cuerpo celular prominente y prolongaciones contráctiles a manera de pies (pedicelos) y son capaces de responder a estímulos vasomotores para regular la filtración glomerular. Los pedicelos se apoyan firmemente sobre la MBG subyacente y se disponen de una manera altamente organizada, de forma que envuelven la pared capilar intercalando sus digitaciones a manera de peine con las prolongaciones de los podocitos adyacentes, las cuales están interconectadas por una unión especializada célula-célula, formando unas estructuras recubiertas de un delgado diafragma compuesto por moléculas que adoptan una organización de cremallera o cerradura, dejando unos poros de 4×14 nm llamada hendidura diafragmática (HD) o diafragma de filtración (Carney, 2014; Kawachi et al., 2009; Miner, 2013; Patrakka & Tryggvason, 2010).

El complejo de proteínas de la hendidura diafragmática (HD), se compone de proteínas comunes para la mayoría de las uniones célula-célula; estas incluyen catenina y cadherinas, pero, además está compuesto por proteínas que no se sintetizan en otra parte del organismo. Desde el punto de vista de la estructura

molecular y la función, son “podo-proteínas” específicas que hacen de la HD una unión célula-célula única, que se ha especializado en llevar a cabo la función de ultrafiltración renal (Patrakka & Tryggvason, 2010).

La nefrina fue la primera proteína transmembrana identificada en la HD. Se descubrió a través de clonación posicional, cuando se encontró una mutación en el gen codificante de la nefrina, (NPHS1; HSA 19 (*Homo sapiens autosome*) en humano y CFA 1 (*Canis familiaris autosome*) en el perro), en el síndrome nefrótico congénito de tipo finlandés en humanos. Esta enfermedad se manifiesta como proteinuria masiva en la etapa perinatal y lleva a la muerte. La proteína tiene un dominio intracelular corto, un dominio transmembrana y un dominio extracelular con ocho motivos similares a IgG con un motivo de fibronectina. Las moléculas de nefrina probablemente interactúan una con otras de manera homofílica. La parte N-terminal de la nefrina parece localizarse en la región central de la rendija del diafragma tal como se verificó mediante la combinación de microscopía inmunoelectrónica y tomografía electrónica. Intracelularmente, la nefrina y el complejo de la HD están conectados al citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras como la proteína asociada a CD2 (CD2AP) y las proteínas del NCK (región no catalítica de la proteína adaptadora tirosinquinasa). Estas interacciones median en la polimerización de la actina y la reorganización del citoesqueleto en los podocitos que se requiere para el funcionamiento de la barrera de filtración. Las proteínas Neph1, Neph2, y Neph3 se han localizado en la HD y están estructuralmente relacionadas con la nefrina en los cinco motivos extracelulares similares a IgG. Neph1 parece cooperar con la nefrina en el reclutamiento de actina a través de proteínas NCK (Kawachi et al., 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010; Perysinaki et al., 2011).

La podocina es otro componente central de la hendidura diafragmática. Esta fue descubierta mediante el estudio de los síndromes de proteinuria hereditaria, inducidos por mutaciones en el gen que codifica para la podocina (NPHS2, HSA1 en humano o CFA7 en el perro) que se identificaron en familias con una enfermedad proteinúrica progresiva. La podocina es una proteína integral de membrana, que

tiene forma de horquilla con dos extremos orientados hacia el espacio intracelular. Ésta interactúa directamente con la nefrina, la Neph1 y la CD2AD, y parece ser esencial para el funcionamiento de la nefrina en la HD (Kobayashi, Kamiie, Yasuno, Ogihara, & Shirota, 2011a; Patrakka & Tryggvason, 2010; Perysinaki et al., 2011).

Hasta el momento se han caracterizado al menos 15 proteínas que forman parte de este complejo y del citoesqueleto del podocito, todas ellas importantes en el mantenimiento de su estructura y función: nefrina, podocina, Neph1, 2 y 3, p-cadherina, proteína asociada a CD2 (CD2AP), cateninas, FAT 1 y 2, zonula occludens 1 (ZO-1), actina, alfa-actinina-4, densina y CRIM19 entre otras (Feldman et al., 2007; Kawachi et al., 2009; Kestilä et al., 1998; Michaud, Hosseini-Abardeh, Farah, & Kennedy, 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010; Román Ortiz, 2014)

Por ejemplo, la TRPC6, es un miembro de una familia de canales de cationes no selectivos, que están involucradas en la regulación de la concentración de calcio intracelular en respuesta a la activación de los receptores acoplados a la proteína G y receptores de tirosina quinasas. Las mutaciones dominantes en el gen TRPC6 se han identificado en familias con una enfermedad progresiva proteinúrica. Otras proteínas como la cadherina, la FAT1 protocadherina, la p-cadherina, y la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) también se han localizado en la HD. FAT1 es una proteína enorme, con 34 repeticiones de cadherina en tándem, y es esencial para la barrera de filtración normal. La p-cadherina, por otro lado, no parece ser esencial para la funcionalidad de la barrera de filtración, mientras que el papel de la VE-cadherina en los podocitos es hasta ahora desconocido. La relación de estos y otros componentes moleculares de la HD así como sus cambios en procesos patológicos está por ser determinada (Kawachi et al., 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010).

Los pedicelos o prolongaciones de los podocitos están anclados a los componentes de la membrana basal a través de la integrina $\alpha 3\beta 1$, la tetraspanina el CD151, el α 5 β 1 distroglicano y el receptor uPAR. Estas proteínas transmembrana están vinculadas al citoesqueleto de actina a través de varias proteínas adaptadoras. El

complejo proteico de la hendidura diafragmática (HD), está asociado al citoesqueleto de actina a través de la podocalixina, la *glepp1*, la α -actinina-4 y la sinaptopodina, que interconectan con tres dominios trans-membrana de los proteoglicanos de la MBG. Estas moléculas están compuestas de una proteína centro-núcleo ligada a las cadenas laterales cargadas negativamente. El principal proteoglicano heparansulfato es la agrina, que forma una estructura laminar continua asociada a moléculas como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y nidógeno (entactina) (Miner, 2013)

La α -actinina-4 es una proteína encargada del adecuado ensamblaje del citoesqueleto del podocito y de sus pedicelos, interactuando con los filamentos de actina (F-actina) en el dominio CH (*Calponin-Homology*). Fue descubierta a través de estudios genéticos detectando mutaciones puntuales en el gen (ACTN4, HSA19 en humano o CFA1 en el perro) que codifica para la α -actinina-4 como responsable de una enfermedad hereditaria proteinúrica. Estas mutaciones resultan en un aumento de la afinidad de unión de las proteínas, que conlleva a una ganancia de función y un inadecuado ensamblaje de los microfilamentos. Esta unión alterada a la actina perjudica la dinámica del citoesqueleto, lo que resulta en fusión de los pedicelos y proteinuria. Igualmente, tiene también un papel crítico en la superficie basal de los pedicelos, mostrando una adhesión deteriorada a la MBG lo que causa desprendimiento de podocitos y proteinuria progresiva. Se han reportado además, cambios en la localización o el grado de expresión de esta proteína en diferentes glomerulopatías, especialmente de tipo esporádico o secundario (Kobayashi, Kamiie, Yasuno, Ogihara, & Shirota, 2011b; Patrakka & Tryggvason, 2010; Zhang et al., 2004).

La localización exacta y las interacciones precisas entre las proteínas de la hendidura diafragmática no se conocen completamente. Estas proteínas interactúan con el citoesqueleto del podocito y participan en la transmisión de señales intracelulares e intercelulares. Cuando hay alteraciones en alguno de los genes que codifican estas proteínas, todo el complejo puede perder su estructura normal y alterar su función, llevando a proteinuria. Sin embargo, en casos de

síndrome nefrótico (SN) adquirido, mediado o no por complejos inmunes y/o inmunidad celular, se describen alteraciones podocitarias (fusión o borramiento) como un fenómeno secundario al síndrome nefrótico o a su causa. Más aun, se indica que la desestructuración y/o la pérdida de función del diafragma de filtración y su complejo anclaje de proteínas pueden ser tanto causa como consecuencia del síndrome nefrótico (Kawachi et al., 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010; Sekulic & Pichler Sekulic, 2013).

La proteinuria resulta de la pérdida de la función de la barrera de filtración glomerular. La integridad de la estructura es crucial para el mantenimiento de la histología y la función renal normal, evitando la pérdida de proteínas en la orina. Varios componentes de la barrera de filtración están afectados en muchas enfermedades renales; sin embargo la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en de la patología glomerular sigue en constante investigación y es esencial para las diferentes aproximaciones y generación de nuevas terapias (Grauer, 2011b; Harley & Langston, 2012a; Kawachi et al., 2009).

En la última década, el podocito ha sido el centro de los estudios en proteinuria y filtración alterada. La fusión o borramiento de los pedicelos y la pérdida de función de la HD son las principales lesiones descritas que conducen a la proteinuria. Sin embargo, las alteraciones de la célula endotelial, las fenestras y el glycocalyx, también afectan la función glomerular y la permeabilidad de la barrera de filtración. La modulación rápida de las fenestras en respuesta a diversos estímulos, indica que estas estructuras pueden ser reguladas dinámicamente y pueden influir en la filtración y la función de la célula endotelial glomerular en los entornos fisiológicos y fisiopatológicos. Por ejemplo, la disminución del tamaño y la pérdida de las fenestraciones se han documentado en la pre-eclampsia, lesión que se denomina "endoteliosis", la cual es rápidamente reversible después del parto en la mayoría de las pacientes (Fogo & Kon, 2010).

1.3 Glomerulopatías

El término glomerulopatía (GP) o algunas veces usado como glomerulonefritis (GN) designa un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una pérdida de las funciones normales del glomérulo renal. Estas funciones son básicamente, mantener una filtración glomerular adecuada, de forma que el organismo pueda excretar los productos tóxicos generados en el metabolismo y evitar que en este proceso de filtración se pierdan por la orina elementos celulares y macromoléculas circulantes necesarios para el individuo. Así pues, las GP podrían definirse como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células y macromoléculas en la orina, con grados variables de insuficiencia renal (Martínez, 2007).

La denominación de GN, más ampliamente usada que la de GP, hace referencia explícita a la presencia de fenómenos inflamatorios asociados. Sin embargo, no siempre son evidentes cambios anatomopatológicos compatibles con este proceso en el glomérulo. Junto a las GN que muestran un infiltrado celular evidente, otras se caracterizan más bien, por modificaciones en la membrana basal o en el espacio extracelular, existiendo incluso algunas GN en las que no es posible detectar, con microscopía óptica convencional, alteraciones morfológicas en los ovillos glomerulares. Desde el punto de vista clínico, la proteinuria puede ser asintomática, especialmente a baja concentración; y cuando es grave puede cursar con diversas alteraciones, denominadas síndrome nefrítico, síndrome nefrótico, alteración del sedimento urinario y hematuria macroscópica recurrente. Además, pueden producir insuficiencia renal aguda, rápidamente progresiva y crónica. No obstante, estas denominaciones clínicas son insuficientes para caracterizar con precisión estos procesos, por lo que ha sido fundamental la introducción de criterios anatomopatológicos en su clasificación (Harley & Langston, 2012a; Rudnicki et al., 2007).

En humanos, las incidencias de GP varían dependiendo de las poblaciones estudiadas y las diferencias en las políticas de la toma de la biopsia renal en cada

país. En el Reino Unido, se estima que las incidencias van de 17 a 60 casos por millón de habitantes (Mathieson, 2011). En Colombia, las glomerulopatías son las entidades más frecuentemente diagnosticadas en nefrología, siendo 59,8% formas primarias y 41.2% secundarias (Arias et al., 2009, Andrade et al., 2013) . Cualquier grupo etario puede verse afectado, aunque algunos tipos de GP son particularmente comunes en los niños. La GP es una causa importante de enfermedad renal terminal (ERT) y el diagnóstico tardío de la misma, sigue siendo un problema importante en salud pública a nivel mundial. La proteinuria es una característica fundamental de las GP y ahora también se reconoce como un factor de riesgo inequívoco de enfermedades cardiovasculares (Mathieson, 2011; Sekulic & Pichler Sekulic, 2013).

Como se describió anteriormente, la enfermedad glomerular es una causa importante de insuficiencia renal crónica en humanos. En medicina veterinaria se ha estado identificando con mayor frecuencia en los últimos años. Anteriormente, las enfermedades renales en perros eran clasificadas de acuerdo a la categorización de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el estudio histológico en humanos (Adam et al., 2013; Lees et al., 2011; Short et al., 2014). Sin embargo, se ha considerado que estos criterios podrían no ser del todo apropiados para perros debido a las diferencias en la etiología de la enfermedad o a la progresión. Para resolver los problemas de clasificación, la Fundación Nacional del Riñón y la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS) recomienda una directriz global para el estudio clínico-patológico de la ERC, según los niveles de proteína en la orina y los niveles de creatinina en plasma tanto para caninos como para seres humanos (<http://www.kidney.org/kidneydisease/ERC/index.cfm>; <http://www.iriskidney.com/directrices/es/index.html>) respectivamente (Lees et al., 2011; M. P. Littman, Daminet, Grauer, Lees, & van Dongen, 2013).

Actualmente se ha incrementado el interés de los médicos veterinarios por la enfermedad glomerular (EG) en perros, buscando facilitar el reconocimiento temprano, el diagnóstico y el tratamiento oportunos de la enfermedad y en

particular de las nefropatías proteinúricas desarrolladas en caninos. Por otra parte, la inclusión de la proteinuria como uno de los descriptores de la ERC ha hecho énfasis en la asociación de la proteinuria y la lesión glomerular. En los últimos años, la *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) ha estado operando un Proyecto de Normalización Renal con el objetivo de desarrollar un sistema de clasificación único para las EG en caninos basados en la información de la ML, MET e inmunofluorescencia/inmunohistoquímica (IF/IHQ) de la patología glomerular. Se ha reportado además, una aparente asociación entre la EG y algunas enfermedades infecciosas como la borreliosis en ciertas áreas dentro de América del Norte y la leishmaniasis en la zona mediterránea de Europa, lo que también ha mejorado la conciencia sobre la importancia del valor de la EG y el potencial de la proteinuria como un centinela para ciertas enfermedades infecciosas en perros y de importancia en salud pública (Littman, 2011; Yhee et al., 2010).

Aunque no se ha establecido la prevalencia a nivel mundial de la EG en perros, ésta es reconocida como una causa importante de morbilidad y mortalidad. En estudios que utilizaron perros con enfermedad renal, seleccionados de forma aleatoria en el Reino Unido, se encontró que la incidencia de la enfermedad glomerular fue del 43% al 90% de los casos estudiados (Macdougall, Cook, Steward, & Cattell, 1986; Vaden, 2011). Las enfermedades glomerulares pueden presentarse en cualquier edad, pero son probablemente más comunes en perros de mediana edad a perros viejos. La edad media en 375 perros con una variedad de enfermedades glomerulares recopiladas de 5 estudios fue de 8.3 años, tanto en machos como en hembras. También pueden aparecer a edades tempranas, sobre todo en razas con tendencia a padecer glomerulopatías familiares o hereditarias (Bull-Terrier, Cocker Spaniel, Bernese de la Montaña, Greyhound, Shar-pei y Soft Coated Wheaten Terrier) o en casos GN secundarias a enfermedades infecciosas (leishmaniosis, ehrlichiosis, etc.). La mayor parte de las EGs son secundarias a la existencia de una enfermedad extrarrenal y se producen como consecuencia de las lesiones provocadas por el depósito de inmunocomplejos circulantes (o por la

formación “*in situ*” de los mismos) en las paredes de los capilares glomerulares (Harley & Langston, 2012a; Kim et al., 2012; Vaden, 2011).

Clínicamente, la EG puede presentarse como varios síndromes renales, entre ellos ERC, falla renal aguda, síndrome nefrótico (SN) o proteinuria aislada. Dentro de estos síndromes, el que tiene la población mejor definida y existen más datos disponibles, es la ERC. La prevalencia en perros se ha estimado cercana al 5,8% de los pacientes presentados en la práctica clínica veterinaria y basados en los hallazgos de patología renal, se ha calculado que la GP puede dar cuenta de más del 50% de los casos de ERC. Debido a que los perros diagnosticados con ERC tienen una supervivencia corta y malas repuestas al tratamiento, es indispensable mejorar el éxito en el diagnóstico y la respuesta a la terapéutica en este tipo de pacientes (Polzin & Cowgill, 2013; Vala et al., 2013).

Las GP se pueden producir en el contexto de enfermedades sistémicas y se denominan secundarias, mientras que en otras las lesiones renales se desarrollan de forma aislada, directamente en el glomérulo y se consideran primarias. El diagnóstico de la EG, y en particular su subdivisión en varias categorías depende de las características clínicas, los datos de laboratorio y del análisis histológico. La biopsia renal, es un elemento crucial en el estudio de las enfermedades glomerulares (Mathieson, 2011).

Las EGs se puede clasificar dependiendo de su etiopatogenia en:

1) Según el papel de la inflamación en la etiopatogenia:

a) Glomerulonefritis (GN).

b) Glomerulopatías no inflamatorias (GP) (inflamación mínima o sin inflamación).

2) Según la etiología:

a) Glomerulopatías adquiridas primarias, de carácter inflamatorio (GN primaria) y glomerulopatías secundarias (el daño glomerular es consecuencia de otra enfermedad que puede afectar a otros órganos de forma simultánea o no y pueden tener un carácter inflamatorio o no inflamatorio).

b) Glomerulopatías congénitas (hereditarias o esporádicas) principalmente presentan un carácter no inflamatorio; su causa es un trastorno de estructura glomerular.

3) Según el cuadro histopatológico:

En muchas alteraciones del glomérulo se produce daño a nivel de alguno de sus componentes específicos. Dentro de las alteraciones histológicas se describe: Hiper celularidad, donde puede haber proliferación celular (mesangial o endotelial), infiltrado leucocitario (neutrófilos y macrófagos, a veces linfocitos) y formación de medialunas (proliferación celular o de matriz extracelular). Engrosamiento de la membrana basal glomerular. Hialinosis (material eosinófilo amorfo extracelular, correspondiente a proteínas plasmáticas que han pasado desde la circulación hacia las estructuras glomerulares) y esclerosis (acumulaciones de la matriz de colágeno extracelular). Ambas pueden terminar obliterando la luz capilar. También se puede presentar trombosis, necrosis o fibrosis de forma segmentaria o generalizada (Martínez, 2007(Gupta et al., 2000; Mathieson, 2011; Schneider et al., 2013)).

La enfermedad glomerular (EG) en el canino se había visto más frecuentemente asociada con la presencia de complejos inmunes en paredes capilares glomerulares (Cook y Cowgill 1996). Sin embargo, las anomalías estructurales (por ejemplo, defectos de colágeno IV en la nefritis hereditaria o la nefropatía con pérdida de proteínas) anormalidades hemodinámicas (tales como la hipertensión intraglomerular) y el depósito de amiloide a nivel glomerular son ejemplos de tipos adicionales de EG que se están diagnosticando ahora con mayor frecuencia en perros (Grauer, 2005, 2011a; Littman, 2011; Vaden, 2011).

La GN por inmunocomplejos es inducida por el depósito de inmunoglobulinas o factores del complemento en la pared de los capilares glomerulares. Estos generalmente se depositan en el filtro glomerular por dos vías:

- Los inmunocomplejos (IC) solubles circulantes pueden quedar atrapados en los glomérulos bajo condiciones equivalentes de antígeno-anticuerpo o de un ligero exceso de antígeno. En caso de exceso de anticuerpos, los IC tienden a ser más grandes e insolubles, por lo tanto, son rápidamente eliminados del torrente circulatorio por los fagocitos. En caso de un gran exceso de antígeno, los IC se unen con menor facilidad al complemento, y es menos probable que causen lesiones.

- Los IC pueden formarse *in situ* como respuesta a antígenos glomerulares endógenos, antígenos no glomerulares endógenos o antígenos exógenos depositados en los glomérulos.

El depósito de IC en los glomérulos puede disminuir la carga negativa de la MBG y potenciar la filtración de macromoléculas circulantes con carga negativa, como la albúmina. La activación del complemento causa daños en la membrana y proteinuria; además, los componentes solubles del complemento, como el C3a y C5a, reclutan células inflamatorias (Mathieson, 2011; Schneider et al., 2013). Se produce una activación y agregación plaquetaria secundaria al daño endotelial o a la interacción antígeno-anticuerpo, causando la liberación de varios mediadores y exacerbando el daño glomerular. Estos mediadores causan activación y proliferación de las células mesangiales y endoteliales, vasoespasmo y aumento de la coagulación. Las células mesangiales liberan eicosanoides, citoquinas y factores de crecimiento y aumentan la producción de matriz, lo que contribuye a la inflamación glomerular. Las células inflamatorias también contribuyen al daño glomerular. Los neutrófilos y macrófagos se localizan en los glomérulos, en respuesta a mediadores solubles como factores del complemento, factor de activación de plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y eicosanoides. Los neutrófilos activados liberan moléculas reactivas de oxígeno y

proteinasas, causando más daño. Los macrófagos producen proteinasas, oxidantes, eicosanoides, factores de crecimiento, citoquinas, fragmentos del complemento y factores de coagulación (Mathieson, 2011; Schneider et al., 2013).

Las reacciones inmunes asociadas a GN, presentan contribuciones tanto de la inmunidad celular (linfocitos T, macrófagos) como de la inmunidad humoral (anticuerpos, complejos inmunes, complemento) y otros mediadores inflamatorios (incluyendo la cascada de la coagulación). En algunos casos, el objetivo de la respuesta inmune se conoce (por ejemplo, cuando son asociadas a infecciones o tumores); sin embargo, en muchos casos, el destino es desconocido y se sospecha una etiología de origen autoinmune. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, la GN primaria se cree que es el resultado de la combinación de la susceptibilidad genética y un componente ambiental precipitante. Los factores genéticos incluyen típicamente los genes implicados en el control de la respuesta inmune, en particular los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), aunque la nefropatía membranosa es un caso especial en este sentido. Los desencadenantes ambientales incluyen medicamentos, productos químicos o agentes infecciosos. El rol de los mecanismos inmunes en la patogénesis de la GN se indica mediante la presencia de autoanticuerpos y/o anomalías del complemento circulantes en el suero y la deposición glomerular de anticuerpos, complejos inmunes, complemento y fibrina (Mathieson, 2011). Se han asociado varias enfermedades infecciosas e inflamatorias al depósito glomerular o la formación *in situ* de IC en animales domésticos. En la mayoría de los casos, sin embargo, no se logra identificar la fuente de antígeno o la enfermedad subyacente, denominando a la enfermedad glomerular como idiopática (Macdougall et al., 1986; Schneider et al., 2013).

La amiloidosis se refiere a un grupo de enfermedades caracterizadas por el depósito extracelular de una fibrilla formada por la polimerización de subunidades de proteínas con una conformación especial llamada beta plegada. Esta conformación biofísica es la responsable de las exclusivas propiedades ópticas y tintóreas de los depósitos de sustancia amiloide, además de su insolubilidad y

resistencia a la proteólisis *in vivo*. Estos depósitos de tienen un aspecto homogéneo y eosinofílico al teñirlos con hematoxilina y eosina y bajo luz polarizada, exhiben una birrefringencia verde al teñirlos con rojo Congo (Pinto-Cárdenas et al., 2009).

La amiloidosis reactiva (secundaria) es un síndrome sistémico caracterizado por el depósito de la proteína A amiloide (amiloide AA), la cual es un fragmento aminoterminal de una proteína de fase aguda, la proteína A amiloide sérica (AAS). La amiloidosis sistémica en animales domésticos es un ejemplo de amiloidosis reactiva. Los síndromes de amiloidosis familiar en los gatos Abisinios, Siamés y Oriental de pelo corto y en perros Shar Pei, Beagle y Foxhound inglés, son ejemplos también de amiloidosis sistémica reactiva. Las enfermedades que se han observado en asociación con amiloidosis sistémica reactiva en perros incluyen enfermedades infecciosas crónicas o inflamatorias no infecciosas y neoplasias, pero generalmente, no se detecta alguna enfermedad inflamatoria o neoplásica en la mayoría de los perros y gatos con amiloidosis sistémica reactiva (Klosterman et al., 2011; Pinto-Cárdenas et al., 2009; Vaden, 2011).

1.4 Biopsia renal

Actualmente en nuestro medio, el diagnóstico de las causas de la insuficiencia renal en los perros y gatos se basa en la historia, el examen clínico, pruebas de laboratorio en sangre (hematología y bioquímica), análisis de orina y ecografía renal, lo cual con frecuencia no permite la determinación de sus causas (León-Bojorge, 2010). Con el fin de determinar en última instancia las causas, se debe evaluar un fragmento del riñón para realizar exámenes adicionales, es decir tomar una biopsia. Esta es una técnica de diagnóstico que permite la recolección intravital de tejido para exámenes histopatológicos o citológicos (Cowgill & Polzin, 2013; Lees et al., 2011; Vaden, 2011; Vaden et al., 2005). La evaluación histológica del tejido renal no sólo tiene el potencial de dar lugar a un diagnóstico definitivo, sino

que también proporciona una estimación de la gravedad de las lesiones. La formulación del plan de tratamiento óptimo generalmente requiere de un diagnóstico histológico preciso (Vaden et al., 2005; Vaden, 2011).

Aunque las biopsias renales humanas se evalúan rutinariamente con ML utilizando un panel de tinciones especiales, MET e IF para obtener un diagnóstico específico y clínicamente útil, la evaluación de la enfermedad glomerular en medicina veterinaria está basada generalmente solo en ML, lo que ha limitado su utilidad. Desde 2008, dos centros colaboradores, uno en América del Norte y otro en Europa, diagnostican rutinariamente con ML, MET e IF todas las muestras adecuadas de tejido renal sometidas a evaluación patológica en caninos y felinos. A mediados de 2013, la experiencia acumulada y combinada de ambos centros sobrepasó un total de 960 casos caninos (Lees et al., 2011; M Littman, Daminet, Grauer, Lees, & M, 2013).

En humanos, la biopsia de riñón con aguja se introdujo como un procedimiento seguro en 1951 por Iversen y Brun. En las siguientes décadas, el procedimiento se hizo popular y para 1961, el Simposio de la Fundación CIBA en Londres, informó que se habían realizado cerca de 5.000 biopsias renales en el mundo, sin complicaciones significativas (He et al., 2012; Liapis & Gaut, 2013). Esta época trajo avances tecnológicos sin precedentes, así como adelantos en la comprensión de los mecanismos de la enfermedad renal (He et al., 2012; Liapis & Gaut, 2013; Schmid et al., 2003).

La MET se concentró en estudiar el glomérulo en la década de 1950 y se convirtió en una herramienta indispensable para el diagnóstico de la EG. Adicionalmente, se desarrollaron modelos animales para estudiar la fisiopatología renal. Por ejemplo, los modelos de nefritis experimental (enfermedad del suero, nefritis de Heymann) proporcionaron información sobre los mecanismos de formación de los complejos inmunes. La adopción generalizada de la biopsia renal permitió la comparación de estos estudios en modelos animales con la enfermedad humana. El desarrollo y la aplicación de anticuerpos para diagnóstico patológico abrió un nuevo campo en la

"inmunopatología". Cuando se combinó con la MET, se logró dar grandes saltos en la comprensión de las nefropatías. La aplicación de la ML, IF/IHQ y MET para un solo espécimen se convirtió en el método racional para el diagnóstico de las EG y es la base para la toma de las biopsias renales de diagnóstico de rutina hasta la fecha. La terminología y la clasificación fueron estandarizadas en conferencias de consenso basadas en hallazgos patológicos específicos. Las enfermedades glomerulares también se clasificaron por mecanismos patológicos (mediadas por complejos inmunes vs. no inmuno-mediadas). El glosario de términos para describir los hallazgos patológicos y los elementos esenciales que deben incluirse en el informe de patología fueron formulados con el objetivo de entregar información precisa y reproducible y para facilitar la comunicación entre patólogos y nefrólogos (Liapis & Gaut, 2013).

Con la secuenciación del genoma humano y una mayor comprensión de las bases genéticas de la enfermedad renal, así como con el menor costo y rapidez de las tecnologías de secuenciación, se ha abierto la puerta para una aplicación más generalizada. En teoría, la biopsia renal del futuro incluirá la ML, IF/IHQ, MET análisis genético específico (He et al., 2012; Liapis & Gaut, 2013; Schmid et al., 2003). Técnicas como la hibridación de Northern, ensayos de protección de ribonucleasas, hibridación *in situ* y PCR pueden ser utilizadas en todo el tejido o en partes separadas por micro-disección láser. La extracción con esta técnica permite aislar nefronas, glomérulos, segmentos de la nefrona e incluso células individuales (por ejemplo, podocitos) (He et al., 2012; Liapis & Gaut, 2013; Schmid et al., 2003).

El tejido no utilizado para histopatología de la biopsia o una parte de este puede ser reservado para ensayos moleculares. En comparación con los métodos de amplificación de ARNm, la amplificación del gen con la PCR seguido por hibridación utilizando microarreglos (*microarrays*) de oligonucleótidos tiene la ventaja de detectar múltiples genes en una pequeña muestra, tal como la biopsia renal. Los microarreglos son utilizados para obtener perfiles de transcripción de genes que contienen uno a varios oligonucleótidos de ADN y se unen a secuencias diana de

genes específicos. Una serie de matrices con diferentes arreglos están disponibles comercialmente; pueden ser de todo el genoma o matrices más focalizadas: donde solo encontramos los exones (*exon arrays*) o un grupo de genes de interés. Se han realizado múltiples estudios que utilizan tanto biopsias renales médicas como de trasplante, las cuales han revelado numerosos fenotipos moleculares en enfermedades renales, previamente desconocidos (Reddy et al., 2012; Wang et al., 2008). En enfermedades renales pediátricas son relevantes estudios sobre Glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), síndrome nefrótico, nefritis lúpica y anomalías congénitas del tracto urinario (CAKUT), entre otros (Melk et al., 2004; Schmid et al., 2003).

Estos enfoques sofisticados generan una gran cantidad de datos que retratan los cambios moleculares asociados con el tejido o cambios de tipo celular en la biopsia renal. Sin embargo, su utilidad como una herramienta de diagnóstico o pronóstico está en proceso de validación y aplicación en una escala más grande (Liapis & Gaut, 2013).

Otra de las áreas donde los enfoques moleculares modernos pueden mejorar el alcance de los diagnósticos patológicos es la genómica. La secuenciación de genes ya sea a través de la secuenciación tradicional de Sanger, o métodos de secuenciación de próxima generación, están siendo utilizados para identificar mutaciones en genes candidatos en nefropatías. Si bien la interpretación de las mutaciones identificadas y su relevancia clínica puede disuadir o retrasar su utilización a gran escala, estos ensayos van ganando más popularidad. Se presenta un desafío para todos los involucrados en el área, en aprender y ganar familiarización con las nuevas tecnologías y el análisis de los resultados de las nuevas metodologías. Así, se puede esperar que futuros informes de diagnóstico de la biopsia renal implicarán aportes colectivos de patólogos, nefrólogos, biólogos moleculares y genetistas tomando los resultados de todas las tecnologías y asociándolas con la importancia genómica en las nefropatías (Iyengar et al., 2007; Liapis & Gaut, 2013).

Muchas de las glomerulopatías descritas hasta el momento en el perro y en el humano muestran una base genética, ya sea por mutaciones puntuales en uno de los genes que codifica para las moléculas de la HD, del citoesqueleto del podocito o cambios en los patrones de expresión las células glomerulares o de los mediadores de la inflamación implicados en su fisiopatología. Estas moléculas se han reportado como alteradas en muchas de las GP más comunes tanto en humanos como en animales. Los cambios cuantitativos en las principales moléculas de la HD también causan enfermedades glomerulares en modelos animales experimentales. La nefropatía inducida por puromicina-aminoglucósido es un modelo de síndrome nefrótico de cambios mínimos en la rata, el cual mostró una disminución en el ARNm de la nefrina y el cambio en localizaciones de la proteína, de un patrón lineal a un patrón granular en el glomérulo. Por lo tanto, la expresión alterada tiene un gran impacto en la patogénesis de las lesiones glomerulares en seres humanos y animales de laboratorio. Sin embargo, aún no existe amplia evidencia experimental en animales de compañía debido a la escasez de estudios tanto en la biopsias renales como en las necropsias en medicina veterinaria (Ichii et al., 2011).

Debido a la importancia de las enfermedades glomerulares tanto en humanos como en animales, se propone como hipótesis de trabajo, que existe alteración o cambio en los patrones de expresión y/o en la localización de las proteínas podocitarias o moduladoras nefrina, podocina, alfa actinina 4 y factor de crecimiento transformante β , dependiendo del tipo de glomerulopatía encontrada y como segunda hipótesis, que estos cambios son similares entre humanos y caninos.

1.5 Bibliografía

Aaltonen, P., Luimula, P., Aström, E., Palmén, T., Grönholm, T., Palojoki, E., ... Holthöfer, H. (2001). Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 81(9), 1185–1190.

- Adam, J., Connor, T. M. F., Wood, K., Lewis, D., Naik, R., Gale, D. P., & Sayer, J. a. (2013). Genetic testing can resolve diagnostic confusion in Alport syndrome. *Clinical Kidney Journal*, 7(2), 197–200. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft144>
- Akchurin, O., & Reidy, K. J. (2014). Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatric Nephrology*, 30(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2753-3>
- Aresu, L., Zanatta, R., Luciani, L., Trez, D., & Castagnaro, M. (2010). Severe renal failure in a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.12.016>
- Arias, L. F., Henao, J., Giraldo, R. D., Carvajal, N., Rodelo, J., & Arbeláez, M. (2009). Glomerular diseases in a Hispanic population: Review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Medical Journal*, 127(3), 140–144. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000300006>
- Arif, E., Rathore, Y. S., Kumari, B., Ashish, F., Wong, H. N., Holzman, L. B., & Nihalani, D. (2014). Slit diaphragm protein nephl1 and its signaling: A novel therapeutic target for protection of podocytes against: Glomerular injury. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9502–9518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505743>
- Armelloni, S., Corbelli, A., Giardino, Laura1. Armelloni S, Corbelli A, Giardino L, et al. P. R. biomolecular developments. *B. C.* 2014;5(4):319-330. doi:10. 1515/bm.-2014-0020., Li, M., Ikehata, M., Mattinzoli, D., ... Rastaldi, M. P. (2014). Podocytes: Recent biomolecular developments. *Biomolecular Concepts*, 5(4), 319–330.
- Baelde, H. J., Eikmans, M., Lappin, D. W. P., Doran, P. P., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P.-T., ... Bruijn, J. a. (2007). Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney International*, 71(7), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002101>
- Bartges, J. W. (2012). Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(4), 669–692. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>

- Bate, S., & Clark, R. (2014). *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. (Cambridge University Press, Ed.) (2014th ed.).
- Bierzynska, A., Soderquest, K., & Koziell, A. (2015). Genes and podocytes - New insights into mechanisms of podocytopathy. *Frontiers in Endocrinology*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00226>
- Brum, K. B., Juliano, R. S., Souza, M. A., Fleury, L. F. F., & Damasceno, A. D. (2008). Renal dysplasia in a Boxer dog: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(5), 1084–1088. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000500007>
- Brunskill, E. W., & Potter, S. (2012). Changes in the gene expression programs of renal mesangial cells during diabetic nephropathy. *BMC Nephrology*, 13(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-70>
- Carney, E. F. (2014). Glomerular disease: Frequency of podocyte-related gene mutations in FSGS. *Nrn*, 10(4), 184. <https://doi.org/10.1038/hrneph.2014.29>
- Cerda Lorca, J., & Villarroel Del P., L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062008000100008>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007a). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(12), 690–694. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007b). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Cienciolo, R. E., Brown, C. A., Mohr, F. C., Spangler, W. L., Aresu, L., van der Lugt, J. J., ... Lees, G. E. (2013). Pathologic evaluation of canine renal biopsies: Methods for identifying features that differentiate immune-mediated glomerulonephritides from other categories of glomerular diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/jvim.12226>

- Cienciolo, R. E., Mohr, F. C., Aresu, L., Brown, C. A., James, C., Jansen, J. H., ... Corresponda, A. Q. (2016). World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative : Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53(1), 113–135.
<https://doi.org/10.1177/0300985815579996>
- Cowgill, L. D., & Polzin, D. J. (2013). Vision of the WSAVA Renal Standardization Project. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 5–10.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12227>
- Dandapani, S. V., Sugimoto, H., Matthews, B. D., Kolb, R. J., Sinha, S., Gerszten, R. E., ... Pollak, M. R. (2007). ??-Actinin-4 Is Required for Normal Podocyte Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 467–477.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M605024200>
- Dasari, S., Chakraborty, A., Truong, L., Mohan, C., L, J. C., & P, L. V. D. E. L. (2019). A Systematic Review of Interpathologist Agreement in Histologic Classification. *Kidney International Reports*, 4(10), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.06.011>
- Delimont, D., Dufek, B. M., Meehan, D. T., Zallocchi, M., Gratton, M. A., Phillips, G., & Cosgrove, D. (2014). Laminin α 2-Mediated Focal Adhesion Kinase Activation Triggers Alport Glomerular Pathogenesis. *PLoS ONE*, 9(6), e99083.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099083>
- Erkan, E., Garcia, C. D., Patterson, L. T., Mishra, J., Mitsnefes, M. M., Kaskel, F. J., & Devarajan, P. (2004). Induction of Renal Tubular Cell Apoptosis in Focal Segmental Glomerulosclerosis: Roles of Proteinuria and Fas-Dependent Pathways. *Journal of the American Society of Nephrology*, (22), ASN.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2003100861>
- Feldman, G., Kiely, B., Martin, N., Ryan, G., McMorrow, T., & Ryan, M. P. (2007). Role for TGF-beta in Cyclosporine-Induced Modulation of Renal Epithelial Barrier Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(6), 1662–1671.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006050527>
- Fogo, A. B., & Kon, V. (2010). The glomerulus - a view from the inside - the endothelial cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(9), 1388–1397.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.05.015>

- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology*, *50*(6), 1007–1015. <https://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- Grauer. (2005). Canine glomerulonephritis: New thoughts on proteinuria and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, *46*(10), 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x>
- Grauer, G. F. (2011a). Introduction: Proteinuric Renal Disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, *26*(3), 119–120. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.05.001>
- Grauer, G. F. (2011b). Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, *26*(3), 121–127. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>
- Gross, O., & Kashtan, C. E. (2009). Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney International*, *76*(6), 599–603. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.223>
- Guillén-Navarro, E., Ballesta-Martínez, M. J., & López-González, V. (2011). Genética y enfermedad. Concepto de genética médica. *Revista Nefrología*, *2*(1), 3–10. <https://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10889>
- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J., & Brady, H. R. (2000). Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*, *58*(4), 1389–1399. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00301.x>
- Harley, L., & Langston, C. (2012a). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*.
- Harley, L., & Langston, C. (2012b). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*, *53*(June), 631–638.
- He, J. C., Chuang, P. Y., Ma'Ayan, A., & Iyengar, R. (2012). Systems biology of kidney diseases. *Kidney International*, *81*(1), 22–39. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.314>
- Honda, K. (2015). The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell & Bioscience*, *5*, 41. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0031-0>

- Ichii, O., Yabuki, A., Sasaki, N., Otsuka, S., Ohta, H., Yamasaki, M., ... Kon, Y. (2011). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histology and Histopathology*, 26(10), 1243–1255.
- Iyengar, S. K., Freedman, B. I., & Sedor, J. R. (2007). Mining the genome for susceptibility to diabetic nephropathy: the role of large-scale studies and consortia. *Seminars in Nephrology*, 27(2), 208–222.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.01.004>
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A., & Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393–400.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.393>
- Kari, J. A., Montini, G., Bockenbauer, D., Brennan, E., Rees, L., Trompeter, R. S., ... Marks, S. D. (2014). Clinico-pathological correlations of congenital and infantile nephrotic syndrome over twenty years. *Pediatric Nephrology*, 2173–2180.
<https://doi.org/10.1007/s00467-014-2856-x>
- Kavoura, E., Gakiopoulou, H., Paraskevakou, H., Marinaki, S., Agrogiannis, G., Stofas, A., ... Lazaris, A. C. (2011). Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome. *Human Pathology*, 42(2), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.028>
- Kawachi, H., Suzuki, K., Miyauchi, N., Hashimoto, T., Otaki, Y., & Shimizu, F. (2009). Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(4), 275–280.
<https://doi.org/10.1007/s10157-009-0162-x>
- Kelly, D. J., Aaltonen, P., Cox, A. J., Rumble, J. R., Langham, R., Panagiotopoulos, S., ... Gilbert, R. E. (2002). Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(7), 1327–1332.

- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., ... Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell*, 1(4), 575–582. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80057-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80057-X)
- Khoury, C. C., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2015). *Chronic Renal Disease. Chronic Renal Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411602-3.00013-5>
- Kim, R. N., Kim, D. S., Choi, S. H., Yoon, B. H., Kang, A., Nam, S. H., ... Park, H. S. (2012). Genome analysis of the domestic dog (Korean jindo) by massively parallel sequencing. *DNA Research*, 19(3), 275–287. <https://doi.org/10.1093/dnares/dss011>
- Klosterman, E. S., Moore, G. E., de Brito Galvao, J. F., Dibartola, S. P., Groman, R. P., Whittemore, J. C., ... Pressler, B. M. (2011). Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 206–214. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0669.x>
- Klosterman, & Pressler. (2011). Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 135–142. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.004>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011a). Expression of Nephrin, Podocin, α -Actinin-4 and α 3-Integrin in Canine Renal Glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011b). Expression of nephrin, podocin, α -actinin-4 and α 3-integrin in canine renal glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., Shirota, K., Li, X., ... Ahola, H. (2015). Nephrin Contributes to Insulin Secretion and Affects Mammalian Target of Rapamycin Signaling Independently of Insulin Receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(6), e0157497. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>

- Kriz, W., & LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - Insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), 404–419.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x>
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., Lehir, M., & Lemley, K. V. (2013). The podocyte 's response to stress : the enigma of foot process effacement. *Am Physiol REnal Physiol*, 333–347. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00478.2012>
- Kruegel, J., Rubel, D., & Gross, O. (2013). Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nature Reviews. Nephrology*, 9(3), 170–178.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.259>
- Lees, G. E., Cianciolo, R. E., & Clubb, F. J. (2011). Renal biopsy and pathologic evaluation of glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 143–153. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.006>
- León-Bojorge, D. B. De. (2010). La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica Biopsia de médula ósea, 31(4), 178–187.
- LeVine, D. N., Zhang, D., Harris, T., & Vaden, S. L. (2010). The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein: Creatinine ratios. *Veterinary Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00167.x>
- Li, X., Chuang, P. Y., D'Agati, V. D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., ... He, J. C. (2015). Nephrin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1–17.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>
- Liapis, H., & Gaut, J. P. (2013). The renal biopsy in the genomic era. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 28(8), 1207–1219. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2356-9>
- Littman. (2011). Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(1), 31–62.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.09.006>
- Littman. (2015). Emerging perspectives on hereditary glomerulopathies in canines. *Advances in Genomics and Genetics, Volume 5*, 179.

<https://doi.org/10.2147/AGG.S65965>

- Littman, M. P., Daminet, S., Grauer, G. F., Lees, G. E., & van Dongen, a. M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, M, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & M, van D. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, Meryl P. (2013). Lyme nephritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(2), 163–173. <https://doi.org/10.1111/vec.12026>
- Littman, Meryl P., Wiley, C. A., & Raducha, M. G. (2013). Glomerulopathy and mutations in NPHS1 and KIRREL2 in soft-coated Wheaten Terrier dogs. *Mammalian Genome*, Volume 24,(Issue 3,), pp 119–126. <https://doi.org/09388990>
- Littman, MP, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & van Dongen, M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Lowik, M. M., Groenen, P. J., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis-a review. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1017-x>
- Luimula, P., Ahola, H., Wang, S. X., Solin, M. L., Aaltonen, P., Tikkanen, I., ... Holthofer, H. (2000). Nephryn in experimental glomerular disease. *Kidney International*, 58(4), 1461–1468. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00308.x>
- Maas, R. J., Deegens, J. K., van den Brand, J. A., Cornelissen, E. A., & Wetzels, J. F. (2013). A retrospective study of focal segmental glomerulosclerosis: clinical criteria can identify patients at high risk for recurrent disease after first renal transplantation. *BMC.Nephrol.*

- Macdougall, D. F., Cook, T., Steward, a P., & Cattell, V. (1986). Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International*, 29, 1144–1151. <https://doi.org/10.1038/ki.1986.120>
- Mathieson, P. (2011). Primary glomerular disease. *Medicine*, 39(8), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.05.005>
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., & Halloran, P. F. (2004). Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney International*, 65(2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x>
- Michaud, J.-L. R., Hosseini-Abardeh, M., Farah, K., & Kennedy, C. R. J. (2009). Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(3), 166–178. <https://doi.org/10.1002/cm.20339>
- Miner, J. H. (2012). The glomerular basement membrane. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>
- Miner, J. H. (2013). NIH Public Access, 318(9), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>.The
- Nagata, M. (2016). Podocyte injury and its consequences. *Kidney International*, 89(6), 1221–1230.
- Neusser, M. a, Lindenmeyer, M. T., Moll, A. G., Segerer, S., Edenhofer, I., Sen, K., ... Cohen, C. D. (2010). Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *The American Journal of Pathology*, 176(2), 594–607. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090268>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Harris, A., & Anderson, E. (2006). Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01323>
- Ohse, T., Pippin, J. W., Chang, A. M., Krofft, R. D., Miner, J. H., Vaughan, M. R., & Shankland, S. J. (2009). The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney International*, 76(12), 1225–1238. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.386>

- Patrakka, J., & Tryggvason, K. (2010). Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.069>
- Peña, A., & Mendizabal, S. (2008). Síndrome nefrótico en la edad pediátrica. *Aeped.Es*, 154–167. Retrieved from http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/14_3.pdf
- Perysinaki, G. S., Moysiadis, D. K., Bertsiadis, G., Giannopoulou, I., Kyriacou, K., & Nakopoulou, L. (2011). Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology, 781–791.
- Pinto-Cárdenas, J. C., Chávez-crisóstomo, D., Morales-salinas, E., Salas-, G., Sánchez-aguilar, A. C., & Valencia-mayoral, P. (2009). Amiloidosis generalizada en perros Sharpei. Comunicación de dos casos. *Patología Revista Latinoamericana*, 47(4), 341–345.
- Polzin, D. J., & Cowgill, L. D. (2013). Development of Clinical Guidelines for Management of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, S2–S4. <https://doi.org/10.1111/jvim.12225>
- Qiu, L., & Zhou, J. (2016). Simultaneous mutations of LAMB2 and NPHP1 genes in a Chinese girl with isolated congenital nephrotic syndrome: a case report. *BMC Pediatrics*, 16(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0583-0>
- Quaggin, S. E., & Kreidberg, J. A. (2008). Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development (Cambridge, England)*, 135(4), 609–620. <https://doi.org/10.1242/dev.001081>
- Raval, S. H., Joshi, D. V., Patel, B. J., Patel, J. G., Patel, S. J., Karanti, A. M., & Panchbuddhe, B. N. (2015). Renal dysplasia in labrador male dog: A case report. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 39(1), 87. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2015.00020.6>
- Reddy, M. A., Park, J. T., & Natarajan, R. (2012). Epigenetic modifications and diabetic nephropathy. *Kidney Research and Clinical Practice*, 31(3), 139–150.

- <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2012.07.004>
- Reiser, J., & Altintas, M. M. (2016). Podocytes. *F1000Research*, 5, 1–19.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7255.1>
- Rico, M., Mukherjee, A., Konieczkowski, M., Bruggeman, L. A., Miller, R. T., Khan, S., ... Sedor, J. R. (2005). WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(2), F431–F441. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2004>
- Rinschen, M. M., Bharill, P., Wu, X., Kohli, P., Reinert, M. J., Kretz, O., ... Benzing, T. (2016). The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Human Molecular Genetics*, 25(7), 1328–1344.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw016>
- Román Ortiz, E. (2014). Síndrome Nefrótico Pediátrico. *Protoc Diagn Ter Pediatr.*, 2014;1:283, 283–301.
- Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Wetzels, J. F. M. (2012). Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(3), 882–890.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfr771>
- Rørtveit, R., Lingaas, F., Bønsdorff, T., Eggertsdóttir, A. V., Grøndahl, A. M., Thomassen, R., ... Jansen, J. H. (2012). A canine autosomal recessive model of collagen type III glomerulopathy. *Laboratory Investigation*, 92(10), 1483–1491.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.112>
- Rudnicki, M., Eder, S., Perco, P., Enrich, J., Scheiber, K., Koppelstätter, C., ... Mayer, G. (2007). Gene expression profiles of human proximal tubular epithelial cells in proteinuric nephropathies. *Kidney International*, 71(4), 325–335.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002043>
- Schmid, H., Cohen, C. D., Henger, A., Irrgang, S., Schlöndorff, D., & Kretzler, M. (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 64(1), 356–360.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00074.x>

Schneider, S. M., Cianciolo, R. E., Nabity, M. B., Clubb, F. J., Brown, C. A., & Lees, G. E. (2013). Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007-2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1). <https://doi.org/10.1111/jvim.12247>

Sekulic, M., & Pichler Sekulic, S. (2013). A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathology Research International*, 2013.

Short, A. D., Holder, A., Rothwell, S., Massey, J., Scholey, R., Kennedy, L. J., ... Ollier, W. E. (2014). Searching for “monogenic diabetes” in dogs using a candidate gene approach. *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-8>

Soares, M. (2005). Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. *Journal of Venomous ...*, (December), 579–593. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992005000400014>

Sugahara, G., Hosaka, S., Mineshige, T., Kamiie, J., & Shirota, K. (2015). Clinical and histopathological features resembling those of human focal segmental glomerulosclerosis in a cat with nonimmune-mediated glomerulonephropathy. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0569-4>

Suzuki, T., Matsusaka, T., Nakayama, M., Asano, T., Watanabe, T., Ichikawa, I., & Nagata, M. (2009). Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1675–1682. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080789>

Tao, J., Polumbo, C., Reidy, K., Sweetwyne, M., & Susztak, K. (2014). A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 85(4), 972–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.463>

Tsai, K. L., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2007). Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*, 18(6–7),

- 444–451. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9037-1>
- Vaden, S. L. (2011). Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 128–134. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>
- Vaden, S. L., Levine, J. F., Lees, G. E., Groman, R. P., Grauer, G. F., & Forrester, S. D. (2005). Renal biopsy: a retrospective study of methods and complications in 283 dogs and 65 cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02767.x>
- Vala, H., Mega, A. C., Mesquita, J., Nóbrega, C., Cruz, R., Esteves, F., ... Reis, F. (2013). Presence of Kimmelstiel-Wilson-like Lesions in Canine Chronic Kidney Disease. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 100. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.219>
- Vogtländer, N. P. J., Dijkman, H., Bakker, M. a H., Campbell, K. P., van der Vlag, J., & Berden, J. H. M. (2005). Localization of alpha-dystroglycan on the podocyte: from top to toe. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(11), 1345–1353. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6596.2005>
- Wakamatsu, N., Surdyk, K., Carmichael, K. P., & Brown, C. a. (2007). Histologic and ultrastructural studies of juvenile onset renal disease in four Rottweiler dogs. *Veterinary Pathology*, 44(1), 96–100. <https://doi.org/10.1354/vp.44-1-96>
- Wang, G., Lai, F. M. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Kwan, B. C. H., Li, P. K. T., & Szeto, C. C. (2008). Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. *European Journal of Endocrinology*, 158(3), 317–322. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0708>
- Whiteley, M. H., Bell, J. S., & Rothman, D. A. (2011). Novel Allelic Variants in the Canine Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Promoter Are Associated with Renal Dysplasia in Dogs. *PLoS One*, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016684>
- William, J., Hogan, D., & Batlle, D. (2005). Predicting the development of diabetic nephropathy and its progression. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 202–

211. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.02.001>

- Yhee, J.-Y., Yu, C.-H., Kim, J.-H., Im, K.-S., Chon, S.-K., & Sur, J.-H. (2010). Histopathological retrospective study of canine renal disease in Korea, 2003~2008. *Journal of Veterinary Science*, 11, 277–283. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.4.277>
- Zhang, S.-Y., Marlier, A., Gribouval, O., Gilbert, T., Heidet, L., Antignac, C., & Gubler, M. C. (2004). In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney International*, 66(3), 945–954. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00840.x>
- Zheng, M., Lv, L. L., Ni, J., Ni, H. F., Li, Q., Ma, K. L., & Liu, B. C. (2011). Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS ONE*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020431>

2. Hallazgos histopatológicos, de ultraestructura y patrones de inmunofluorescencia en muestras renales de caninos con proteinuria en la ciudad de Bogotá

Paula Esquinas, Ligia Jiménez, Laura Romero, Lucía Botero, Rafael Andrade

2.1 Resumen

Las enfermedades glomerulares son una de las causas más importantes de insuficiencia renal tanto en humanos como en animales de compañía (Cianciolo et al., 2016; Cowgill & Polzin, 2013; Rood, Deegens, & Wetzels, 2012). Estas pueden ocurrir debido a una enfermedad renal primaria, mutaciones genéticas; como una manifestación de enfermedades sistémicas como el lupus, secundarias a infecciones, tumores o en respuesta a medicamentos. En veterinaria, la evaluación patológica de los tejidos renales se realiza actualmente con microscopía óptica convencional. Para acercarse a un diagnóstico específico, se requiere el uso de otras técnicas más avanzadas. En el presente estudio, se utilizó la metodología recomendada por la Iniciativa de Patología Renal de la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales: Clasificación de Enfermedades Glomerulares en Perros, para el diagnóstico completo de glomerulopatías en caninos con proteinuria. Los hallazgos encontrados en las muestras evaluadas describen los hallazgos según el diagnóstico histopatológico, de ultraestructura y de inmunofluorescencia y evidencian la disponibilidad y utilidad del estudio completo de

muestras de tejido renal en nuestro medio y para las muestras renales obtenidas de caninos con proteinuria en la ciudad de Bogotá.

2.2 Introducción

Las glomerulopatías en el perro han adquirido recientemente gran importancia, no solo por su alta incidencia en pequeños animales, ya que son observadas frecuentemente en la clínica como una forma común de insuficiencia renal, sino por los esfuerzos para facilitar el reconocimiento temprano, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades proteinúricas renales (Bartges, 2012; Cianciolo et al., 2016; Littman, 2011, 2015; Polzin & Cowgill, 2013). No obstante, el uso poco frecuente o el desconocimiento de las herramientas actualmente disponibles para el diagnóstico preciso en la biopsia renal canina, ha creado preocupaciones asociadas con la utilidad o la oportunidad del uso de estas. Adicionalmente, en ausencia de un análisis histopatológico estandarizado, los resultados pueden no ser significativos o no proveer una herramienta utilizable en la clínica y en la terapéutica en pequeños animales (Cianciolo et al., 2016).

En los últimos años, la *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) ha estado operando un Proyecto de Estandarización Renal con el objetivo de desarrollar un sistema de clasificación único para las enfermedades glomerulares (EG) en caninos basados en la información imagenológica de la Microscopía de luz (ML), la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y la Inmunofluorescencia/ Inmunohistoquímica (IF/IHQ) de la patología glomerular (Cianciolo et al., 2013, 2016; Lees et al., 2011; Polzin & Cowgill, 2013; Schneider et al., 2013). El Servicio Internacional de Patología Renal Veterinaria y el Servicio de Nefropatología Veterinaria de Utrecht demostraron que las biopsias renales caninas podían evaluarse con ML, MET e IF en un flujo de trabajo de diagnóstico razonable para proporcionar información oportuna y útil a los clínicos. Como resultado de este trabajo se desarrollaron los criterios de puntuación para lesiones glomerulares, tubulares, intersticiales y vasculares, así como el uso de análisis jerárquicos para identificar objetivamente patrones comunes de lesión glomerular en perros, creando una guía simplificada, reproducible y precisa para que los patólogos veterinarios utilicen al evaluar biopsias renales de perros con enfermedad renal proteinúrica (Cianciolo et al, 2016).

La pérdida de proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, a través de los capilares glomerulares dañados resulta en proteinuria. Este es el signo clínico clásico de la

enfermedad glomerular y cuando ésta se acompaña de hipoalbuminemia, hipercolesterolemia y edema o ascitis se denomina “síndrome nefrótico” (Klosterman et al., 2011; M Littman et al., 2013; Macdougall et al., 1986; Schneider et al., 2013). La evidencia sugiere que además de ser un marcador de enfermedad, la proteinuria persistente se asocia con lesiones glomerulares y tubulointersticiales progresivas y puede ser un marcador en el estudio de enfermedades infecciosas de importancia en la salud pública en caninos (Kelly et al., 2002; Klosterman & Pressler, 2011; Meryl P. Littman, 2013; Soares, 2005; Vaden et al., 2005).

Se realizó la evaluación de especímenes de tejido renal obtenidos de pacientes caninos con proteinuria mediante la utilización de todas las técnicas descritas de la metodología estandarizada, lo que permitió describir las enfermedades glomerulares que se presentan más comúnmente en nuestro medio.

2.3 Materiales y Métodos

Población y muestra

El presente trabajo utilizó 22 muestras de tejido renal de caninos, los cuales fueron seleccionados por conveniencia. Se consideraron variables como edad, sexo, raza-tamaño, grado de proteinuria y diagnóstico clínico (Tabla 1-2). Para la variable edad, se consideró una clasificación de grupos etarios de la siguiente forma, grupo 1: 0-11 meses, 2: 12-36 meses, 3: 37-60 meses, 4: 61-96 meses, 5: >97 meses. Para la variable raza-tamaño se realizó una distribución en grupos numerados de 1-6, donde 1 corresponde a razas Toy, 2 a razas de tamaño pequeño, 3 a razas de tamaño mediano, 4 para razas grandes, 5 para razas de tamaño gigante y 6 para mestizos (Anexo1). El tejido renal de los caninos se obtuvo principalmente de animales durante la necropsia o en menor proporción, de biopsias renales.

Las muestras incluidas pertenecían a animales que exhibieron proteinuria. Los especímenes se clasificaron según los niveles de UP/C (rango de proteína en orina (UP) sobre creatinina en orina (C), que establece la IRIS (LeVine, Zhang, Harris, & Vaden, 2010; MP Littman, Daminet, Grauer, Lees, & van Dongen, 2013) como una medida indicativa del grado de proteinuria en caninos, definiendo 3 tipos de pacientes: Grado 3: Proteinuria significativa UP/C >0.5, Grado 2: proteinuria en el límite permitido (*borderline*) UP/C 0,2-

0,5 y Grado 1: no proteinúricos UP/C<0.2 (Harley & Langston, 2012b). Como control se utilizaron cinco tejidos renales de perros que fueron sacrificados por motivos diferentes a enfermedad renal y que no mostraron proteinuria (UP/C<0,2). Debido a la alta variabilidad de los datos clínicos disponibles en cada paciente, solo se consideró el grado de proteína en orina y el diagnóstico clínico en el momento de la toma de muestra, como la información clínica para el estudio. Para hacer uso adecuado de los especímenes, se solicitó la autorización de los propietarios mediante la firma del formato de *Consentimiento Informado*, elaborado por la Unidad de Genotipificación de Animales Domésticos (UGA), para la toma o uso de muestras biológicas en los proyectos de investigación, teniendo en cuenta las recomendaciones definidas en la “*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*” (http://www.fass.org/docs/agguide3rd/Ag_Guide_3rd_ed.pdf), acorde con lo establecido por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 2-1. Datos y características de los pacientes de las muestras obtenidas.

Raza	Raza-Tamaño	Edad	Grupo edad	Sexo ¹	Grado de proteinuria	Diagnóstico clínico ²
P ALEMAN	5	9 AÑOS	5	H	GRADO 3	IRC
MESTIZO	6	8 AÑOS	4	M	GRADO 3	IRC
SHII TZU	2	9 AÑOS	5	M	GRADO 3	UM
MESTIZO	6	5 AÑOS	3	H	GRADO 3	IRA
LABRADOR	4	9 MESES	1	H	GRADO 3	IRA
MESTIZO	6	7 AÑOS	5	M	GRADO 3	IRA
POODLE	3	8 AÑOS	5	H	GRADO 3	DB
LABRADOR	4	7 MESES	1	M	GRADO 3	IRA
MESTIZO	6	6 AÑOS	4	H	GRADO 3	IRA
P ALEMAN	5	5 AÑOS	4	H	GRADO 3	IRA
P BELGA	5	8 AÑOS	4	M	GRADO 3	UM
MESTIZO	6	7 AÑOS	5	M	GRADO 2	PTU
POODLE	3	1 AÑO	2	H	GRADO 2	PTU
BOXER	3	6 AÑOS	4	M	GRADO 2	IRC
MESTIZO	6	1 AÑO	2	H	GRADO 2	IRC
GLODEN R	4	8 AÑOS	5	M	GRADO 2	DB
BOXER	3	1,5 AÑOS	2	M	GRADO 2	IRA
MESTIZO	6	6 AÑOS	5	H	GRADO 1	SANO
LABRADOR	4	1 AÑO	2	H	GRADO 1	SANO
P ALEMAN	5	2 AÑOS	2	H	GRADO 1	SANO
LABRADOR	4	3 AÑOS	2	H	GRADO 1	SANO
MESTIZO	6	3,5 AÑOS	3	M	GRADO 1	SANO

¹H: hembra, M: macho; ²DB: Diabetes; IRA: Insuficiencia renal aguda; IRC: Insuficiencia renal crónica; PTU: proteinuria; UM: Uremia

Microscopía de luz

Un fragmento de la muestra fue fijado por inmersión en formalina bufferada al 10%, la cual se procesó de manera habitual por deshidratación en alcoholes ascendentes, inclusión en parafina y cortes de 3 a 4 micras de espesor. Para la valoración histopatológica se utilizaron cuatro tinciones: hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), tricrómica de Masson y metamina de plata de Jones. La tinción de rojo de Congo se utilizó en los casos en que se sospechó de amiloidosis.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Un fragmento de tejido renal se fijó en glutaraldehído bufferado al 2,5%. Las muestras se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% y acetato de uranilo al 3%, se deshidrataron progresivamente, se infiltraron en resina plástica mezclada con acetona 1:1 y se incluyeron en resina SPURR (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EE. UU.). Los bloques plásticos se cortaron con un ultramicrotomo Sorvall MT2-B. Los cortes semifinos (1 μm) fueron teñidos con azul de toluidina y se evaluaron para identificar las áreas apropiadas para cortes ultrafinos. Estas áreas se cortaron con diamante a un grosor de 80–100 nm (color de interferencia amarillo-dorado) y se colocaron en rejillas de cobre 200 mesh. Posteriormente los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron y fotografiaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 Plus del Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Departamento de Patología.

Inmunofluorescencia

Los tejidos para esta técnica se sumergieron en solución salina fría durante un periodo máximo de 2 horas en el transporte al laboratorio de patología, donde se colocaron en criomoldes con el compuesto de inclusión TissueTek OCT (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EE. UU.) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, debidamente identificados para ser almacenados a -70°C hasta el momento de corte. Los cortes de 4 μm se realizaron en un criostato Leica CM 1850 UV (Bannockburn, IL, EE. UU.), se fijaron durante 2 minutos en acetona fría al 100%, se secaron en bandeja durante 1 hora en refrigeración, para luego rehidratarlos en buffer fosfato. La Inmunofluorescencia directa (IF) se realizó con anticuerpos policlonales de cabra conjugados con isotiocianato de fluoresceína anti-IgG, IgM, IgA, C3 y anticuerpos de fibrinógeno (Bethyl Labs,

Montgomery, TX, EE. UU.) (Dako North America, Carpinteria, CA, EE. UU.). Las secciones se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:500 de cada anticuerpo, luego se lavaron con solución de lavado y se cubrieron con medio de montaje (Prolong Gold, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) Las láminas se examinaron utilizando filtros apropiados con un microscopio de fluorescencia (Olympus, BX51, Center Valley, PA, EE. UU.), (Lampara U-LH100H GAPO 100 vatios).

Observación, clasificación, cuantificación y toma de imágenes

Las muestras renales fueron observadas por dos patólogos de forma individual y fueron discutidas posteriormente. El grado de concordancia en las observaciones se calculó con el coeficiente *Kappa*, teniendo como resultado un índice de 0,89 en el grado de concordancia inter-observador (Cerdeira Lorca & Villarreal Del P., 2008; Dasari et al., 2019). Las preparaciones correspondientes a cada animal se examinaron y los parámetros evaluados se cuantificaron de acuerdo con la metodología consenso, desconociendo la identificación de cada caso (método ciego) para evitar los sesgos.

Para cada una de las técnicas utilizadas para la evaluación, se utilizó una tabla basada en las lesiones más relevantes de los componentes del glomérulo y el parénquima renal. Las lesiones fueron categorizadas como presentes o ausentes, recibiendo un grado de severidad de 0 a 4, siendo 0: ausente; 1 (presente leve): menor a 25%; 2 (presente moderado): entre 26 a 50%; 3 (presente moderado a severo) entre 51 a 75% y; 4 (presente severo): entre 76 a 100% (Cianciolo et al., 2016; Gibson-Corley, Olivier, & Meyerholz, 2013). Este proceso dio como resultado los esquemas de puntuación de microscopía de luz (ML), microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunofluorescencia (IF). Los puntajes fueron recopilados por un solo patólogo y se usaron promedios o puntajes comunes para el análisis de los datos estadísticos. Las imágenes fueron obtenidas en cada caso, para cada una de las técnicas y analizadas posteriormente para su clasificación.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por el programa Statistical Analysis System (Version 9.4, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA 2015) (Bate & Clark, 2014). Para la obtención del nivel de asociación entre el diagnóstico histopatológico y la severidad de las lesiones o grado de afección, así como, las variables edad, sexo, raza-tamaño, grado de proteinuria y diagnóstico clínico se utilizó un análisis estadístico mediante Tablas de frecuencias. La

prueba exacta de Fisher se utilizó para identificar diferencias estadísticas entre las variables evaluadas, con un umbral de significancia establecido del 5% de probabilidad.

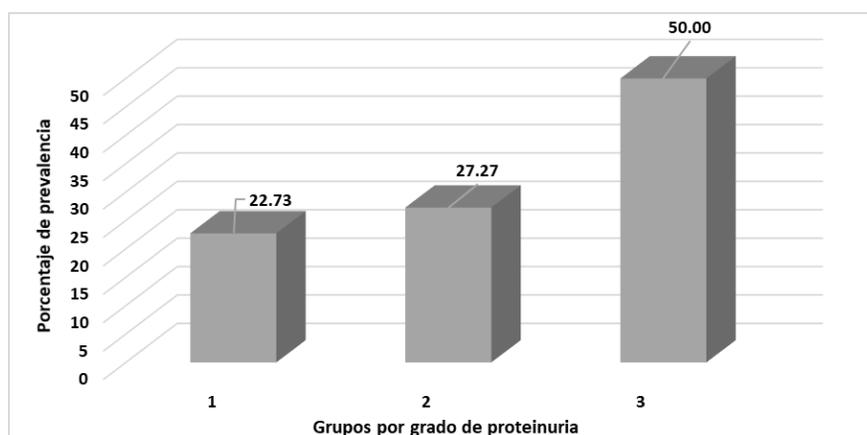
2.4 Resultados

Los especímenes que se utilizaron para el estudio (n=22), fueron obtenidos de animales en el momento de la necropsia, únicamente tres de las muestras de animales enfermos se obtuvieron por medio de biopsia renal. En la Tabla 2-2 y en la Gráfica 1-2, se evidencia la distribución de los animales muestreados, donde con respecto al grado de proteinuria, el 50% de los caninos presentaba un grado dentro del rango 3 y el 22,27% estaba dentro del rango 2. Los animales control no presentaron proteinuria, es decir se agruparon dentro del rango 1.

Tabla 2-2. Número de frecuencias y porcentajes de la variable grado de proteinuria

Grado de proteinuria	Porcentaje (%)	Frecuencia
1	22,73	5
2	27,27	6
3	50,00	11

Gráfica 2-1. Número de frecuencias y porcentajes de la variable rango de edad



En cuanto a las variables raza y edad, la mayoría de los especímenes con proteinuria (31,82%) correspondió a caninos mayores de 8 años, seguido de caninos de 1 a 3 años con un 27,7% de representación en este grupo (Tabla 3-2). De esta población, la mayor parte de los caninos fueron mestizos (40,91%), seguido de razas de talla grande como pastor alemán y labrador (Tabla 4-2).

Tabla 2-3. Número de frecuencias y porcentajes de la variable rango de edad

Edad-Grupo	Porcentaje (%)	Frecuencia
1	9,09	2
2	27,27	6
3	9,09	2
4	22,73	5
5	31,82	7

Tabla 2-4. Número de frecuencias y porcentajes de la variable raza-tamaño

Raza-Tamaño	Porcentaje (%)	Frecuencia
3	18,18	4
4	22,73	5
5	18,18	4
6	40,91	9

El análisis morfológico permitió la clasificación de las muestras en grupos de lesiones, estableciendo un diagnóstico histopatológico. De acuerdo con esto, las lesiones evidenciadas en las que se agruparon los hallazgos fueron, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS, 31,8%), glomerulonefritis (GN, 22,7%) y displasia renal (DR, 22,7%), como se evidencia en la Tabla 5-2 y se describe en hallazgos histopatológicos detalladamente.

Tabla 2-5. Número de frecuencias y porcentajes de la variable diagnóstico histopatológico

Diagnóstico histopatológico ¹	Porcentaje (%)	Frecuencia
DR	22,73	5
GEFS	31,82	7
GN	22,73	5
NC	22,73	5

¹DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

En la Tabla 6-2 y Gráfica 2-2, se evidencia que el proceso histopatológico observado influye significativamente ($P = 0,0014$) sobre el grado de proteinuria, mostrando así una asociación entre las dos variables para todos los grupos. De esta forma, se observó mayor efecto (50,01%) del grado de proteinuria del rango 3 (Gráfica 2-2) para los diagnósticos histopatológicos glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS, 22,73%) comparado con el de displasia renal (DR, 13,64%); y glomerulonefritis (GN, 13,64%), en los cuales el grado

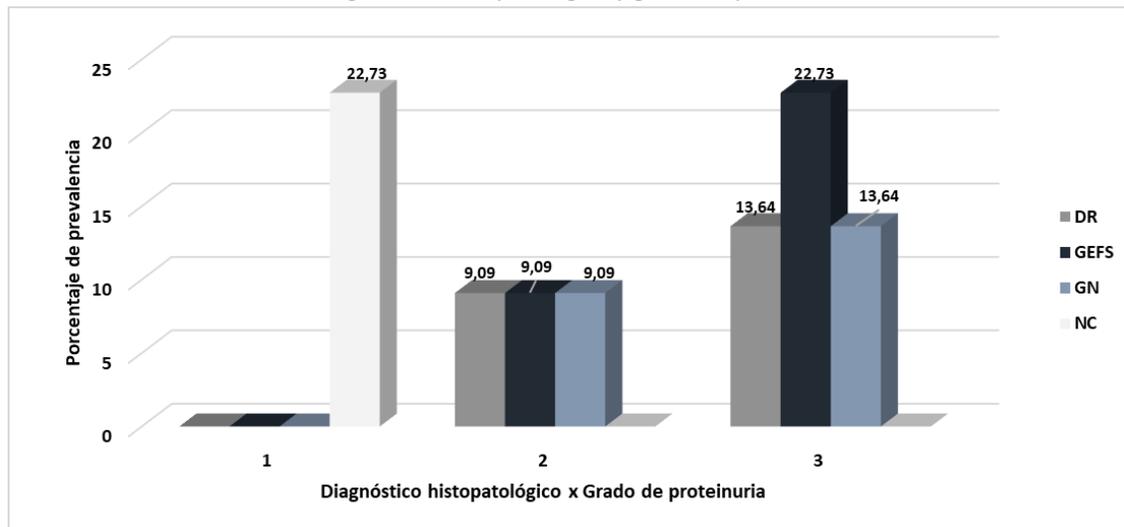
de proteinuria rango 2 que estuvo igualmente representado (9.09%) para los tres tipos de diagnóstico histopatológico.

Tabla 2-6. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de proteinuria

Diagnóstico histopatológico ¹	Grado Proteinuria	Porcentaje (%)	Frecuencia	P-Valor	Total-n	%Total
DR	1	0,0	0	0,0014	5	22,73
	2	9,09	2			
	3	13,64	3			
GEFS	1	0,0	0			
	2	9,09	2		7	31,82
	3	22,73	5			
GN	1	0,0	0			
	2	9,09	2		5	22,73
	3	13,64	3			
NC	1	22,73	5			
	2	0,0	0	5	22,73	
	3	0,0	0			

¹DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

Grafica 2-2. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de proteinuria



PDR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

El presente estudio muestra que existe asociación significativa ($P = 0,0069$) entre el diagnóstico histopatológico y la edad de los caninos (Tabla 7-2). De esta manera, los

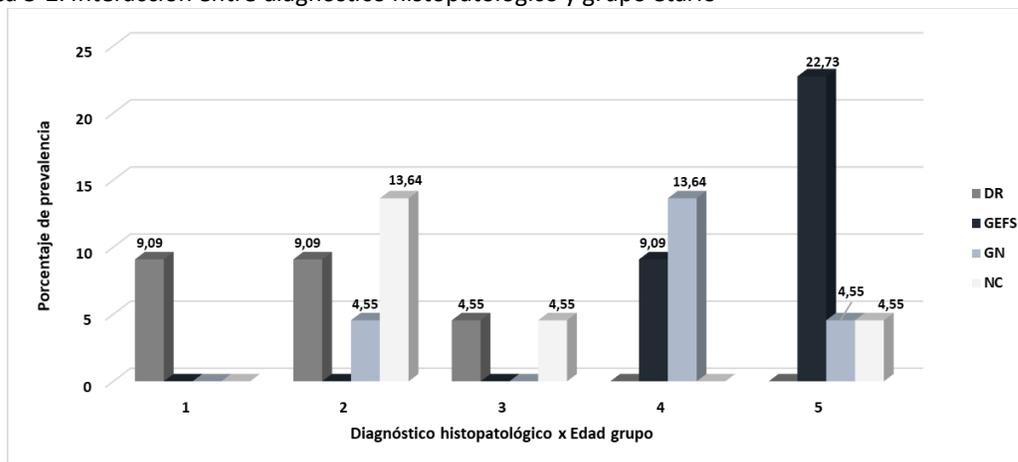
grupos etarios 1 (0 a 11 meses) y 2 (12 a 36 meses), presentaron mayor prevalencia (9,09%) de displasia renal (DR), mientras que perros del grupo 5 (mayores a 97 meses), fueron más prevalentes (22,73%) en exhibir GEFS. Para el caso de GN, caninos del grupo 4 presentaron mayor predominancia (13,64%) de esta condición (Gráfica 3-2).

Tabla 2-7. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grupo etario edad grupo

Diagnóstico histopatológico ¹	Edad	Porcentaje (%)	Frecuencia	P-Valor	Total-n	%Total
DR	1	9,09	2	0,0069	5	22,73
	2	9,09	2			
	3	4,55	1			
	4	0,0	0			
	5	0,0	0			
GEFS	1	0,0	0			
	2	0,0	0			
	3	0,0	0		7	31,82
	4	9,09	2			
	5	22,73	5			
GN	1	0,0	0			
	2	4,55	1			
	3	0,0	0		5	22,73
	4	13,64	3			
	5	4,55	1			
NC	1	0,0	0			
	2	13,64	3			
	3	4,55	1	5	22,73	
	4	0,0	0			
	5	4,55	1			

¹DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

Gráfica 3-2. Interacción entre diagnóstico histopatológico y grupo etario



DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

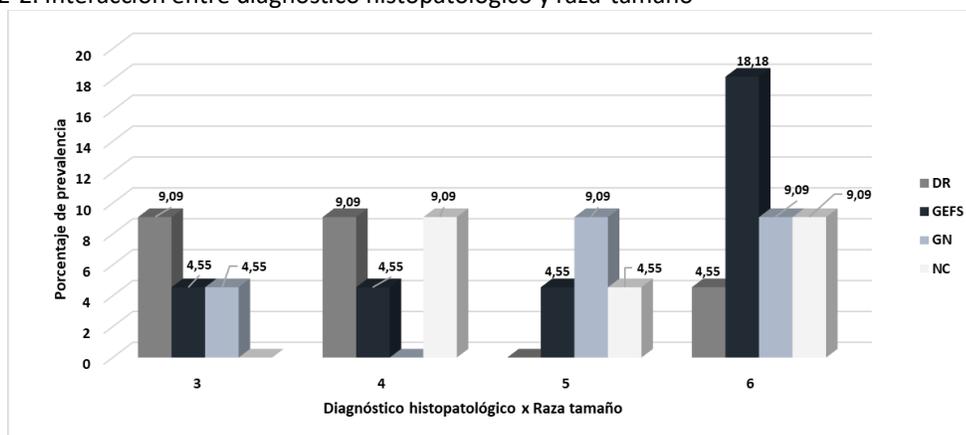
En la Tabla 8-2, se observa que no existe ningún tipo de asociación ($P > 0.05$) entre el diagnóstico histopatológico observado y el tamaño de la raza, lo que indica que estas variables actúan de manera independiente. Sin embargo, se puede observar que para el diagnóstico histopatológico GEFS hubo mayor presencia del grupo de raza tipo 6 (18,18%), correspondiente a caninos mestizos (Gráfica 4-2).

Tabla 2-8. Interacción entre diagnóstico histopatológico y raza-tamaño

Diagnóstico histopatológico ¹	Raza-tamaño	Porcentaje (%)	Frecuencia	P-Valor	Total n	%Total
DR	3	9,09	2	0,6318	5	22,73
	4	9,09	2			
	5	0,0	0			
	6	4,55	1			
GEFS	3	4,55	1		7	31,82
	4	4,55	1			
	5	4,55	1			
	6	18,18	4			
GN	3	4,55	1		5	22,73
	4	0,0	0			
	5	9,09	2			
	6	9,09	2			
NC	3	0,0	0		5	22,73
	4	9,09	2			
	5	4,55	1			
	6	9,09	2			

¹DR: Displasia renal; GEFS: Glomerulosclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

Gráfica 2-2. Interacción entre diagnóstico histopatológico y raza-tamaño



DR: Displasia renal; GEFS: Glomerulosclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

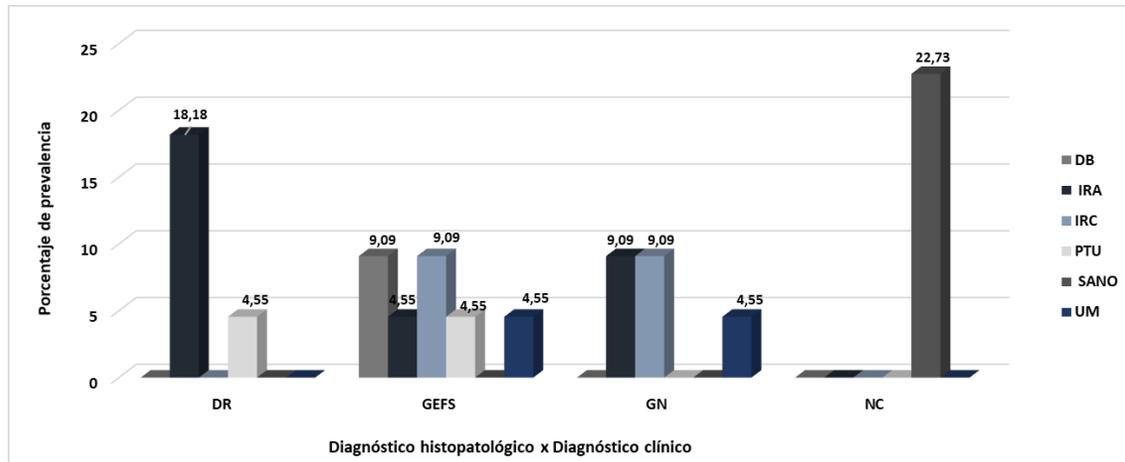
Al analizar las variables diagnóstico histopatológico y diagnóstico clínico, se observó que existe un alto grado de asociación ($P = 0.0005$) entre ellas (Tabla 9-2 y Gráfica 5-2). Una mayor prevalencia de Insuficiencia Renal Aguda (IRA, 18,18%) fue observada en caninos con displasia renal, mientras que la diabetes (DB, 9,09%) e Insuficiencia Renal Crónica (IRC, 9,09%), se observaron más frecuentemente en caninos con GEFS. IRA e IRC predominaron en proporción similar (9,09%), cuando los animales presentaron el cuadro histopatológico de glomerulonefritis.

Tabla 2-9. Interacción entre diagnóstico histopatológico y diagnóstico clínico

Diagnóstico histopatológico ¹	Diagnóstico clínico ²	Porcentaje	Frecuencia	P-Valor	Total n	%Total
DR	DB	0,0	0	0,0005	5	22,73
	IRA	18,18	4			
	IRC	0,0	0			
	PTU	4,55	1			
	SANO	0,0	0			
GEFS	UM	0,0	0			
	DB	9,09	2		7	31,82
	IRA	4,55	1			
	IRC	9,09	2			
	PTU	4,55	1			
SANO	0,0	0				
GN	UM	4,55	1			
	DB	0,0	0		5	22,73
	IRA	9,09	2			
	IRC	9,09	2			
	PTU	0,0	0			
SANO	0,0	0				
NC	UM	4,55	1			
	DB	0,0	0		5	22,73
	IRA	0,0	0			
	IRC	0,0	0			
	PTU	0,0	0			
SANO	22,73	5				
	UM	0,0	0			

¹DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control; ²DB: Diabetes; IRA: Insuficiencia renal aguda; IRC: Insuficiencia renal crónica; PTU: proteinuria; UM: Uremia.

Gráfica 2-3. Interacción entre diagnóstico histopatológico y diagnóstico clínico



DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

La interacción entre diagnóstico histopatológico y la presencia o grado de afección de las lesiones analizadas mediante microscopía óptica (Tabla 10-2) evidenció que, en cuanto a la presencia de complejos inmunes, estos se encontraron en un 9,09% de los casos de los grupos de GEFS y GN respectivamente, el resto de los casos de estos grupos y los de DR no evidenciaron ser mediados por inmunocomplejos. Se encontró que existe un grado de asociación alta entre los diagnósticos histopatológicos y el grado de afección para la mayoría de las lesiones. La hiper celularidad endocapilar leve, se presentó en el 18,18% y 13,64% asociada significativamente ($P = 0,0006$) a una condición de GEFS y GN, respectivamente. Tanto la hiper celularidad mesangial como la dada por neutrófilos fueron estadísticamente significativas y se presentaron principalmente en severidad moderada en los grupos de GEFS y GN. Las sinequias no presentaron significancia para todos los grupos, pero se presentaron de forma moderada y severa en los animales con GEFS principalmente. Las lesiones esclerosis glomerular y arterial se presentaron más comúnmente en los casos con la condición de DR y las lesiones fibrosis e inflamación fueron más frecuentes y severas en caninos con GN.

En la Tabla 11-2 se presenta la interacción entre diagnóstico histopatológico y grado de afección de lesiones analizadas mediante microscopía electrónica. Los resultados de este análisis exponen que la mayoría de las variables no evidencian diferencias significativas entre los grupos de diagnósticos histopatológicos ($P > 0,05$), lo que demuestra que las

Tabla 2-10. Interacción entre patrón histopatológico y grado de afección de lesión mediante microscopía óptica

Lesión	Grado de afección										P-Valor	Total n	%Total
	0		1		2		3		4				
	N	%	N	%	N	%	n	%	N	%			
Depósito de complejos Inmunes													
DR	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0287	5	22,73
GEFS	5	22,73	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Hiper celularidad Endocapilar													
DR	4	18,18	0	0,0	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0,0006	5	22,73
GEFS	3	13,64	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	1	4,55	3	13,64	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Hiper celularidad Mesangial													
DR	3	13,65	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0001	5	22,73
GEFS	4	18,18	1	4,55	2	9,09	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	0	0,0	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	4	18,18	0	0,0	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Hiper celularidad mesangio (neutrófilos)													
DR	3	13,64	0	0,0	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0,0038	5	22,73
GEFS	5	22,73	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Sinequias													
DR	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,1136	5	22,73
GEFS	6	4,55	1	13,64	0	4,55	0	4,55	0	0,0		7	31,82
GN	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Hialinosis													
DR	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0120	5	22,73
GEFS	6	27,27	0	0,0	1	4,55	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Engrosamiento de Asas Capilares													
DR	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0159	5	22,73
GEFS	5	22,73	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Membrana Basal Jorobas													
DR	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,2273	5	22,73
GEFS	7	31,82	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Expansión de la Matriz Mesangial													
DR	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0,0005	5	22,73
GEFS	3	13,64	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82

GN	1	4,55	3	13,64	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Grado de Esclerosis													
DR	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0,0016	5	22,73
GEFS	3	13,64	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Esclerosis Arterial													
DR	2	9,09	1	4,55	2	9,09	0	0,0	0	0,0	<0,0001	5	22,73
GEFS	6	27,27	0	0,0	1	4,55	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	0	0,0	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Fibrosis													
DR	3	13,64	0	0,0	2	9,09	0	0,0	0	0,0	<0,0001	5	22,73
GEFS	4	18,18	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	0	0,0	2	9,09	3	13,64	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Inflamación													
DR	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0	<0,0001	5	22,73
GEFS	6	27,27	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	1	4,55	3	13,64	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73

DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control.

variables se comportan de manera independiente y por lo tanto que las lesiones ultraestructurales son comunes a todos los grupos, pero se muestran en diferente grado de severidad, evidenciando que el daño glomerular presenta un patrón morfológico común independientemente de ser inducido de forma primaria o secundaria.

Tabla 2-11. Interacción entre patrón histopatológico y grado de afección de lesión mediante microscopía electrónica

Lesión	Grado de afección										P-Valor	Total n	%Total
	0		1		2		3		4				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Complejos Inmunes													
DR	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0195	5	22,73
GEFS	7	31,82	7	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	2	9,09	1	4,55	2	9,09	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73

Interposición Celular-Mesangial													
DR	2	9,09	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,1219	7	31,82
GN	0	0	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	4	18,8	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Tumefacción de Células Endoteliales													
DR	1	4,55	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	4	18,18	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,1592	7	31,82
GN	2	9,09	1	4,55	2	9,09	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Engrosamiento Difuso de MBC													
DR	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	7	31,82	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,6818	7	31,82
GN	4	18,18	0	0,0	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Células Inflamatorias Intravasculares													
DR	4	18,18	1	4,55	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	5	22,73	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,4446	7	31,82
GN	2	9,09	1	4,55	1	4,55	1	4,55	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Rarefacción de MBC													
DR	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	0	0	6	27,27	1	4,45	0	0,0	0	0,0	0,287	7	31,82
GN	2	9,09	2	9,09	1	4,55	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Lamelación de MBC													
DR	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	6	27,27	1	4,45	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,287	7	31,82
GN	2	9,09	2	9,09	1	4,45	0	0,0	0	0,0		5	22,73
NC	5	22,73	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Fusión de Podocitos													
DR	2	9,09	1	4,55	0	0,0	1	4,55	1	4,55		5	22,73
GEFS	2	9,09	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0,8226	7	31,82
GN	1	4,45	2	9,09	1	4,55	1	4,55	0	0,0		5	22,73
NC	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
Transformación Microvellosa													
DR	1	4,55	2	9,09	1	4,45	0	0,0	1	4,55		5	22,73
GEFS	2	9,09	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0,8272	7	31,82
GN	0	0	3	13,64	1	4,55	1	4,55	0	0,0		5	22,73

	NC	2	9,09	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	22,73
	Vacuolización Células Endoteliales												
DR	2	9,09	3	13,64	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73
GEFS	3	13,64	4	18,18	0	0,0	0	0,0	0	0,0		7	31,82
GN	0	0,0	3	13,64	2	9,09	0	0,0	0	0,0	0,1036	5	22,73
NC	4	18,18	1	4,45	0	0,0	0	0,0	0	0,0		5	22,73

DR: Displasia renal; GEFS: Glomeruloesclerosis focal y segmentaria; GN: Glomerulonefritis; NC: Normal control

Hallazgos histopatológicos: Riñones control

Las muestras obtenidas de animales sanos, sin proteinuria, presentaron glomérulos e intersticio sin cambios o con lesiones mínimas, por lo que se consideraron como controles adecuados. En estos especímenes la mayoría de los glomérulos fueron histológicamente normales. Los penachos glomerulares fueron generalmente normocelulares, las paredes capilares se encontraron de grosor normal y el mesangio no presentó expansión o hiper celularidad (Figura 1-2 a y b). En una muestra se evidenciaron ocasionales lesiones quísticas, caracterizadas por leves dilataciones glomerulares y tubulares sin presencia de reacción inflamatoria asociada. En el 4,55% (Tabla 10-2) de las muestras control se identificaron lesiones histológicas mínimas en algunos glomérulos, como hiper celularidad leve de células mesangiales y leve expansión de la matriz mesangial. A nivel ultraestructural, los pedicelos de los podocitos se encontraron normales y la membrana basal capilar (MBC) fue uniforme y homogénea (Fig.1-2 c y d). No se encontraron depósitos electro densos o acumulo de fibrillas citoplasmáticas (Tabla 11-2). En la IF no se observó marcación positiva para ninguna inmunoglobulina ni en el mesangio ni en las paredes capilares, la marcación para fibrinógeno también fue negativa (Fig.1-2 e y f).

Figura 2-1. Microfotografías animales grupo control

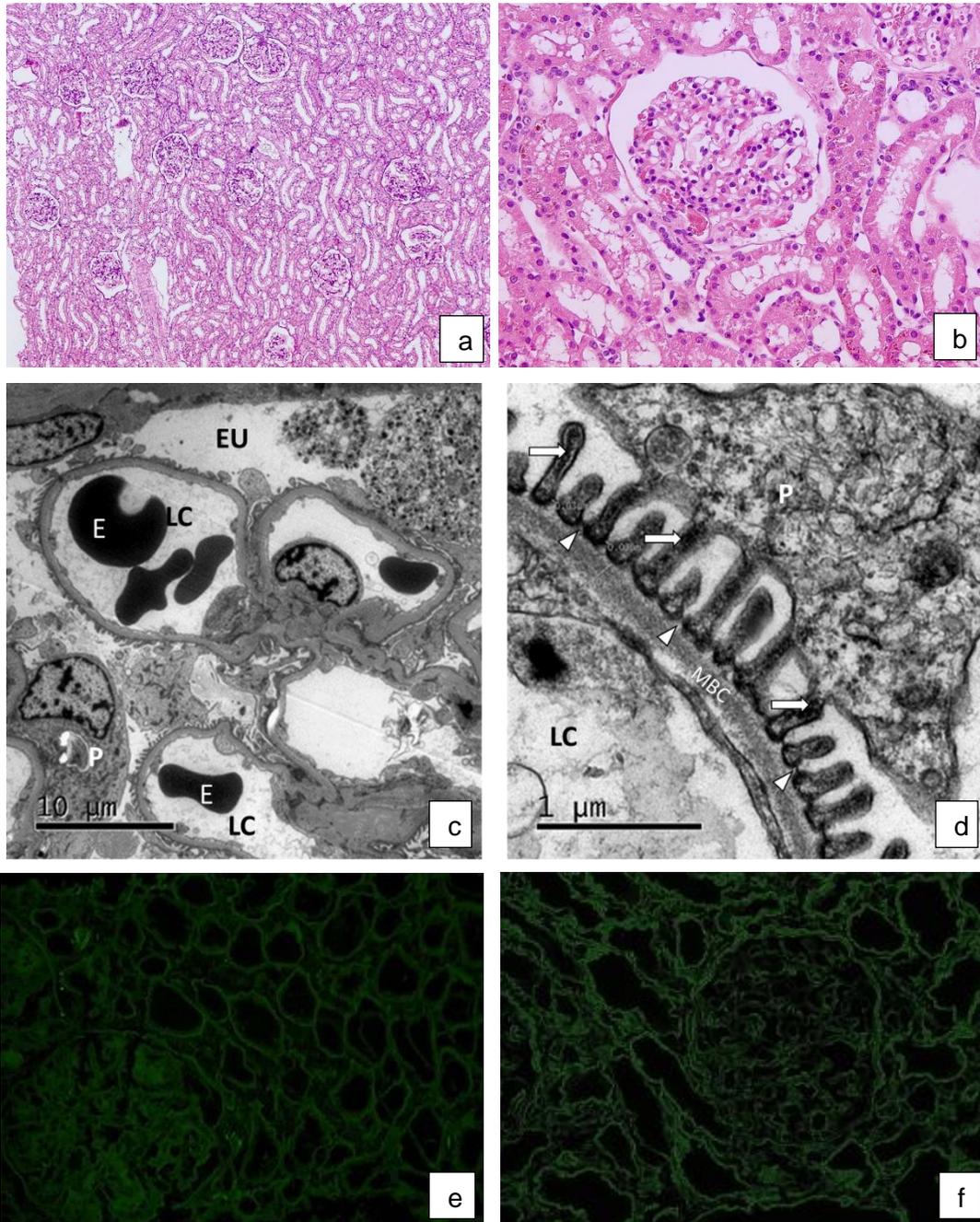


Figura 2-1. Microscopia óptica, tinción H&E, magnificación 10x, riñón canino grupo control. a. Microfotografía panorámica de corteza renal, presencia de estructuras tubulares y glomerulares normales. b. Detalle de glomérulo renal canino se evidencia espacio de Bowman, grosor de asas capilares y celularidad normal magnificación 40x. c. Ultraestructura de glomérulo canino, microfotografía panorámica de las asas capilares glomerulares. E: eritrocitos. LC: luz del capilar glomerular. EU: espacio urinario. d. Detalle de la membrana de filtración glomerular. MBC: membrana basal capilar, P: podocito. Las flechas muestran los pedicelos y la cabeza de flecha la hendidura diagramática (HD). e. Inmunofluorescencia directa tejido renal canino. a. Se evidenció marcación negativa para todas las inmunoglobulinas y fibrinógeno, se observa leve autofluorescencia normal para el tejido renal, magnificación 40x

Glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS)

Las muestras agrupadas con este patrón morfológico mostraron en todos los casos, lesiones características del patrón de GEFS, en los que se presentó lesión esclerótica en una porción del penacho capilar, en al menos un glomérulo de los evaluados en cada caso (Figura 2-1 a y b).

Se encontró expansión mesangial con diferentes grados de hiper celularidad y en algunos casos en asociación con colapso de asas capilares. La distribución de la esclerosis en el glomérulo (hiliar, cerca del origen del túbulo proximal o en cualquiera de los polos) fue muy variable entre los glomérulos, incluso dentro de una misma muestra. Se observaron sinequias y hialinosis de manera frecuente (Figura 2-2 a y b). Se encontró asociación la expansión de la matriz mesangial y el grado de esclerosis. La esclerosis glomerular global se encontró en todas las muestras, pero en un bajo porcentaje, representando en general menos de 5% de todos los glomérulos evaluados en cada caso. En uno de los casos se observaron macrófagos cargados de lípidos asociados a lesión glomerular inflamatoria (lipidosis glomerular). Los cambios túbulointersticiales como áreas de fibrosis y de inflamación fueron significativos en este grupo (Figura 2-2 c y d).

En algunos casos se encontró leve engrosamiento de la pared capilar y solo en dos casos se observaron cambios en la MBC como retracción de asas, dobles contornos y engrosamiento de la MBC (Figura 2-2 g). En la ultraestructura se observó extensa fusión de podocitos y transformación vellosa, en varios casos con acumulo de filamentos en las células podocitarias (Figura 2-2 f). Adicionalmente se evidenció la presencia de interposición de células mesangiales y lesiones endoteliales leves a moderadas (Figura 2-2 e). La MBC mostró engrosamiento en uno de los casos, dobles contornos y ensanchamiento de la lámina rara interna en otro (Figura 2-2 f). Se observaron depósitos electrodensos en dos de los casos, ambos de localización mesangial y uno subendotelial (Figura 2-2 e y f).

La IF reveló marcación positiva en la pared capilar y/o mesangial de intensidad moderada para IgA e IgM en dos de los casos (Figura 2-2 h), los cuales también mostraron depósitos electrodensos en la MET. Los demás casos presentaron patrones de tinción negativos o equívocos, varias de las muestras presentaron aumento en la autofluorescencia o cambios por inadecuada preservación.

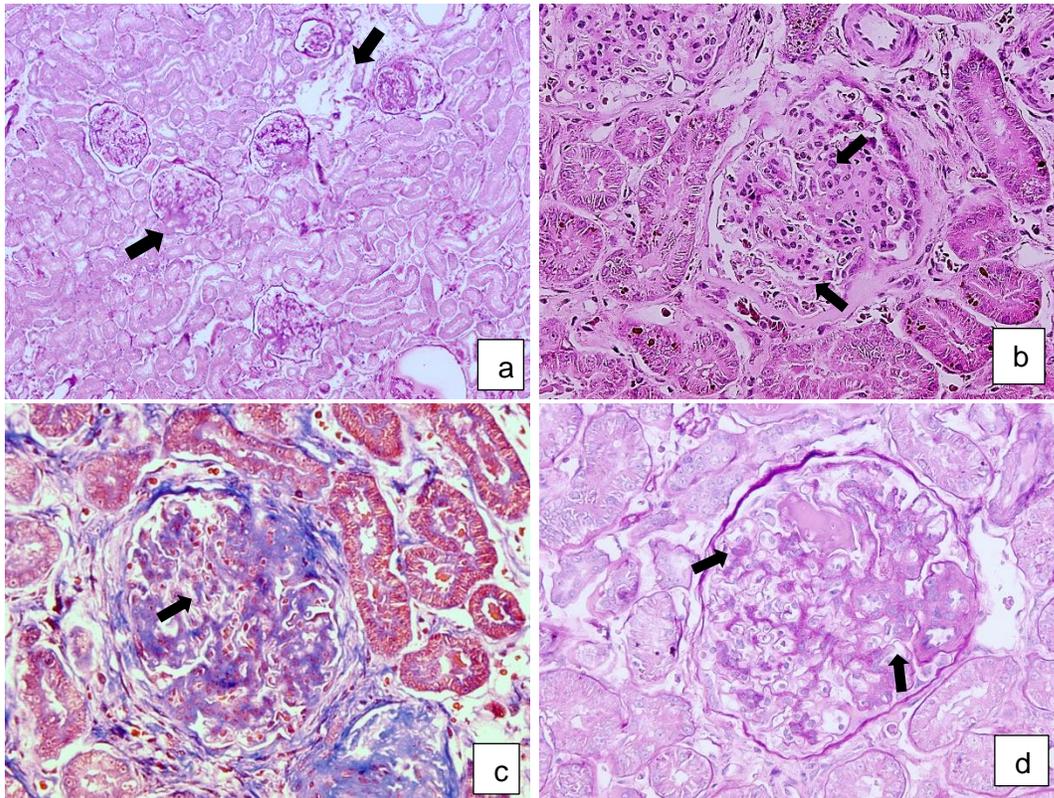


Figura 2-2. Microfotografías de muestras del grupo de GEFS. a. Microscopía óptica, tinción H&E, magnificación 10x, se evidencian patrones de esclerosis glomerular segmentaria (flechas) en varios glomérulos. b. Detalle de glomérulo renal se observa esclerosis y sinequia en un polo del glomérulo, aumento del grosor de la capsula de Bowman y aumento en la celularidad y matriz mesangial, tinción de PAS, magnificación 40x. c. Detalle de glomérulo, zonas de esclerosis, aumento del colágeno en áreas de sinequias y región periglomerular. Tinción TMC, magnificación 40X. d. Tinción PAS, se observa aumento de la matriz mesangial, hiper celularidad, engrosamiento de MBC, sinequias. Magnificación 40X.

Displasia Renal

Lesiones compatibles con la DR fueron encontrados en cinco de los casos. Displasia renal es un término utilizado para describir una anomalía en la diferenciación y maduración del tejido renal. La característica definitoria es la presencia de glomérulos de menor tamaño y en menor número en la corteza renal e inadecuado desarrollo tubular. En los casos de este estudio se observó disminución en el número de glomérulos y atrofia glomerular, con una apariencia fetaloides (Figura 3-2 a y b) y áreas extensas de la fibrosis glomerular y túbulointersticial (Figura 3-2 c y d). Solo en muy escasas regiones se observó presencia de algunos glomérulos de tamaño normal. Se observó alto grado de asociación ($P = <0,0001$) para lesiones como esclerosis arterial, fibrosis e inflamación con el patrón

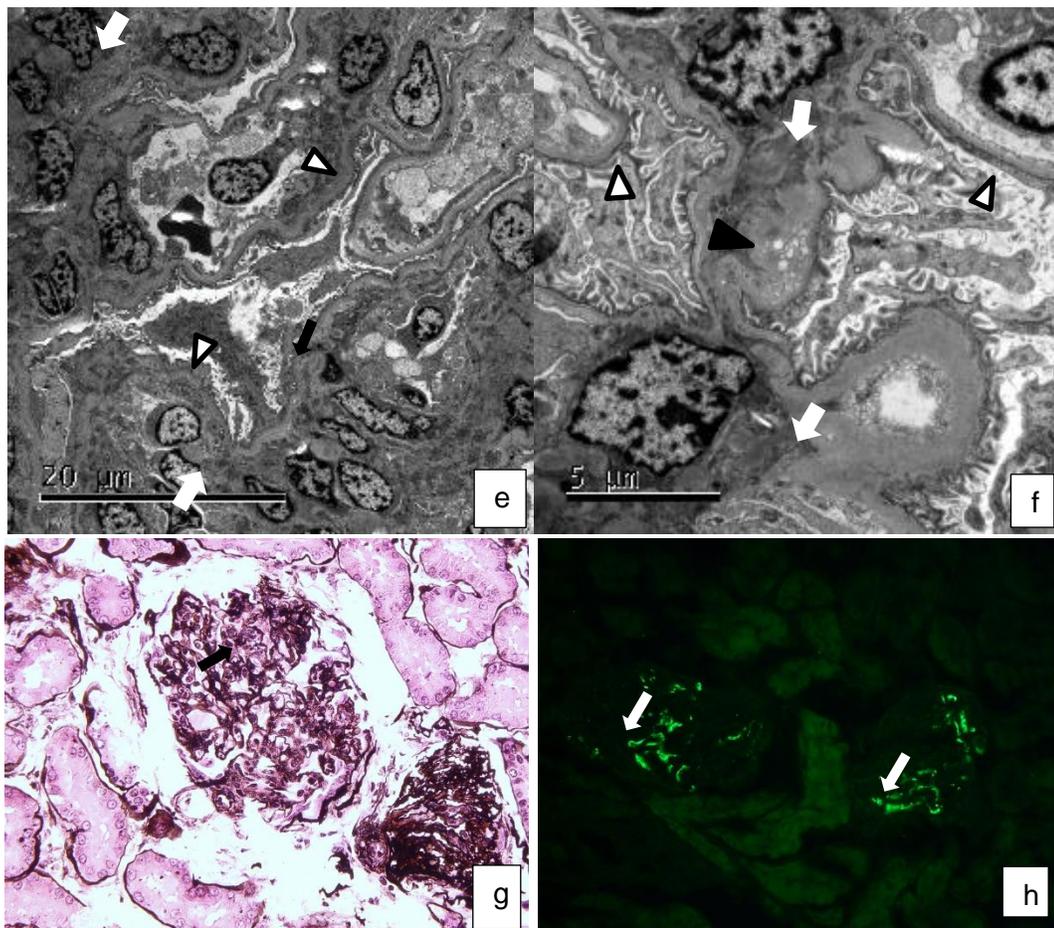


Figura 2-2, continuación. e. Ultraestructura de glomérulo canino, microfotografía panorámica, hiper celularidad, fusión de podocitos y transformación vellosa. f. Detalle de MBC, vacuolización (cabeza de flecha negra) y fusión de podocitos (triángulo blanco), presencia de depósitos electrodensos (flechas). g. Retracción de asas, dobles contornos y engrosamiento de la MBC. Tinción plata metamina, magnificación 40x. h. Inmunofluorescencia directa. Se evidencia marcación positiva para IgA a nivel mesangial y en algunas asas capilares. Magnificación 40x.

histopatológico en estos casos. Se presentó un grado de severidad de tipo 2 (moderado) con prevalencia (9,09%), para la DR. En la ultraestructura se evidenció presencia de glomérulos pequeños, inmaduros, con membranas basales delgadas y podocitos hipertróficos (Figura 3-3 e y f). En la inmunofluorescencia se presentó marcación leve positiva en algunos glomérulos para IGM o IgA, probablemente por atrapamiento.

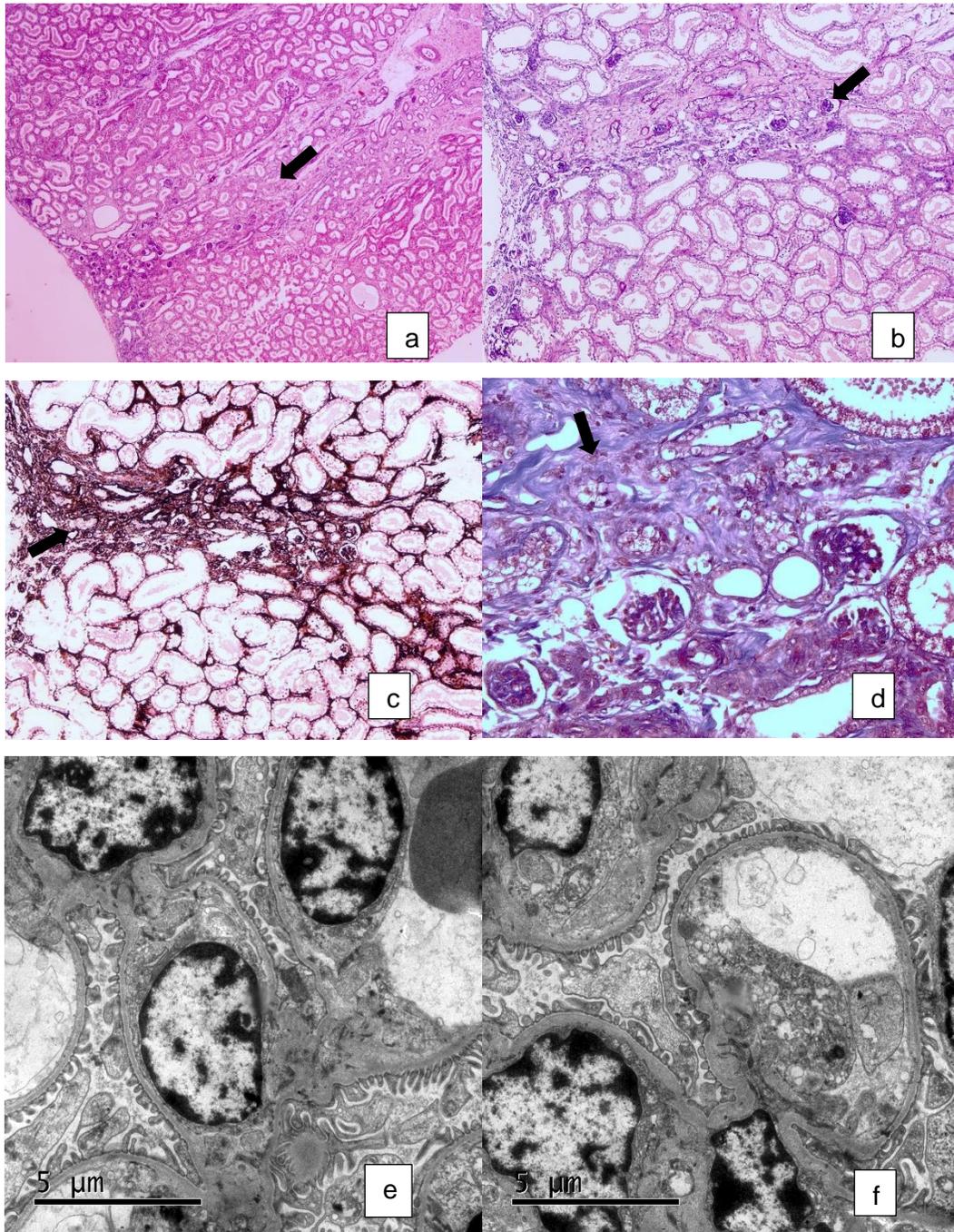


Figura 2-3. Microfotografías de tejidos de casos con displasia renal. a. Microscopía óptica, tinción H&E, magnificación 5x. Se evidencia disminución en el tamaño de los glomerulos (flechas), áreas con disminución en la formación de túbulos y glomerulos, así como, fibrosis del tejido del parénquima renal. b. Tinción PAS, áreas de displasia en el desarrollo glomerular y tubulointerstitial, magnificación 10x. c. Focos de retracción glomerular y áreas de esclerosis del parénquima. Tinción de plata, 20x. d. tinción TCM, focos de esclerosis, disminución en número y tamaño de glomerulos, menor cantidad de formaciones tubulares. Magnificación 40X. e. En la ultraestructura se aprecian la hiper celularidad, el adelgazamiento de la membrana basal capilar y la apariencia inmadura de los glomerulos. f.

Glomerulonefritis

Los casos incluidos en este grupo presentaron un patrón glomerular e intersticial caracterizado por presencia de células inflamatorias tanto mononucleares como polimorfonucleares en los glomérulos y en el intersticio, así como, grados variables de fibrosis intersticial (Figura 4-2 a y b). Las lesiones fibrosis e inflamación se presentaron con mayor frecuencia en este tipo de patrón.

Se observó en algunos casos, hipertrofia de células parietales y regeneración tubular. Números pequeños de neutrófilos (1-5 por glomérulo) estuvieron presentes en la mayoría de los glomérulos. Uno de los casos mostró cambios característicos de la glomerulonefritis membranoproliferativa con presencia de dobles contornos, hiper celularidad, hialinosis arteriolar, engrosamiento de la cápsula de Bowman y fibrosis periglomerular.

Las principales características ultraestructurales fueron la presencia de células inflamatorias y lesiones de las células endoteliales (Figuras 4-2 c y d). Se encontró fusión de podocitos y transformación vellosa en forma moderada en la mayoría de los casos. Se encontraron depósitos electro densos en el mesangio en 3 de los casos y subendoteliales solo en uno. En la inmunofluorescencia se evidenció marcación positiva para dos de los casos a nivel mesangial y uno adicionalmente también subendotelial, correspondiendo a los mismos casos con presencia de depósitos en la microscopía electrónica (Figura 4-2 e y f). En este grupo se incluyeron dos de los casos los cuales mostraron características morfológicas de riñón terminal, glomerulonefritis crónica, en la que se encontró esclerosis tanto glomerular como intersticial en más del 50% del parénquima renal evaluado.

2.5 Discusión

En el presente estudio se analizaron histopatológicamente caninos que exhibían algún grado clínico de proteinuria para determinar y clasificar el tipo de afección renal y glomerular que presentaban y aclarar algunos de los mecanismos asociados al proceso

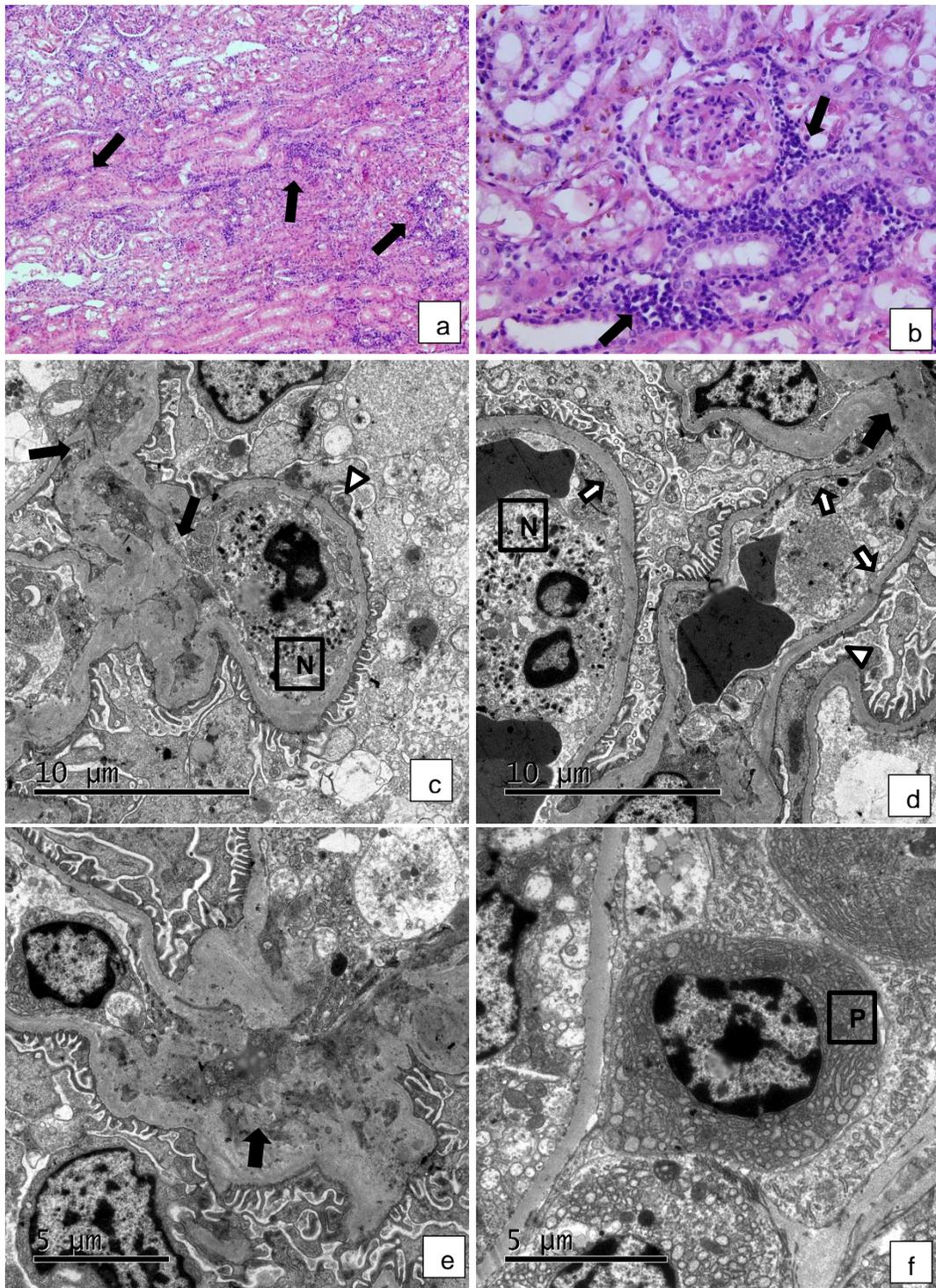


Figura 2-4. Microfotografías de especímenes caninos con glomerulonefritis, a. Microscopía óptica, tinción H&E, magnificación 10x. Infiltrado inflamatorio tubulointersticial. b. Detalle de inflamación glomerular y tubulointersticial periglomerular. Se evidencia presencia esclerosis focal y segmentaria y retracción a nivel glomerular. Tinción H&E, magnificación 40x. c. Ultraestructura glomerular, presencia de células inflamatorias de tipo polimorfonucleares neutrófilos (N). d. Daño endotelial (flecha blanca) e. Expansión de la matriz mesangial (flecha). f. Espacio tubulointersticial, infiltrado de células mononucleares de tipo plasmocitos (P).

patológico subyacente. Varios autores han relacionado el aumento de la excreción urinaria de proteínas con la disminución de la supervivencia, lo cual ha mostrado ser independiente de cualquier otro factor. La enfermedad renal proteinúrica progresa más rápidamente que la enfermedad renal no proteínica y la reducción de la excreción de proteínas urinarias ralentiza la progresión de la enfermedad renal, así como la inflamación intersticial, tanto en humanos como en perros, por lo que se especula que la proteinuria en sí misma contribuye al daño renal continuo (Harley & Langston, 2012a; Jacob et al., 2005; LeVine et al., 2010; Maas, Deegens, van den Brand, Cornelissen, & Wetzels, 2013). Los resultados de este estudio relacionan positivamente el rango de proteinuria, desde el grado 2 (valores de UP/C 0.2- 0.5) hasta el rango 3 (UP/C >0.5), con el grado de afección renal, lo que está de acuerdo con esta asociación.

La proteinuria se considera la consecuencia de la disfunción de la barrera de filtración. Se ha encontrado relación entre el grado de afección de los podocitos y el nivel de proteinuria, los mecanismos y las consecuencias de la lesión de la célula podocitaria son todavía materia de constante estudio (Arif et al., 2014; Mathieson, 2011; Perysinaki et al., 2011; Román Ortiz, 2014). Se han descrito dos tipos principales de lesión del podocito con consecuencias clínicas: la lesión subletal de las nefropatías potencialmente reversibles y la lesión letal que daría lugar a una nefropatía progresiva. La proteinuria glomerular se suele caracterizar por fusión o desaparición de los pedicelos del podocito. En humanos, muchos casos de síndrome nefrótico infantil y en la mayoría de las nefropatías proteinúricas del adulto, la pérdida de pedicelos es considerada una manifestación temprana de una fase continua de lesión del podocito que incluye vacuolización, acumulo de filamentos, hipertrofia, desprendimiento del podocito de la membrana basal y finalmente, pérdida de la célula podocitaria (Kriz & LeHir, 2005; Li et al., 2015; Román Ortiz, 2014).

Debido a que la proteinuria renal es entonces una manifestación del daño glomerular, la medición de la proteína en orina debe considerarse una herramienta clínica para determinar el estudio histopatológico del riñón mediante el uso de una biopsia renal, ya que permite la definición del proceso patológico y el posible tratamiento y pronóstico del paciente (M Littman et al., 2013; MP Littman et al., 2013; Vaden, 2011).

A partir del estudio histopatológico se logró identificar tres entidades principales, displasia renal (DR), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) y glomerulonefritis (GN). Todos los animales incluidos en el presente estudio presentaron algún grado de glomerulopatía a diferencia de los animales del grupo control; adicionalmente los animales enfermos mostraron diferente forma variables de daño tubulointersticial, siendo más severo en los animales con DR y GN. El grupo de caninos con displasia renal presentó un grado de proteinuria más severo que los demás grupos lo cual puede explicarse tanto por la disminución en el número de glomérulos funcionales, así como por la ausencia de desarrollo tubular adecuado, lo que coincide con lo reportado por varios autores, donde la disfunción y daño tubular aumenta el grado de proteinuria debido a la falta de reabsorción tubular activa (Brum, Juliano, Souza, Fleury, & Damasceno, 2008; Harley & Langston, 2012b; Raval et al., 2015). En los animales con displasia renal se encontró disminución en la cantidad de estructuras tubulares normales y amplias áreas de cicatrización con fibrosis extensa, lo cual se manifestaba con un grado de proteinuria severo en la mayoría de los pacientes de este grupo.

Un hallazgo importante en nuestro estudio fue la presentación de varios casos de displasia renal. Este tipo de lesiones no ha sido reportado como una patología frecuente en otros trabajos similares que han evaluado muestras de caninos con proteinuria (Cianciolo et al., 2016; Ichii et al., 2011; Lees et al., 2011), mostrando una posible mayor incidencia en nuestro medio o mayor representación de estos casos por el tipo de muestreo utilizado en nuestro estudio. La DR se conoce con varios nombres, incluyendo nefropatía progresiva juvenil, enfermedad renal familiar y displasia juvenil renal. "Displasia" es un término utilizado para describir una anomalía en la maduración. Estas lesiones pueden originarse durante la organogénesis en las nefronas o en los túbulos colectores y hacia el final de la nefrogénesis, en cualquier parte de la nefrona, ya sea en la estructura glomerular o en el sistema colector (Chandler, Elwood, Murphy, Gajanayake, & Syme, 2007a; Qiu & Zhou, 2016; Wakamatsu, Surdyk, Carmichael, & Brown, 2007). Se trata de una enfermedad compleja con un fenotipo muy variable y un modo de herencia que no sigue un patrón mendeliano simple. Los resultados de investigaciones sugieren que las mutaciones en el gen Cox-2 podrían ser la causa de la DR en los perros. La secuenciación del gen Cox-2 canino no ha detectado cambios en la región codificante, pero ha encontrado pequeñas

inserciones y supresiones en posibles elementos reguladores de ADN de localización *cis*, las cuales regulan la expresión de Cox-2 (Whiteley, Bell, & Rothman, 2011).

La DR es una enfermedad de compleja, de tipo heredofamiliar que se puede presentar de manera congénita, donde se identifica en animales jóvenes que comienzan a exhibir proteinuria progresiva. Los resultados del presente estudio mostraron una relación positiva entre la variable edad y el patrón de esta afección renal, identificada principalmente en animales de los grupos etarios 1 y 2. Los hallazgos histopatológicos y de ultraestructura de estos especímenes fueron similares a los descritos en varias razas de perros, en general presentando alto grado de severidad (Chandler, Elwood, Murphy, Gajanayake, & Syme, 2007b; Meryl P. Littman, Wiley, & Raducha, 2013; Qiu & Zhou, 2016; Wakamatsu et al., 2007). Se encontró diferenciación asincrónica de las nefronas con presencia de glomérulos fetales y/o túbulos inmaduros intercalados con tejido renal maduro, con glomérulos y túbulos de tamaño normal. En general este tejido inmaduro se presentó en áreas radiales de la corteza a la unión cortico-medular asociada con áreas de fibrosis intersticial e hipertrofia y esclerosis arterial. Los cambios compensatorios se encontraron en algunos casos y se caracterizaron por glomerulomegalia y dilatación tubular. La representación de un porcentaje representativo de estos casos en nuestro estudio se puede explicar por el tipo de cuadro clínico, el cual en la mayoría se presentó en forma de insuficiencia renal aguda (IRA) o crónica (IRC), donde la proteinuria progresiva y la no respuesta a los tratamientos, conlleva al sacrificio del animal.

Por otro lado, la GEFS fue la lesión más frecuentemente observada en este estudio, lo que concuerda con lo mostrado por Cianciolo y col. en 2016 y Schneider y col. en 2013, quienes, en investigaciones llevadas a cabo con poblaciones numerosas de caninos, analizaron las biopsias renales con metodologías avanzadas, para proponer una metodología consenso, en cuanto al estudio histopatológico de este tipo de especímenes. En estos estudios se presentó como principal patrón morfológico la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, como forma común de enfermedad glomerular. En humanos con síndrome nefrótico se ha descrito ampliamente y se atribuye a una lesión en la célula epitelial visceral glomerular (podocito) y hoy es reconocida como una de las lesiones

renales más frecuentes en halladas en caninos (Akchurin & Reidy, 2014; Arias et al., 2009; Carney, 2014; Erkan et al., 2004; Maas et al., 2013).

El podocito juega un papel central en la permeselectividad de la filtración glomerular y responde a la injuria con cambios reversibles como la hipertrofia, la fusión o borramiento de podocitos, la atenuación del cuerpo celular y la formación de microvellosidades o transformación vellosa (Kriz, Shirato, Nagata, Lehir, & Lemley, 2013; Ohse et al., 2009), si la lesión continua, el podocito irreversiblemente se separa del aspecto externo de la MBG. Al ser una célula terminalmente diferenciada, con mínima capacidad proliferativa, la pérdida de podocitos resulta en hipertrofia de los restantes para cubrir la superficie de la membrana basal capilar desnuda. Los datos experimentales indican que, si más del 40% de los podocitos se pierden, los restantes no son capaces de cubrir todo el penacho glomerular, dejando áreas desnudas de MBC, la cual se adhiere a la cápsula de Bowman formando sinequias y el penacho sufre esclerosis o cicatrización segmentaria (Bierzynska, Soderquest, & Koziell, 2015; Kriz & LeHir, 2005; Neusser et al., 2010; Tao, Polumbo, Reidy, Sweetwyne, & Susztak, 2014). En el presente estudio, se encontraron evidencias de las diferentes lesiones podocitarias en grados moderados a severos en los animales con GEFS, mostrando asociación entre el daño del podocito y el grado de proteinuria.

La pérdida de podocitos y la GEFS pueden ser primarias o secundarias. Se propone que los casos primarios (o idiopáticos) se deben a defectos innatos en genes o proteínas de los podocitos o los diafragmas de filtración. En humanos, una vez que se identifican las lesiones se busca identificar la mutación causal para aclarar la patogénesis del daño en los podocitos (Carney, 2014; Kobayashi et al., 2011b).

El primer caso documentado de GEFS en caninos, descrito con hallazgos histopatológicos, de IF y de MET se publicó en 2010 (Aresu, Zanatta, Luciani, Trez, & Castagnaro, 2010). Debido a la creación del consenso mejorado sobre el patrón morfológico renal, las lesiones de GEFS primaria han sido reconocidas como la causa más común de enfermedad glomerular en perros. En los últimos estudios sobre enfermedad renal canina, la evaluación utilizando ML, IF y MET, se demostró que la GEFS es una causa común de proteinuria, lo que explica el 20,6% de los casos (Schneider et al., 2013). Adicionalmente, en estudios de Asociación de Genoma Completo (GWAS), se reveló que la nefropatía por

pérdida de proteínas en Terrier Branco se debía a mutaciones en dos genes, NPHS1 y KIRREL2, los cuales codifican para la nefrina y la filtrina, respectivamente. Estas proteínas hacen parte de la hendidura del diafragma de filtración del podocito y es el fenotipo patológico proteinúrico en esta raza de perros, sin embargo, la patogenia exacta de cómo estas mutaciones interfieren con la función de los podocitos sigue siendo desconocida (Meryl P. Littman et al., 2013). En humanos se han identificado causas genéticas similares de GEFS y se denominan síndromes nefróticos de tipo familiar (Patrakka & Tryggvason, 2010; Peña & Mendizabal, 2008; Rood, Deegens, & Wetzels, 2012).

De otra parte, también se pueden producir daños inflamatorios y GN que desencadenen en glomerulopatías de este tipo. Los medios más comunes por los cuales se dañan los glomérulos incluyen: inflamación, reacciones inmunitarias e hipertensión.

La GEFS secundaria también puede ser mediada por depósitos de complejos inmunes lo que puede inducir lesiones en los podocitos y, por lo tanto, glomeruloesclerosis segmentaria, como se ha descrito en humanos y en perros. Los casos con esclerosis segmentaria evaluados únicamente con ML podrían tener complejos inmunes histológicamente indetectables, lo cual enfatiza la importancia de la ultraestructura en el estudio renal (Cianciolo et al., 2013, 2016; Kari et al., 2014). En el presente estudio se encontró escasa representación de casos mediados por depósitos de complejos inmunes, pero se especula que esto se deba a la metodología de muestreo realizada, donde no están representado los animales con enfermedades infecciosas o lesiones glomerulares activas. Los animales con casos de GN en este estudio, mostraron lesiones tanto glomerulares como tubulointersticiales, mostrando como mecanismo de lesión en el glomérulo, daños secundarios en los podocitos.

La hipertensión también es conocida por dañar los podocitos y causar esclerosis en humanos y podría tener un efecto similar en caninos. Aunque la obesidad y la hipertensión se han asociado con proteinuria en perros, hay algunos estudios con resultados contradictorios (Bartges, 2012; Kriz & LeHir, 2005; Tao et al., 2014). Es importante aclarar que el tejido renal en estos estudios en caninos no fue evaluado con las modalidades de diagnóstico avanzadas (MET), por lo que la asociación de hipertensión y la obesidad con

GEFS requiere aún más investigación en perros. Las lesiones típicas de la esclerosis segmentaria requieren una confirmación utilizando la técnica de microscopía electrónica (Bartges, 2012; Cianciolo et al., 2016; Neusser et al., 2010; Sugahara, Hosaka, Mineshige, Kamiie, & Shirota, 2015; Tao et al., 2014; William, Hogan, & Battle, 2005).

Por medio de este trabajo se realizó la primera descripción compleja de la histopatología renal canina con utilización de metodologías avanzadas en nuestro medio, con la intención de realizar un estudio comparativo con las glomerulopatías humanas y permitiendo establecer hipótesis a cerca de la fisiopatología de este tipo de enfermedades podocitarias.

En el momento de la planeación del estudio, se pretendía realizar la investigación sobre especímenes de tejido renal de animales vivos, que estuvieran en tratamiento por enfermedades que cursaran con proteinuria idiopática masiva o persistente, por medio del estudio histopatológico sobre biopsias renales. Sin embargo, dadas las dificultades para la consecución de las muestras, se determinó que no se realiza la toma de biopsias renales de manera rutinaria en clínicas privadas, ni en hospitales universitarios de las principales ciudades del país, lo que permitió la consecución de solo dos biopsias renales, razón que llevo a que el estudio se realizará sobre especímenes procedentes de necropsias de animales recién sacrificados en su mayoría.

La falta de especímenes de tejidos reales toma por biopsias, puede tener varias explicaciones, pero principalmente se pueden exponer de dos formas, la primera es que en general las enfermedades con pérdida de proteínas a nivel renal pasan desapercibidas por los propietarios, razón por la cual los animales son llevados a consulta cuando la enfermedad ya está muy avanzada y/o se presenta falla renal crónica. La otra razón es, como lo reportan Cianciolo y colaboradores en el 2016, el uso poco frecuente o el desconocimiento de las herramientas actualmente disponibles para el diagnóstico preciso en la biopsia renal canina, lo cual ha creado preocupaciones asociadas con la utilidad o la oportunidad del uso de esta herramienta en la clínica veterinaria (Cianciolo et al., 2016).

Adicionalmente, la toma de una biopsia renal adecuada requiere la planeación adecuada y la disponibilidad de los servicios diagnósticos completos que permitan el adecuado estudio de la misma (Lees et al., 2011; Schneider et al., 2013; Sugahara et al., 2015;

Vaden, 2011; Vaden et al., 2005), así que en nuestro medio se subestima o desconoce la posibilidad de su uso. Este tipo de estudios buscan afianzar el conocimiento sobre la utilidad de las herramientas histopatológicas en la práctica clínica, como ocurre por ejemplo en el caso de la oncología.

El estudio permitió la descripción detallada de las lesiones y comparación de los hallazgos histopatológicos en caninos, con aquellos descritos para las muestras humanas, mostrando el mismo tipo de lesiones y evidenciando la gran similitud en el desarrollo de las glomerulopatías en las dos especies. Lo anterior refuerza como el canino es considerado actualmente un modelo de diversas enfermedades complejas en humanos y muestra que es un modelo adecuado para el estudio de las patologías renales de diversa índole, teniendo múltiples ventajas sobre los modelos murinos, especialmente la presentación natural y espontánea de las afecciones (Rørtveit et al., 2012; Tsai et al., 2007; Wakamatsu et al., 2007).

En conclusión, el estudio complejo de la biopsia renal en caninos ofrece mucha y valiosa información que permite la descripción de patrones de enfermedad y sus diferentes combinaciones, aportando en el entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades glomerulares tanto para el estudio en ciencias básicas, modelos para la patología comparada, así como para ser utilizado en la práctica clínica para un mejor y correcto abordaje de los pacientes proteinúricos en medicina veterinaria.

2.6 Bibliografía

- Aaltonen, P., Luimula, P., Aström, E., Palmen, T., Grönholm, T., Palojoki, E., ... Holthöfer, H. (2001). Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 81(9), 1185–1190.
- Adam, J., Connor, T. M. F., Wood, K., Lewis, D., Naik, R., Gale, D. P., & Sayer, J. a. (2013). Genetic testing can resolve diagnostic confusion in Alport syndrome. *Clinical Kidney Journal*, 7(2), 197–200. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft144>
- Akchurin, O., & Reidy, K. J. (2014). Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatric Nephrology*, 30(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2753-3>
- Aresu, L., Zanatta, R., Luciani, L., Trez, D., & Castagnaro, M. (2010). Severe renal failure in a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.12.016>
- Arias, L. F., Henao, J., Giraldo, R. D., Carvajal, N., Rodelo, J., & Arbeláez, M. (2009). Glomerular diseases in a Hispanic population: Review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Medical Journal*, 127(3), 140–144. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000300006>
- Arif, E., Rathore, Y. S., Kumari, B., Ashish, F., Wong, H. N., Holzman, L. B., & Nihalani, D. (2014). Slit diaphragm protein nephrin and its signaling: A novel therapeutic target for protection of podocytes against: Glomerular injury. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9502–9518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505743>
- Armelloni, S., Corbelli, A., Giardino, Laura1. Armelloni S, Corbelli A, Giardino L, et al. P. R. biomolecular developments. B. C. 2014;5(4):319-330. doi:10.1515/bm.-2014-0020., Li, M., Ikehata, M., Mattinzoli, D., ... Rastaldi, M. P. (2014). Podocytes: Recent biomolecular developments. *Biomolecular Concepts*, 5(4), 319–330.
- Baelde, H. J., Eikmans, M., Lappin, D. W. P., Doran, P. P., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P.-T., ... Bruijn, J. a. (2007). Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney International*, 71(7), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002101>
- Bartges, J. W. (2012). Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of*

- North America - Small Animal Practice*, 42(4), 669–692.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>
- Bate, S., & Clark, R. (2014). *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. (Cambridge University Press, Ed.) (2014th ed.).
- Bierzynska, A., Soderquest, K., & Koziell, A. (2015). Genes and podocytes - New insights into mechanisms of podocytopathy. *Frontiers in Endocrinology*, 6(JAN), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00226>
- Brum, K. B., Juliano, R. S., Souza, M. A., Fleury, L. F. F., & Damasceno, A. D. (2008). Renal dysplasia in a Boxer dog: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(5), 1084–1088. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000500007>
- Brunskill, E. W., & Potter, S. (2012). Changes in the gene expression programs of renal mesangial cells during diabetic nephropathy. *BMC Nephrology*, 13(1), 70.
<https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-70>
- Carney, E. F. (2014). Glomerular disease: Frequency of podocyte-related gene mutations in FSGS. *Nrn*, 10(4), 184. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.29>
- Cerda Lorca, J., & Villarroel Del P., L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062008000100008>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007a). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(12), 690–694. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007b). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Cienciolo, R. E., Brown, C. A., Mohr, F. C., Spangler, W. L., Aresu, L., van der Lugt, J. J., ... Lees, G. E. (2013). Pathologic evaluation of canine renal biopsies: Methods for identifying features that differentiate immune-mediated glomerulonephritides from other categories of glomerular diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/jvim.12226>
- Cienciolo, R. E., Mohr, F. C., Aresu, L., Brown, C. A., James, C., Jansen, J. H., ... Corresponda, A. Q. (2016). World Small Animal Veterinary Association Renal

- Pathology Initiative : Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53(1), 113–135.
<https://doi.org/10.1177/0300985815579996>
- Cowgill, L. D., & Polzin, D. J. (2013). Vision of the WSAVA Renal Standardization Project. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 5–10.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12227>
- Dandapani, S. V., Sugimoto, H., Matthews, B. D., Kolb, R. J., Sinha, S., Gerszten, R. E., ... Pollak, M. R. (2007). ??-Actinin-4 Is Required for Normal Podocyte Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 467–477.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M605024200>
- Dasari, S., Chakraborty, A., Truong, L., Mohan, C., L, J. C., & P, L. V. D. E. L. (2019). A Systematic Review of Interpathologist Agreement in Histologic Classification. *Kidney International Reports*, 4(10), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.06.011>
- Delimont, D., Dufek, B. M., Meehan, D. T., Zallocchi, M., Gratton, M. A., Phillips, G., & Cosgrove, D. (2014). Laminin α 2-Mediated Focal Adhesion Kinase Activation Triggers Alport Glomerular Pathogenesis. *PLoS ONE*, 9(6), e99083.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099083>
- Erkan, E., Garcia, C. D., Patterson, L. T., Mishra, J., Mitsnefes, M. M., Kaskel, F. J., & Devarajan, P. (2004). Induction of Renal Tubular Cell Apoptosis in Focal Segmental Glomerulosclerosis: Roles of Proteinuria and Fas-Dependent Pathways. *Journal of the American Society of Nephrology*, (22), ASN.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2003100861>
- Feldman, G., Kiely, B., Martin, N., Ryan, G., McMorrow, T., & Ryan, M. P. (2007). Role for TGF-beta in Cyclosporine-Induced Modulation of Renal Epithelial Barrier Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(6), 1662–1671.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006050527>
- Fogo, A. B., & Kon, V. (2010). The glomerulus - a view from the inside - the endothelial cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(9), 1388–1397.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.05.015>
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology*, 50(6), 1007–1015.
<https://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- Grauer. (2005). Canine glomerulonephritis: New thoughts on proteinuria and treatment.

- Journal of Small Animal Practice*, 46(10), 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x>
- Grauer, G. F. (2011a). Introduction: Proteinuric Renal Disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 119–120. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.05.001>
- Grauer, G. F. (2011b). Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 121–127. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>
- Gross, O., & Kashtan, C. E. (2009). Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney International*, 76(6), 599–603. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.223>
- Guillén-Navarro, E., Ballesta-Martínez, M. J., & López-González, V. (2011). Genética y enfermedad. Concepto de genética médica. *Revista Nefrología*, 2(1), 3–10. <https://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10889>
- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J., & Brady, H. R. (2000). Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*, 58(4), 1389–1399. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00301.x>
- Harley, L., & Langston, C. (2012a). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*.
- Harley, L., & Langston, C. (2012b). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*, 53(June), 631–638.
- He, J. C., Chuang, P. Y., Ma'Ayan, A., & Iyengar, R. (2012). Systems biology of kidney diseases. *Kidney International*, 81(1), 22–39. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.314>
- Honda, K. (2015). The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell & Bioscience*, 5, 41. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0031-0>
- Ichii, O., Yabuki, A., Sasaki, N., Otsuka, S., Ohta, H., Yamasaki, M., ... Kon, Y. (2011). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histology and Histopathology*, 26(10), 1243–1255.
- Iyengar, S. K., Freedman, B. I., & Sedor, J. R. (2007). Mining the genome for susceptibility to diabetic nephropathy: the role of large-scale studies and consortia. *Seminars in Nephrology*, 27(2), 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.01.004>
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A., & Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and

- morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393–400.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.393>
- Kari, J. A., Montini, G., Bockenbauer, D., Brennan, E., Rees, L., Trompeter, R. S., ... Marks, S. D. (2014). Clinico-pathological correlations of congenital and infantile nephrotic syndrome over twenty years. *Pediatric Nephrology*, 2173–2180.
<https://doi.org/10.1007/s00467-014-2856-x>
- Kavoura, E., Gakiopoulou, H., Paraskevakou, H., Marinaki, S., Agrogiannis, G., Stofas, A., ... Lazaris, A. C. (2011). Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome. *Human Pathology*, 42(2), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.028>
- Kawachi, H., Suzuki, K., Miyauchi, N., Hashimoto, T., Otaki, Y., & Shimizu, F. (2009). Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(4), 275–280.
<https://doi.org/10.1007/s10157-009-0162-x>
- Kelly, D. J., Aaltonen, P., Cox, A. J., Rumble, J. R., Langham, R., Panagiotopoulos, S., ... Gilbert, R. E. (2002). Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(7), 1327–1332.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., ... Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell*, 1(4), 575–582.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80057-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80057-X)
- Khoury, C. C., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2015). *Chronic Renal Disease*. *Chronic Renal Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411602-3.00013-5>
- Kim, R. N., Kim, D. S., Choi, S. H., Yoon, B. H., Kang, A., Nam, S. H., ... Park, H. S. (2012). Genome analysis of the domestic dog (Korean jindo) by massively parallel sequencing. *DNA Research*, 19(3), 275–287. <https://doi.org/10.1093/dnares/dss011>
- Klosterman, E. S., Moore, G. E., de Brito Galvao, J. F., Dibartola, S. P., Groman, R. P., Whittemore, J. C., ... Pressler, B. M. (2011). Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *Journal of Veterinary*

- Internal Medicine*, 25(2), 206–214. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0669.x>
- Klosterman, & Pressler. (2011). Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 135–142. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.004>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011a). Expression of Nephtrin, Podocin, α -Actinin-4 and α 3-Integrin in Canine Renal Glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011b). Expression of nephrin, podocin, α -actinin-4 and α 3-integrin in canine renal glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., Shirota, K., Li, X., ... Ahola, H. (2015). Nephtrin Contributes to Insulin Secretion and Affects Mammalian Target of Rapamycin Signaling Independently of Insulin Receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(6), e0157497. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>
- Kriz, W., & LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - Insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), 404–419. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x>
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., Lehir, M., & Lemley, K. V. (2013). The podocyte 's response to stress : the enigma of foot process effacement. *Am Physiol RENal Physiol*, 333–347. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00478.2012>
- Kruegel, J., Rubel, D., & Gross, O. (2013). Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nature Reviews. Nephrology*, 9(3), 170–178. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.259>
- Lees, G. E., Cianciolo, R. E., & Clubb, F. J. (2011). Renal biopsy and pathologic evaluation of glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 143–153. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.006>
- León-Bojorge, D. B. De. (2010). La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica Biopsia de médula ósea, 31(4), 178–187.
- LeVine, D. N., Zhang, D., Harris, T., & Vaden, S. L. (2010). The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein: Creatinine ratios. *Veterinary Clinical*

Pathology. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00167.x>

- Li, X., Chuang, P. Y., D'Agati, V. D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., ... He, J. C. (2015). Nephritin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1–17. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>
- Liapis, H., & Gaut, J. P. (2013). The renal biopsy in the genomic era. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 28(8), 1207–1219. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2356-9>
- Littman. (2011). Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(1), 31–62. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.09.006>
- Littman. (2015). Emerging perspectives on hereditary glomerulopathies in canines. *Advances in Genomics and Genetics, Volume 5*, 179. <https://doi.org/10.2147/AGG.S65965>
- Littman, M. P., Daminet, S., Grauer, G. F., Lees, G. E., & van Dongen, a. M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, M, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & M, van D. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, Meryl P. (2013). Lyme nephritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(2), 163–173. <https://doi.org/10.1111/vec.12026>
- Littman, Meryl P., Wiley, C. A., & Raducha, M. G. (2013). Glomerulopathy and mutations in NPHS1 and KIRREL2 in soft-coated Wheaten Terrier dogs. *Mammalian Genome, Volume 24*, (Issue 3,), pp 119–126. <https://doi.org/09388990>
- Littman, MP, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & van Dongen, M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Lowik, M. M., Groenen, P. J., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental

- glomerulosclerosis-a review. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1017-x>
- Luimula, P., Ahola, H., Wang, S. X., Solin, M. L., Aaltonen, P., Tikkanen, I., ... Holthofer, H. (2000). Nephryn in experimental glomerular disease. *Kidney International*, 58(4), 1461–1468. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00308.x>
- Maas, R. J., Deegens, J. K., van den Brand, J. A., Cornelissen, E. A., & Wetzels, J. F. (2013). A retrospective study of focal segmental glomerulosclerosis: clinical criteria can identify patients at high risk for recurrent disease after first renal transplantation. *BMC.Nephrol.*
- Macdougall, D. F., Cook, T., Steward, a P., & Cattell, V. (1986). Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International*, 29, 1144–1151. <https://doi.org/10.1038/ki.1986.120>
- Mathieson, P. (2011). Primary glomerular disease. *Medicine*, 39(8), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.05.005>
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., & Halloran, P. F. (2004). Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney International*, 65(2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x>
- Michaud, J.-L. R., Hosseini-Abardeh, M., Farah, K., & Kennedy, C. R. J. (2009). Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(3), 166–178. <https://doi.org/10.1002/cm.20339>
- Miner, J. H. (2012). The glomerular basement membrane. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>
- Miner, J. H. (2013). NIH Public Access, 318(9), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>.The
- Nagata, M. (2016). Podocyte injury and its consequences. *Kidney International*, 89(6), 1221–1230.
- Neusser, M. a, Lindenmeyer, M. T., Moll, A. G., Segerer, S., Edenhofer, I., Sen, K., ... Cohen, C. D. (2010). Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *The American Journal of Pathology*, 176(2), 594–607. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090268>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Harris, A., & Anderson, E. (2006). Consensus

- Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01323>
- Ohse, T., Pippin, J. W., Chang, A. M., Krofft, R. D., Miner, J. H., Vaughan, M. R., & Shankland, S. J. (2009). The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney International*, 76(12), 1225–1238. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.386>
- Patrakka, J., & Tryggvason, K. (2010). Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.069>
- Peña, A., & Mendizabal, S. (2008). Síndrome nefrótico en la edad pediátrica. *Aeped.Es*, 154–167. Retrieved from http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/14_3.pdf
- Perysinaki, G. S., Moysiadis, D. K., Bertsiaris, G., Giannopoulou, I., Kyriacou, K., & Nakopoulou, L. (2011). Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology, 781–791.
- Pinto-Cárdenas, J. C., Chávez-crisóstomo, D., Morales-salinas, E., Salas-, G., Sánchez-aguilar, A. C., & Valencia-mayoral, P. (2009). Amiloidosis generalizada en perros Sharpei. Comunicación de dos casos. *Patología Revista Latinoamericana*, 47(4), 341–345.
- Polzin, D. J., & Cowgill, L. D. (2013). Development of Clinical Guidelines for Management of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, S2–S4. <https://doi.org/10.1111/jvim.12225>
- Qiu, L., & Zhou, J. (2016). Simultaneous mutations of LAMB2 and NPHP1 genes in a Chinese girl with isolated congenital nephrotic syndrome: a case report. *BMC Pediatrics*, 16(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0583-0>
- Quaggin, S. E., & Kreidberg, J. A. (2008). Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development (Cambridge, England)*, 135(4), 609–620. <https://doi.org/10.1242/dev.001081>
- Raval, S. H., Joshi, D. V., Patel, B. J., Patel, J. G., Patel, S. J., Karanti, A. M., & Panchbuddhe, B. N. (2015). Renal dysplasia in labrador male dog: A case report. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 39(1), 87. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2015.00020.6>

- Reddy, M. A., Park, J. T., & Natarajan, R. (2012). Epigenetic modifications and diabetic nephropathy. *Kidney Research and Clinical Practice*, 31(3), 139–150.
<https://doi.org/10.1016/j.krcp.2012.07.004>
- Reiser, J., & Altintas, M. M. (2016). Podocytes. *F1000Research*, 5, 1–19.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7255.1>
- Rico, M., Mukherjee, A., Konieczkowski, M., Bruggeman, L. A., Miller, R. T., Khan, S., ... Sedor, J. R. (2005). WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(2), F431–F441. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2004>
- Rinschen, M. M., Bharill, P., Wu, X., Kohli, P., Reinert, M. J., Kretz, O., ... Benzing, T. (2016). The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Human Molecular Genetics*, 25(7), 1328–1344.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw016>
- Román Ortiz, E. (2014). Síndrome Nefrótico Pediátrico. *Protoc Diagn Ter Pediatr.*, 2014;1:283, 283–301.
- Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Wetzels, J. F. M. (2012). Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(3), 882–890.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfr771>
- Rørtveit, R., Lingaas, F., Bønsdorff, T., Eggertsdóttir, A. V, Grøndahl, A. M., Thomassen, R., ... Jansen, J. H. (2012). A canine autosomal recessive model of collagen type III glomerulopathy. *Laboratory Investigation*, 92(10), 1483–1491.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.112>
- Rudnicki, M., Eder, S., Perco, P., Enrich, J., Scheiber, K., Koppelstätter, C., ... Mayer, G. (2007). Gene expression profiles of human proximal tubular epithelial cells in proteinuric nephropathies. *Kidney International*, 71(4), 325–335.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002043>
- Schmid, H., Cohen, C. D., Henger, A., Irrgang, S., Schlöndorff, D., & Kretzler, M. (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 64(1), 356–360.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00074.x>

- Schneider, S. M., Cianciolo, R. E., Nabity, M. B., Clubb, F. J., Brown, C. A., & Lees, G. E. (2013). Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007-2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1). <https://doi.org/10.1111/jvim.12247>
- Sekulic, M., & Pichler Sekulic, S. (2013). A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathology Research International*, 2013.
- Short, A. D., Holder, A., Rothwell, S., Massey, J., Scholey, R., Kennedy, L. J., ... Ollier, W. E. (2014). Searching for “monogenic diabetes” in dogs using a candidate gene approach. *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-8>
- Soares, M. (2005). Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. *Journal of Venomous ...*, (December), 579–593. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992005000400014>
- Sugahara, G., Hosaka, S., Mineshige, T., Kamiie, J., & Shirota, K. (2015). Clinical and histopathological features resembling those of human focal segmental glomerulosclerosis in a cat with nonimmune-mediated glomerulonephropathy. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0569-4>
- Suzuki, T., Matsusaka, T., Nakayama, M., Asano, T., Watanabe, T., Ichikawa, I., & Nagata, M. (2009). Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1675–1682. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080789>
- Tao, J., Polumbo, C., Reidy, K., Sweetwyne, M., & Susztak, K. (2014). A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 85(4), 972–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.463>
- Tsai, K. L., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2007). Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*, 18(6–7), 444–451. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9037-1>
- Vaden, S. L. (2011). Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 128–134. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>
- Vaden, S. L., Levine, J. F., Lees, G. E., Groman, R. P., Grauer, G. F., & Forrester, S. D. (2005). Renal biopsy: a retrospective study of methods and complications in 283

- dogs and 65 cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02767.x>
- Vala, H., Mega, A. C., Mesquita, J., Nóbrega, C., Cruz, R., Esteves, F., ... Reis, F. (2013). Presence of Kimmelstiel-Wilson-like Lesions in Canine Chronic Kidney Disease. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 100. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.219>
- Vogtländer, N. P. J., Dijkman, H., Bakker, M. a H., Campbell, K. P., van der Vlag, J., & Berden, J. H. M. (2005). Localization of alpha-dystroglycan on the podocyte: from top to toe. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(11), 1345–1353. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6596.2005>
- Wakamatsu, N., Surdyk, K., Carmichael, K. P., & Brown, C. a. (2007). Histologic and ultrastructural studies of juvenile onset renal disease in four Rottweiler dogs. *Veterinary Pathology*, 44(1), 96–100. <https://doi.org/10.1354/vp.44-1-96>
- Wang, G., Lai, F. M. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Kwan, B. C. H., Li, P. K. T., & Szeto, C. C. (2008). Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. *European Journal of Endocrinology*, 158(3), 317–322. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0708>
- Whiteley, M. H., Bell, J. S., & Rothman, D. A. (2011). Novel Allelic Variants in the Canine Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Promoter Are Associated with Renal Dysplasia in Dogs. *PLoS One*, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016684>
- William, J., Hogan, D., & Batlle, D. (2005). Predicting the development of diabetic nephropathy and its progression. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 202–211. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.02.001>
- Yhee, J.-Y., Yu, C.-H., Kim, J.-H., Im, K.-S., Chon, S.-K., & Sur, J.-H. (2010). Histopathological retrospective study of canine renal disease in Korea, 2003–2008. *Journal of Veterinary Science*, 11, 277–283. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.4.277>
- Zhang, S.-Y., Marlier, A., Gribouval, O., Gilbert, T., Heidet, L., Antignac, C., & Gubler, M. C. (2004). In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney International*, 66(3), 945–954.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00840.x>

Zheng, M., Lv, L. L., Ni, J., Ni, H. F., Li, Q., Ma, K. L., & Liu, B. C. (2011). Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS ONE*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020431>

3. Expresión de nefrina, podocina, alfa-actinina y TGF-B1 en caninos y humanos con glomerulopatías

Paula Esquinas, Ligia Jiménez, Lucía Botero, Rafael Andrade

3.1 Resumen

Las glomerulopatías tanto primarias como secundarias, cursan con proteinuria en diferentes grados tanto en humanos como en animales. La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) es considerada una de las causas más comunes de pacientes nefróticos y está relacionada con la pérdida de la integridad y la función de la barrera de filtración y de las células podocitarias en varias especies. La fusión de los podocitos depende de la interrupción de la red del citoesqueleto celular, de cambios en la expresión o localización de las proteínas del diafragma de filtración y de su interacción con la estructura citoplasmática. En este trabajo se evaluaron las proteínas nefrina (NPHS1), podocina (NPHS2), alfa-actinina 4 (ACTN4) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-B1), para determinar sus cambios en pacientes humanos y caninos con proteinuria asociada a podocitopatías. Se utilizaron muestras renales de humanos con diagnóstico de GEFS y caninos con glomerulopatías (GP) que exhibían proteinuria. Los controles correspondieron a pacientes sanos, donadores postrasplante o caninos sin proteinuria. Los resultados de inmunohistoquímica mostraron disminución en la expresión de nefrina, podocina y ACTN4 y aumento leve de TGF-B en especímenes de pacientes caninos enfermos. En la microscopia confocal, las reacciones de nefrina y podocina se modificaron

a un patrón granular y sus intensidades disminuyeron en los pacientes con humanos con GEFS y caninos con GP. El análisis por PCR en tiempo real mostró que la expresión de ARNm fue significativamente más baja en los pacientes proteinúricos que en los sanos. En conclusión, lesiones de los podocitos y la expresión de nefrina, podocina y ACTN4 en el glomérulo se relacionó más fuertemente con cambios en los patrones de expresión, deslocalización y colocalización, que con una disminución en la expresión de los genes a nivel del mRNA.

3.2 Introducción

La proteinuria se considera una falla en la función de la barrera de filtración glomerular (Miner, 2012; Patrakka & Tryggvason, 2010)(Armelloni et al., 2014; Luimula et al., 2000). Las glomerulopatías son causa importante de falla renal crónica tanto en humanos como en animales y entre estas, la GEFS es considerada una de las causas más comunes de síndrome nefrótico en los pacientes proteinúricos (Klosterman & Pressler, 2011; Lees et al., 2011; Maas et al., 2013; Tao et al., 2014).

El funcionamiento adecuado de los podocitos se basa en gran medida en su arquitectura celular especializada y en funciones como la estabilización de los capilares glomerulares y la participación en la función del filtro glomerular. De esta manera, forman la barrera final para prevenir la pérdida de proteínas, lo que explica por qué la lesión de estas células se asocia típicamente con proteinuria marcada (Fogo & Kon, 2010; Miner, 2012; Patrakka & Tryggvason, 2010). Bajo condiciones patológicas, los podocitos exhiben varios cambios como pérdida de los pedicelos o procesos podocitarios, que representa el cambio más característico en la forma celular de los podocitos. Adicionalmente, se han reportado cambios en los patrones de expresión de las proteínas del diafragma de filtración y del citoesqueleto del podocito (Aaltonen et al., 2001; Ichii et al., 2011; Kobayashi et al., 2011a; Reiser & Altintas, 2016; Zheng et al., 2011).

Las células epiteliales viscerales del glomérulo están unidas a la membrana basal glomerular por medio de extensiones citoplasmáticas que forman interdigitaciones conocidas como procesos podocitarios. Normalmente el filtrado glomerular pasa entre estos procesos a través de una unión intercelular especializada, exclusiva de podocitos, que es conocida como “hendidura de filtración” (slit diaphragm). Esta estructura está

anclada al citoesqueleto de los procesos podocitarios y en este complejo hay numerosas proteínas estructurales y con funciones de mensajeros que no han sido completamente conocidas ni entendidas (Armelloni et al., 2014; Michaud et al., 2009; Patrakka & Tryggvason, 2010; Reiser & Altintas, 2016). Hasta el momento se han caracterizado al menos 15 proteínas que forman parte de este complejo, todas ellas importantes en el mantenimiento de su estructura y función: nefrina, podocina, NEPH1, 2 y 3, P-cadherina, proteína asociada a CD2 (CD2AP), cateninas, FAT 1 y 2, zonula occludens 1 (ZO-1), actina, alfa-actinina-4, densina y CRIM1. Desde finales de los noventa, con el descubrimiento de varias mutaciones en genes que codifican estas moléculas, se descubrió que ésta es la principal barrera para la filtración de proteínas y se vio la importancia de la integridad de esta estructura y su relación con las enfermedades glomerulares (Meryl P. Littman et al., 2013; Miner, 2012; Rinschen et al., 2016).

Una citoquina clave, íntimamente involucrada en la patogénesis de la glomeruloesclerosis y la fibrosis tubulointersticial, es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); este mediador estimula la producción de las proteínas de la matriz mesangial, mientras que al mismo tiempo actúa sobre la degradación de la matriz. La activación sostenida del TGF- β , como ocurre en la cicatrización renal, se traduce en un círculo vicioso de la deposición de matriz y la lesión tisular. La inhibición de la bioactividad de TGF- β atenúa el depósito de matriz extracelular (ECM) y la progresión de la fibrosis en injuria renal de tipo experimental. Sin embargo, la inhibición directa a largo plazo de esta citoquina en el entorno clínico, presenta varios problemas debido a que posee también actividad anti-proliferativa y anti-inflamatoria (Gupta et al., 2000).

En respuesta a muchos tipos de agresión, los podocitos sufren un cambio morfológico denominado “borramiento” de procesos podocitarios (fusión de podocitos), que se debe a una alteración arquitectural del citoesqueleto y la unión intercelular. Por microscopía electrónica, este borramiento se manifiesta con retracción y franca ampliación de las extensiones citoplasmáticas de podocitos, hasta total aplanamiento de las prolongaciones de la célula podocitaria. Este proceso es reversible en cierta medida y está directamente relacionado con el grado de proteinuria en humanos y modelos experimentales (Lowik, Groenen, Levitchenko, Monnens, & Van Den Heuvel, 2009; Reiser & Altintas, 2016).

Estudios recientes de la biología de los podocitos y disrupción génica *in vivo* indican una relación causal entre anomalías de las moléculas de los podocitos individuales y proteinuria y glomeruloesclerosis (Fogo & Kon, 2010; Kriz et al., 2013; Nagata, 2016). Las proteínas del diafragma de filtración (DF) interactúan con el citoesqueleto del podocito y participan en la transmisión de señales intracelulares e intercelulares. Cuando hay alteraciones en alguno de los genes que codifican estas proteínas, todo el complejo cambia su estructura normal y altera su función llevando a un síndrome nefrótico, usualmente congénito (Lowik et al., 2009; Luimula et al., 2000; Miner, 2012). Sin embargo, en casos de síndrome nefrótico adquirido, mediado o no por complejos inmunitarios y/o inmunidad celular, se describen alteraciones podocitarias (fusión podocitaria, acumulo de filamentos, vacuolización) como un fenómeno secundario. De esta manera, parece ser que la desestructuración y la pérdida de función del diafragma de filtración y su complejo anclaje de proteínas pueden ser tanto la causa, como la consecuencia del síndrome nefrótico (Lowik et al., 2009; Polzin & Cowgill, 2013; Román Ortiz, 2014).

Los podocitos viven bajo diversas tensiones y estímulos patológicos. Se adaptan para mantener la homeostasis, pero el estrés excesivo conduce a una mala adaptación con cambios biológicos complejos que incluyen pérdida de integridad y desregulación del metabolismo celular. Diversos estudios han encontrado una variedad de respuestas glomerulares a la disfunción de los podocitos *in vivo*, relacionadas con la expresión génica o cambios en la estructura y localización de las proteínas, como la interrupción de la interacción cruzada podocito-endotelio y la activación de las interacciones podocito-célula parietal, todo lo cual nos ayuda a comprender el complejo escenario de la lesión de los podocitos y sus consecuencias (Kobayashi et al., 2015; Nagata, 2016; Patrakka & Tryggvason, 2010).

3.3 Materiales y métodos

Muestras de tejidos

Los especímenes de riñón de caninos (n = 22) se obtuvieron en exámenes post mortem o biopsias realizadas en diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Bogotá, Colombia. Las muestras de humanos (n=22) fueron obtenidas del banco de tejidos del Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá (FSFB) de los especímenes de archivo que pertenecen al laboratorio de patología del hospital. Las muestras evaluadas provienen de un trabajo anterior donde se diagnosticó histopatológicamente el tipo de glomerulopatía (GP) en cada uno de los animales. Las muestras de humanos corresponden a pacientes con diagnóstico de GP tipo GEFS y los controles a especímenes de donadores para trasplante renal. Los procedimientos en este estudio se realizaron de acuerdo las recomendaciones definidas en la “*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*”, acorde con lo establecido por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y al comité de Bioética de la FSFB, para los tejidos de humanos.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Un fragmento de la muestra fue fijado por inmersión en formalina bufferada al 10% y se procesó de manera habitual por deshidratación en alcoholes ascendentes e inclusión en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 3 micras de grosor para evaluar cada una de las proteínas de estudio y se realizó la prueba de IHQ en el equipo sistematizado Ventana® de Roche, según previa estandarización de pH y temperatura de recuperación de antígenos y dilución adecuada de anticuerpos primarios para cada reactante, como se muestra en la tabla 3-1. El parámetro medido por el programa de análisis de imagen fue la densidad de tinción (intensidad o porcentaje de área) del glomérulo en cada caso (Kavoura et al., 2011).

Tabla 3-1. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia indirecta (IFI)

ANTICUERPOS PRIMARIOS	MARCA	ESPECIE	DILUCIÓN	Incubación
Anti-NPHS1	Invitrogen PA5-20330	Ratón	1:500	1 H TA
Anti-NPHS2	Invitrogen PA5-61987	Conejo	1:1000	1 H TA
Anti-ACTN-4	Invitrogen MA1-800	Ratón	1:500	1 H TA
Anti-TGF-B1	Invitrogen MA5-16949	Conejo	1:500	1 H TA
ANTICUERPOS SECUNDARIOS CONJUGADOS	MARCA	ANTI-ESPECIE	DILUCIÓN	
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Invitrogen R37116	Anti conejo	1:500	1 H TA
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Cy3	Thermo Scientific M30010	Anti ratón	1:500	1 H TA

Microscopia confocal

Para esta técnica se hicieron cortes de los tejidos congelados en medio de inclusión para congelar OCT (optimal cutting temperature) de 10 micras de grosor. Se realizó la inmunomarcación indirecta por incubación con los anticuerpos primarios anti-podocina (NPHS2), nefrina (NPHS1), factor de crecimiento transformante beta (TGFB1) y α -actinina (ACTN4) (producidos en diferentes especies a la estudiada) por 1 hora. Luego se incubaron con los anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia indirecta IFI, marcados cada uno con un diferente fluorocromo, por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente (Tabla 3-1). Los anticuerpos se organizaron en dos paneles para hacer el estudio simultáneo de dos proteínas, los núcleos fueron teñidos con DAPI para diferenciar más fácilmente las estructuras celulares. El primer panel incluía nefrina en color verde y alfa-actinina 4 en color rojo. El segundo panel, podocina en color verde y TGFB1 en color rojo. Finalmente se observaron las láminas en el microscopio confocal Eclipse Ni-E, Nikon®, donde se tomaron las imágenes para la posterior cuantificación y estudios de colocalización.

De cada una de las muestras se analizaron de 2 glomérulos para hacer un barrido de todo el grosor de la estructura glomerular. Para la medida de intensidad de la fluorescencia, para cada anticuerpo se hicieron apilamientos de imágenes en el eje z de entre 40-50 μm con una distancia de 0,5 μm , obteniendo apilamientos de 30 imágenes. Las imágenes se analizaron con el software Image J. Para todo el estudio se hicieron proyecciones en el eje Z, utilizando la intensidad máxima en una magnificación de 60x. La evaluación de los

cambios en la localización, expresión celular individual, mediciones de intensidades totales, colocalización y reconstrucciones tridimensionales de las proteínas o estructuras inmuno-marcadas (Vogtländer et al., 2005) se realizó en magnificación 100x.

Ensayos de Cuantificación de la expresión génica

Extracción de ARN y PCR cuantitativa

El ARN mensajero total de las muestras fue obtenido a partir de muestras de tejidos conservados en ARN later utilizando el método fenol-cloroformo. Posteriormente se realizó medición de las concentraciones y control de calidad del ARN total de cada una de las muestras y se llevaron a una concentración de 25ng/uL con agua libre de ARNasa. Posteriormente se realizó la síntesis del cDNA y PCR cuantitativa con el kit qScript™ One-Step SYBR® Green qRT-PCR, Quantabio.

El programa de amplificación se llevó a cabo en el equipo LightCycler® 480 de Roche. Los ensayos en las muestras de pacientes se realizaron por duplicado. Los primers se diseñaron con el programa Beacon Designer™, y posteriormente se realizó un BLAST para probar la correspondencia. El grupo de primers correspondiente al utilizado para la normalización, gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y algunas otras secuencias se obtuvieron de reportes de literatura similares. Los cebadores utilizados para cada especie se listan en la tabla 3-2.

Tabla 3-2. Secuencias y condiciones de los primers utilizados en muestras renales de caninos

GENES CANINOS	SIMBOLO	REFERENCIA	SECUENCIA	TAMAÑO PREDICHO
Nefrina	NPHS1	XM_541685.5	F: TGGTCCGACTTGTTCAGATT R: ACAGTGGAGAGTGGCAGAACTTG	157bp
Podocina	NPHS2	XM_547443	F: GGAGAGAACAGAAATTAAGGATGTAAGG R: TGCGCTTCGGCTTCCA;	168 pb
Alfa actinina 4	ACTN4	XM_834305	F: GGACATTCCCAAGATGTTGGAT R: GGTAGAAGCTGGACACATAGGTCAT	186 PB
Factor de crecimiento transformante beta 1	TGFB1	NM_000660	F: GGTGGAAAACACCAACAAAATC R: TCAGGCACTGCTTCTCGGAGC	99 bp
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	NC_006609.3	F: GGCACAGTCAAGGCTGAGAAC	291bp

Tabla 3-3. Secuencias y condiciones de los primers utilizados en muestras renales de humanos

GEN HUMANO	SIMBOLO	REFERENCIA	SECUENCIA	TAMAÑO PREDICHO
Nefrina	NPHS1	NM_004646.3	F: CCTGCACCACCAACTGCTTAGC R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC F: GGTTCTGCATAAAGGTTGTACG	189 bp
Podocina	NPHS2	XM_547443	R: CATGAAAGGGTATCTCCAAAGT	73 pb
Alfa actinina 4	ACTN4	NM_001322033.1	F: GAGGCCAGAGGATCGCT R: ACTTGGAGTTGATGATTTGCGG	91 PB
Factor de crecimiento transformante beta 1	TGFB1	NM_000660	F: GGTGGAAAACACCAACAAAATC R: TCAGGCACTGCTTCTCGGAGC	191 PB
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	NC_006609.3	F: GGCACAGTCAAGGCTGAGAAC R: CCAGCATCACCCCATTTGAT	291bp

Análisis Estadístico

La expresión de mRNA se evaluó por medio del método de cuantificación relativa, donde cada muestra se normalizó basada en la expresión del gen de referencia GAPDH. La expresión relativa de los genes de interés se calculó fundamentada en el método $2^{-\Delta CT}$ teniendo en cuenta las eficiencias obtenidas para cada set de primers (PffafI, 2001, Thomas et al., 2013). La cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas se realizó mediante intensidad y área de la inmunomarcación positiva por medio del analizador de imágenes. Los datos obtenidos se procesaron con el programa Statistical Analysis System (Version 9.4, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA 2015) (Bate & Clark, 2014). Para el contraste de las variables cuantitativas entre dos grupos se realizó la prueba Wilcoxon pareada. Para analizar más grupos de comparación se usó una prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis, según el comportamiento de los datos. Todas las pruebas tuvieron un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

3.4 Resultados

Inmunohistoquímica

Todos los especímenes de tejido renal evaluados por esta técnica (humanos y animales) mostraron inmunoreactividad para los anticuerpos utilizados. La intensidad fue un poco menor para los caninos en todas las proteínas, excluyendo la podocina, que fue de

marcación más intensa (Figura 3-1 f). En la inmunoperoxidasa se observó un patrón lineal tenue a lo largo de la membrana basal capilar (MBC) en los especímenes de pacientes control, para las proteínas podocitarias (nefrina y podocina) (Figura 3-1a y 3-1i, 3-1b y 3-1j). La marcación de nefrina y podocina fue más intensa en la MBC de los glomérulos, mientras que la alfa-actinina-4 se expresó además en el mesangio, ocasionales células tubulares y las paredes de las arteriolas de forma tenue (Figura 3-1 c y k). Para la citoquina TGFB1 el patrón de marcación fue focal granular tenue en algunas asas glomerulares, mesangio y ocasionales focos tubulointersticiales (Figura 3-1 d y l).

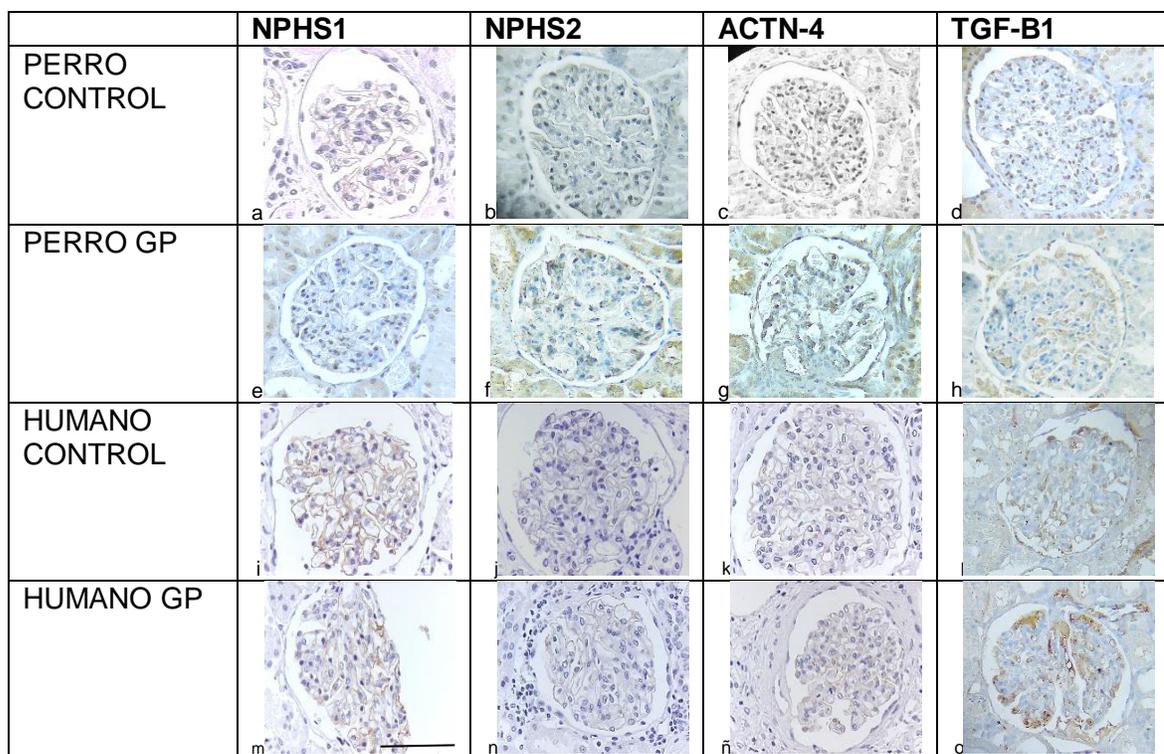
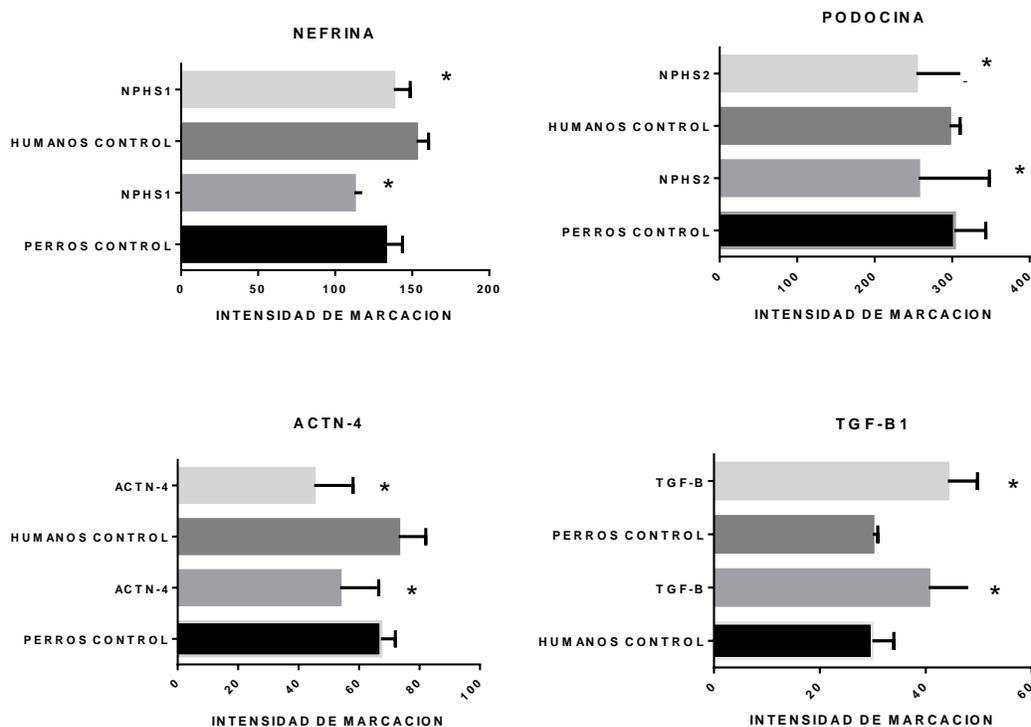


Figura 3-1. IHQ con peroxidasa para proteínas podocitarias y TGFB1. Localizaciones de moléculas en el tejido renal de perros y humanos. a-o. Microfotografías de luz de glomérulos renales, reacciones positivas para nefrina (NPHS1), podocina (NPHS2) y alfa-actinina (ACTN-4), localizadas principalmente en la membrana basal capilar en un patrón lineal (b-d, f-h, j-l y n-p). Las reacciones positivas de nefrina y podocina en animales con GP fueron más débiles que en animales normales, especialmente en perros (f y h). Para las inmunorreacciones de ACTN-4, no se observaron cambios notables entre animales normales y con GP (c, g, k, y o). Barra: 50 µm.

La localización y expresión de la nefrina, podocina y alfa-actinina-4 en el grupo de caninos enfermos con GP, mostró leve disminución en la intensidad de la marcación. El marcaje tuvo un cambio discreto a patrón granular para las proteínas podocitarias (Figura 3-1 e y f,

m y n). El TGFB1 se expresó de manera más intensa y focal difusa a granular en el mesangio y en algunas células epiteliales de túbulos y áreas intersticiales (Figura 3-1 h). Para ambas especies, la tendencia de los cambios en la intensidad fue similar. En la Grafica 3-1 a y b, se evidencian los resultados de la cuantificación de la expresión proteica, donde se muestra disminución significativa para la nefrina ($p=0,041$ en caninos y $p=0,017$ en humanos) y disminución significativa para la podocina canina ($p=0,014$) y alfa-actinina 4 ($p=0,0118$). El TGFB1 mostró un aumento significativo ($p=0,001$) en la expresión en glomérulos y área periglomerular, de comportamiento equivalente para humanos y caninos.

Gráfica 3-1. Intensidad de la marcación en pacientes sanos y con glomerulopatías para cada grupo de proteínas. Cuantificaciones de la expresión de las proteínas del DF y TGFB1 ($P < 0,05$).



Microscopia confocal

Por esta técnica, también se encontró marcación positiva para todas las proteínas en los especímenes de origen animal y humano. Se observó igualmente, una disminución en la

expresión de las proteínas podocitarias, pero principalmente el cambio del patrón de expresión, de lineal en los pacientes sanos (Figuras 3-2, c y f), a granular en los enfermos, así como deslocalización (Figura 3-2 j y k) y disminución en la colocación de las proteínas, para el caso de todos los enfermos, para las proteínas podocitarias, fueron los hallazgos más relevantes.

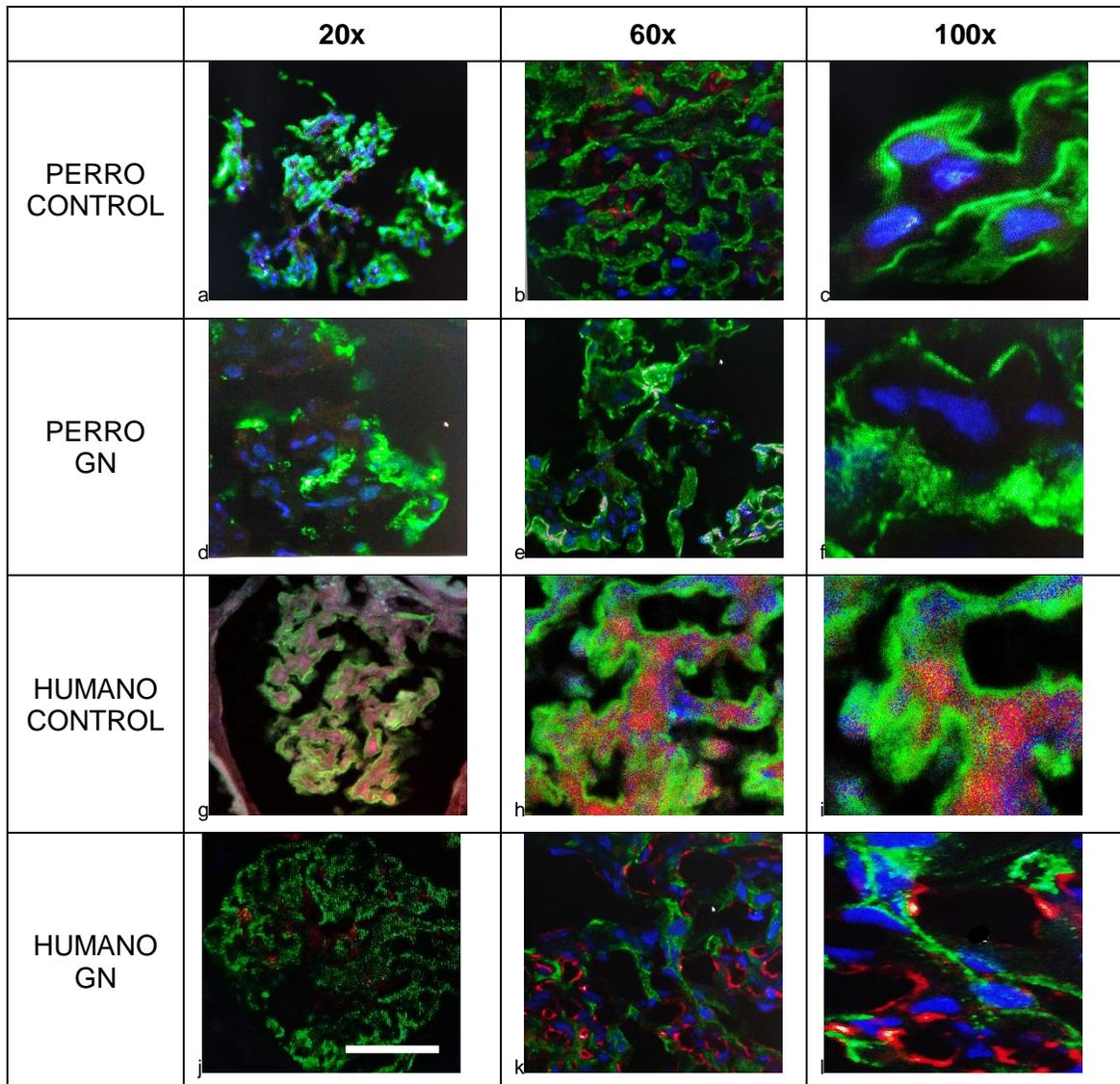
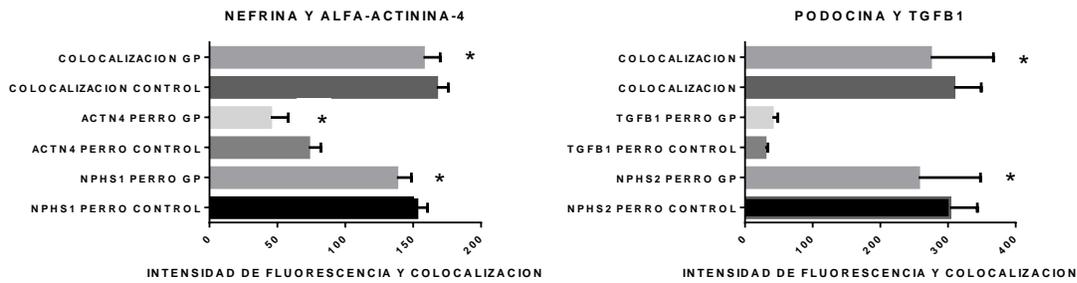


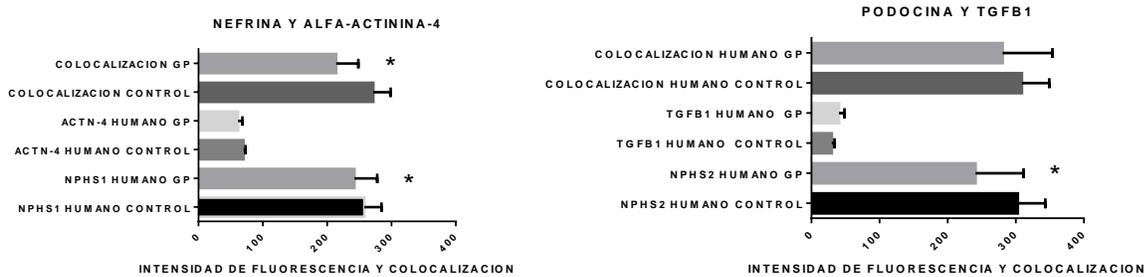
Figura 3-2 Microscopía confocal. Localización y patrones de marcación de moléculas en perros y humanos. Inmunofluorescencia en patrón lineal en especímenes de paciente sanos, reacciones lineales claras de nefrina (verde: Alexa 488), y difusa citoplasmática para ACTN4 (rojo: Cy3), se detectaron en forma paralela a MBC (a-c, g-i). Los patrones de marcación muestran cambio de tipo granular o grumoso a lo largo de la membrana en el caso de la nefrina (e y f) y en acúmulos densos focalizados en el caso de la ACTN4 (k y l), más notorio en el caso de los especímenes humanos. Barra: 50 μ m.

La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia muestra el mismo comportamiento de las muestras en especímenes humanos y caninos, se evidencia una disminución en la expresión de nefrina, podocina y la alfa actinina, y un aumento en la expresión del TGFB1 (Gráfica 3-3). La colocalización de las proteínas evidencia una disminución en los animales y humanos con GP, en la cantidad de proteínas asociadas o que coinciden en un punto específico de la célula, como se observa en la gráfica. La disminución de la colocalización es significativa para nefrina y alfa actinina tanto para perros ($p=0,016$) como para humanos ($p=0,0063$) y se evidencia una disminución, en la colocalización entre podocina y TGFB1 ($p=0,048$) en caninos y no significativa ($p=0,618$) en humanos).

Gráfica 3-2. Intensidad de la fluorescencia y colocalización de las proteínas en caninos



Gráfica 3-4. Intensidad de la fluorescencia y colocalización de las proteínas en humanos.

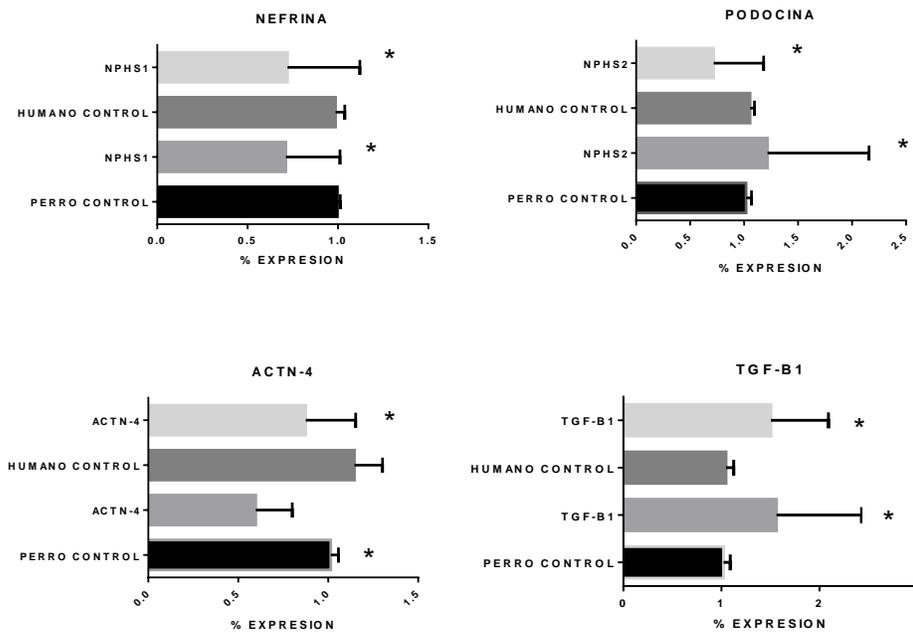


Expresión génica de nefrina, podocina, ACTN4 y TGFB1

Los ARNm mostraron amplificación secuencial y específica, según se confirmó con las TM de las curvas de amplificación. En la Gráfica 3-2 se observan los resultados para el

grado de expresión génica evaluados con relación a gen GAPDH como gen constitutivo. Se evidencia, disminución significativa en el grado de expresión de la nefrina, la podocina y la alfa actinina para los caninos. Se muestra, de la misma manera, disminución significativa en el grado de expresión de la nefrina, la podocina y la alfa actinina para los humanos (Grafica 3-3 a, b y c). Para el factor de crecimiento transformante se observa aumento en el grado de expresión, de forma significativa en los animales y humanos enfermos ($p= 0,0089$ y $p=0,0091$). Aunque hubo diferencias en los grados de expresión para humanos y caninos, se evidencia el mismo tipo de comportamiento en las diferentes proteínas evaluadas.

Gráfica 3-3. Niveles de expresión de los genes en caninos. Cuantificaciones ARNm por PCR en tiempo real análisis de expresión del ARNm perros y humanos. Los valores brutos fueron normalizados a los de GAPDH. *: diferencias significativas entre grupo normal o control y especímenes con GP ($P < 0,05$).



3.5 Discusión

Las enfermedades proteinúricas están relacionadas con daños en las células podocitarias y cambios en los patrones de expresión de las proteínas del diafragma de filtración y otras moléculas asociadas con las lesiones glomerulares escleróticas (Arif et al., 2014; Gupta et al., 2000; Perysinaki et al., 2011; Reiser & Altintas, 2016). En el presente estudio se encontró una disminución significativa en la expresión de las moléculas del diafragma de filtración tanto en perros como humanos con glomerulopatías y un cambio importante en los patrones de marcación, intensidad y colocalización de estas proteínas al compararlos con especímenes de pacientes control sanos. Esto es consistente con numerosos estudios que reportan una disminución en la expresión de las proteínas del DF y una correlación con enfermedad glomerular tanto en humanos como animales (Ichii et al., 2011; Kawachi et al., 2009; Kobayashi et al., 2011b; Tao et al., 2014).

El patrón de expresión de estas proteínas fue difuso, cubriendo la superficie de la MBC y en la localización de los podocitos en el diafragma de filtración para ambas especies. Se han realizado anteriormente caracterizaciones detalladas de las proteínas del diafragma de filtración en caninos mostrando su similitud con las de otros mamíferos (Ichii et al., 2011; Kobayashi et al., 2011a).

Las alteraciones genéticas en algunas de las proteínas que forman parte del diafragma de filtración se han asociado con proteinuria o síndrome nefrótico de inicio temprano. Sin embargo, otras causas no genéticas del síndrome nefrótico también producen estas alteraciones (Arias et al., 2009; Bierzynska et al., 2015). Los cambios en la expresión génica son la respuesta de la célula podocitaria a las constantes modificaciones de su microambiente. Estos cambios en la expresión de las proteínas del DF y las proteínas de citoesqueleto producen modificaciones en los pedicelos que al ser crónicos, pueden terminar en lesión podocitaria irreversible (Armelloni et al., 2014; Reiser & Altintas, 2016).

En nuestro trabajo encontramos cambios significativos en las mediciones de expresión de nefrina, podocina y alfa-actinina 4 y en la cantidad de ARNm de NPHS1, NPHS1 y ACTN4 en perros y humanos con glomerulopatías. Estos resultados confirman las similitudes de especie en cuanto a la patogénesis de la GEFS canina y humana y muestran que los podocitos tienen mecanismos similares de lesión, con las susceptibilidades generales entre las dos especies. Kobayashi y col en 2011 en estudios realizados comparando la

expresión de las proteínas de la DF en caninos y felinos, encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los caninos y felinos, proponiendo diferentes vías y susceptibilidades en la respuesta de los podocitos a la injuria en estas dos especies.

Aunque se encontró disminución significativa en la expresión de las proteínas de filtración, los cambios en la colocación de estas, implica principalmente una modificación en la localización y asociación de las proteínas, y por lo tanto en el ensamblaje del citoesqueleto. Diversos autores muestran diferentes respuestas del podocito a la injuria, llevando a cambios ultraestructurales y en la expresión génica en estas células (Patrakka & Tryggvason, 2010; Reiser & Altintas, 2016). Shankland y colaboradores, 2006 describen como las diferentes injurias y lesiones inducen cambios en las proteínas y desencadenan diferentes tipos de glomerulopatías, muchas veces induciendo cambios irreversibles como la GEFS. Las causas adquiridas no inmunes de la lesión podocitaria son múltiples. Estas incluyen causas infecciosas (VIH, Parvo B19) metabólicas (diabetes) y existe una evidencia creciente de literatura que muestra que el estrés-tensión que se dan como resultado de aumento de la presión intraglomerular, causando lesión de los podocitos. Las enfermedades infiltrativas de los podocitos son menos comunes, en el caso del amiloide, varios estudios han demostrado que las espículas amiloides individuales se "proyectan" a través del GBM, penetrando en los podocitos adyacentes, causando lesión. Finalmente, aunque la gran mayoría de las mutaciones de las proteínas del DF son congénitas o hereditarias, estudios recientes han demostrado que la GEFS esporádica puede surgir debido a mutaciones en la podocina, donde se hipotetiza que una mutación genética que por sí sola puede no ser suficiente para causar proteinuria, en presencia de una segunda lesión, como hipertensión o hipercolesterolemia, se convierte en una lesión de los podocitos (Baelde et al., 2007; Lowik et al., 2009; Zhang et al., 2004).

La nefrina fue la principal proteína en la que se observó disminución y cambio en su patrón de expresión de lineal a granular. Esta proteína tiene roles muy importantes no solo en los componentes de la DF sino también en la regulación de la señalización de células podocíticas. Por ejemplo, la nefrina interactúa con la subunidad reguladora p85 de PI3K, recluta PI3K a la membrana plasmática y estimula la señalización AKT dependiente de PI3K, que controla el crecimiento, la migración y la supervivencia celular (Kobayashi et al., 2015; Rinschen et al., 2016). La alfa-actinina 4, que evidenció cambios en su localización y colocalización con nefrina, tiene papeles críticos en el mantenimiento de la estructura del

citoesqueleto de podocitos, colocaliza con haces de actina, y se requiere para la señalización y adhesión de integrina $\beta 1$ (Dandapani et al., 2007; Honda, 2015).

La expresión proteica es crítica para el desarrollo del podocito, algunos estudios sugieren que la transición epitelio-mesénquima, que comienza con una disminución de la adhesión celular y cambios en el citoesqueleto, se considera uno de los mecanismos desencadenantes de la podocitopenia en las lesiones de este tipo (Fogo & Kon, 2010; Kawachi et al., 2009, 2009). En el análisis de los podocitos, una disminución de la nefrina y la proteína *zona ocludens 1* (ZO-1) y la inducción de marcadores mesenquimales, como desmina, fibronectina, metaloproteinasa de matriz-9, mostró cambios en la expresión de la alfa-actina 4 (Dandapani et al., 2007; Rico et al., 2005).

Adicionalmente, nefrina interactúa con la polimerización de actina a través del adaptador de proteína Nck en el DF (Patrakka & Tryggvason, 2010) y la ACTN4 agrupa la actina del citoesqueleto. De esta forma se puede explicar cómo, una disminución en las moléculas del DF, incluyendo nefrina y ACTN4, podría inducir a la actina y producir cambios en el citoesqueleto de los podocitos asociados con eventos de desprendimiento, como pérdida de adhesión a la MBC.

En el presente estudio se comprobó que las proteínas podocitarias presentan cambios en sus niveles de expresión tanto a nivel genómico como a nivel estructural, mostrando estos mecanismos como los eventos celulares iniciales que desencadenan los cambios ultraestructurales de adaptación y posteriormente de remodelación que se observan en los pacientes, caninos y humanos, con glomerulopatías.

En conclusión, en el presente trabajo se evidenciaron cambios significativos en los niveles de expresión y en la localización de las proteínas podocitarias y la citoquina TGFB1 asociados al daño estructural y morfológico del podocito y el desarrollo de glomerulopatías como consecuencia de este desarreglo en el citoesqueleto celular. El estudio comparativo permitió definir las similitudes que existen entre las estructuras del glomérulo y del DF entre caninos y humanos y los mecanismos celulares que inducen este tipo de lesiones, confirmando una vez más al canino como un modelo biológico espontáneo para este tipo de enfermedades complejas en humanos.

3.6 Bibliografía

- Aaltonen, P., Luimula, P., Aström, E., Palmén, T., Grönholm, T., Palojoki, E., ... Holthöfer, H. (2001). Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 81(9), 1185–1190.
- Adam, J., Connor, T. M. F., Wood, K., Lewis, D., Naik, R., Gale, D. P., & Sayer, J. a. (2013). Genetic testing can resolve diagnostic confusion in Alport syndrome. *Clinical Kidney Journal*, 7(2), 197–200. <https://doi.org/10.1093/ckj/sft144>
- Akchurin, O., & Reidy, K. J. (2014). Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatric Nephrology*, 30(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2753-3>
- Aresu, L., Zanatta, R., Luciani, L., Trez, D., & Castagnaro, M. (2010). Severe renal failure in a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.12.016>
- Arias, L. F., Henao, J., Giraldo, R. D., Carvajal, N., Rodelo, J., & Arbeláez, M. (2009). Glomerular diseases in a Hispanic population: Review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Medical Journal*, 127(3), 140–144. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000300006>
- Arif, E., Rathore, Y. S., Kumari, B., Ashish, F., Wong, H. N., Holzman, L. B., & Nihalani, D. (2014). Slit diaphragm protein nephrin and its signaling: A novel therapeutic target for protection of podocytes against: Glomerular injury. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9502–9518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505743>
- Armelloni, S., Corbelli, A., Giardino, Laura1. Armelloni S, Corbelli A, Giardino L, et al. P. R. biomolecular developments. *B. C.* 2014;5(4):319-330. doi:10.1515/bm.-2014-0020., Li, M., Ikehata, M., Mattinzoli, D., ... Rastaldi, M. P. (2014). Podocytes: Recent biomolecular developments. *Biomolecular Concepts*, 5(4), 319–330.
- Baelde, H. J., Eikmans, M., Lappin, D. W. P., Doran, P. P., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P.-T., ... Bruijn, J. a. (2007). Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney International*, 71(7), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002101>
- Bartges, J. W. (2012). Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(4), 669–692. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>
- Bate, S., & Clark, R. (2014). *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. (Cambridge University Press, Ed.) (2014th ed.).
- Bierzynska, A., Soderquest, K., & Koziell, A. (2015). Genes and podocytes - New insights into mechanisms of podocytopathy. *Frontiers in Endocrinology*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00226>

- Brum, K. B., Juliano, R. S., Souza, M. A., Fleury, L. F. F., & Damasceno, A. D. (2008). Renal dysplasia in a Boxer dog: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(5), 1084–1088. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000500007>
- Brunskill, E. W., & Potter, S. (2012). Changes in the gene expression programs of renal mesangial cells during diabetic nephropathy. *BMC Nephrology*, 13(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-70>
- Carney, E. F. (2014). Glomerular disease: Frequency of podocyte-related gene mutations in FSGS. *Nm*, 10(4), 184. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.29>
- Cerda Lorca, J., & Villarroel Del P., L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062008000100008>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007a). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(12), 690–694. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Chandler, M. L., Elwood, C., Murphy, K. F., Gajanayake, I., & Syme, H. M. (2007b). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *Journal of Small Animal Practice*. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00401.x>
- Cianciolo, R. E., Brown, C. A., Mohr, F. C., Spangler, W. L., Aresu, L., van der Lugt, J. J., ... Lees, G. E. (2013). Pathologic evaluation of canine renal biopsies: Methods for identifying features that differentiate immune-mediated glomerulonephritides from other categories of glomerular diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/jvim.12226>
- Cianciolo, R. E., Mohr, F. C., Aresu, L., Brown, C. A., James, C., Jansen, J. H., ... Corresponda, A. Q. (2016). World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative : Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53(1), 113–135. <https://doi.org/10.1177/0300985815579996>
- Cowgill, L. D., & Polzin, D. J. (2013). Vision of the WSAVA Renal Standardization Project. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 5–10. <https://doi.org/10.1111/jvim.12227>
- Dandapani, S. V., Sugimoto, H., Matthews, B. D., Kolb, R. J., Sinha, S., Gerszten, R. E., ... Pollak, M. R. (2007). ??-Actinin-4 Is Required for Normal Podocyte Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 467–477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605024200>
- Dasari, S., Chakraborty, A., Truong, L., Mohan, C., L, J. C., & P, L. V. D. E. L. (2019). A Systematic Review of Interpathologist Agreement in Histologic Classification. *Kidney International Reports*, 4(10), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.06.011>
- Delimont, D., Dufek, B. M., Meehan, D. T., Zallocchi, M., Gratton, M. A., Phillips, G., & Cosgrove, D. (2014). Laminin α 2-Mediated Focal Adhesion Kinase Activation

- Triggers Alport Glomerular Pathogenesis. *PLoS ONE*, 9(6), e99083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099083>
- Erkan, E., Garcia, C. D., Patterson, L. T., Mishra, J., Mitsnefes, M. M., Kaskel, F. J., & Devarajan, P. (2004). Induction of Renal Tubular Cell Apoptosis in Focal Segmental Glomerulosclerosis: Roles of Proteinuria and Fas-Dependent Pathways. *Journal of the American Society of Nephrology*, (22), ASN. <https://doi.org/10.1681/ASN.2003100861>
- Feldman, G., Kiely, B., Martin, N., Ryan, G., McMorrow, T., & Ryan, M. P. (2007). Role for TGF-beta in Cyclosporine-Induced Modulation of Renal Epithelial Barrier Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(6), 1662–1671. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050527>
- Fogo, A. B., & Kon, V. (2010). The glomerulus - a view from the inside - the endothelial cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(9), 1388–1397. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.05.015>
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology*, 50(6), 1007–1015. <https://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- Grauer. (2005). Canine glomerulonephritis: New thoughts on proteinuria and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 46(10), 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x>
- Grauer, G. F. (2011a). Introduction: Proteinuric Renal Disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 119–120. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.05.001>
- Grauer, G. F. (2011b). Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 121–127. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>
- Gross, O., & Kashtan, C. E. (2009). Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney International*, 76(6), 599–603. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.223>
- Guillén-Navarro, E., Ballesta-Martínez, M. J., & López-González, V. (2011). Genética y enfermedad. Concepto de genética médica. *Revista Nefrología*, 2(1), 3–10. <https://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10889>
- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J., & Brady, H. R. (2000). Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*, 58(4), 1389–1399. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00301.x>
- Harley, L., & Langston, C. (2012a). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*.
- Harley, L., & Langston, C. (2012b). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*, 53(June), 631–638.
- He, J. C., Chuang, P. Y., Ma'Ayan, A., & Iyengar, R. (2012). Systems biology of kidney diseases. *Kidney International*, 81(1), 22–39. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.314>

- Honda, K. (2015). The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell & Bioscience*, 5, 41. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0031-0>
- Ichii, O., Yabuki, A., Sasaki, N., Otsuka, S., Ohta, H., Yamasaki, M., ... Kon, Y. (2011). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histology and Histopathology*, 26(10), 1243–1255.
- Iyengar, S. K., Freedman, B. I., & Sedor, J. R. (2007). Mining the genome for susceptibility to diabetic nephropathy: the role of large-scale studies and consortia. *Seminars in Nephrology*, 27(2), 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.01.004>
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A., & Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393–400. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.393>
- Kari, J. A., Montini, G., Bockenbauer, D., Brennan, E., Rees, L., Trompeter, R. S., ... Marks, S. D. (2014). Clinico-pathological correlations of congenital and infantile nephrotic syndrome over twenty years. *Pediatric Nephrology*, 2173–2180. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2856-x>
- Kavoura, E., Gakiopoulou, H., Paraskevakou, H., Marinaki, S., Agrogiannis, G., Stofas, A., ... Lazaris, A. C. (2011). Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome. *Human Pathology*, 42(2), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.028>
- Kawachi, H., Suzuki, K., Miyauchi, N., Hashimoto, T., Otaki, Y., & Shimizu, F. (2009). Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(4), 275–280. <https://doi.org/10.1007/s10157-009-0162-x>
- Kelly, D. J., Aaltonen, P., Cox, A. J., Rumble, J. R., Langham, R., Panagiotopoulos, S., ... Gilbert, R. E. (2002). Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(7), 1327–1332.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., ... Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell*, 1(4), 575–582. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80057-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80057-X)
- Khoury, C. C., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2015). *Chronic Renal Disease. Chronic Renal Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411602-3.00013-5>
- Kim, R. N., Kim, D. S., Choi, S. H., Yoon, B. H., Kang, A., Nam, S. H., ... Park, H. S. (2012). Genome analysis of the domestic dog (Korean jindo) by massively parallel sequencing. *DNA Research*, 19(3), 275–287. <https://doi.org/10.1093/dnares/dss011>

- Klosterman, E. S., Moore, G. E., de Brito Galvao, J. F., Dibartola, S. P., Groman, R. P., Whittemore, J. C., ... Pressler, B. M. (2011). Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 206–214. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0669.x>
- Klosterman, & Pressler. (2011). Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 135–142. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.004>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011a). Expression of Nephtrin, Podocin, α -Actinin-4 and α 3-Integrin in Canine Renal Glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shirota, K. (2011b). Expression of nephtrin, podocin, α -actinin-4 and α 3-integrin in canine renal glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., Shirota, K., Li, X., ... Ahola, H. (2015). Nephtrin Contributes to Insulin Secretion and Affects Mammalian Target of Rapamycin Signaling Independently of Insulin Receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(6), e0157497. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>
- Kriz, W., & LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - Insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), 404–419. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x>
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., Lehir, M., & Lemley, K. V. (2013). The podocyte 's response to stress : the enigma of foot process effacement. *Am Physiol RENal Physiol*, 333–347. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00478.2012>
- Kruegel, J., Rubel, D., & Gross, O. (2013). Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nature Reviews. Nephrology*, 9(3), 170–178. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.259>
- Lees, G. E., Cianciolo, R. E., & Clubb, F. J. (2011). Renal biopsy and pathologic evaluation of glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 143–153. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.006>
- León-Bojorge, D. B. De. (2010). La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica Biopsia de médula ósea, 31(4), 178–187.
- LeVine, D. N., Zhang, D., Harris, T., & Vaden, S. L. (2010). The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein: Creatinine ratios. *Veterinary Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00167.x>
- Li, X., Chuang, P. Y., D'Agati, V. D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., ... He, J. C. (2015). Nephtrin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1–17.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>

- Liapis, H., & Gaut, J. P. (2013). The renal biopsy in the genomic era. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 28(8), 1207–1219. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2356-9>
- Littman. (2011). Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(1), 31–62. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.09.006>
- Littman. (2015). Emerging perspectives on hereditary glomerulopathies in canines. *Advances in Genomics and Genetics, Volume 5*, 179. <https://doi.org/10.2147/AGG.S65965>
- Littman, M. P., Daminet, S., Grauer, G. F., Lees, G. E., & van Dongen, a. M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, M, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & M, van D. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, Meryl P. (2013). Lyme nephritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(2), 163–173. <https://doi.org/10.1111/vec.12026>
- Littman, Meryl P., Wiley, C. A., & Raducha, M. G. (2013). Glomerulopathy and mutations in NPHS1 and KIRREL2 in soft-coated Wheaten Terrier dogs. *Mammalian Genome, Volume 24*, (Issue 3), pp 119–126. <https://doi.org/09388990>
- Littman, MP, Daminet, S., Grauer, G., Lees, G., & van Dongen, M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Lowik, M. M., Groenen, P. J., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1017-x>
- Luimula, P., Ahola, H., Wang, S. X., Solin, M. L., Aaltonen, P., Tikkanen, I., ... Holthofer, H. (2000). Nephryn in experimental glomerular disease. *Kidney International*, 58(4), 1461–1468. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00308.x>
- Maas, R. J., Deegens, J. K., van den Brand, J. A., Cornelissen, E. A., & Wetzels, J. F. (2013). A retrospective study of focal segmental glomerulosclerosis: clinical criteria can identify patients at high risk for recurrent disease after first renal transplantation. *BMC.Nephrol.*
- Macdougall, D. F., Cook, T., Steward, a P., & Cattell, V. (1986). Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International*,

- 29, 1144–1151. <https://doi.org/10.1038/ki.1986.120>
- Mathieson, P. (2011). Primary glomerular disease. *Medicine*, 39(8), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.05.005>
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., & Halloran, P. F. (2004). Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney International*, 65(2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x>
- Michaud, J.-L. R., Hosseini-Abardeh, M., Farah, K., & Kennedy, C. R. J. (2009). Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(3), 166–178. <https://doi.org/10.1002/cm.20339>
- Miner, J. H. (2012). The glomerular basement membrane. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>
- Miner, J. H. (2013). NIH Public Access, 318(9), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>.The
- Nagata, M. (2016). Podocyte injury and its consequences. *Kidney International*, 89(6), 1221–1230.
- Neusser, M. a, Lindenmeyer, M. T., Moll, A. G., Segerer, S., Edenhofer, I., Sen, K., ... Cohen, C. D. (2010). Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *The American Journal of Pathology*, 176(2), 594–607. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090268>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Harris, A., & Anderson, E. (2006). Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01323>
- Ohse, T., Pippin, J. W., Chang, A. M., Krofft, R. D., Miner, J. H., Vaughan, M. R., & Shankland, S. J. (2009). The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney International*, 76(12), 1225–1238. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.386>
- Patrakka, J., & Tryggvason, K. (2010). Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.069>
- Peña, A., & Mendizabal, S. (2008). Síndrome nefrótico en la edad pediátrica. *Aeped.Es*, 154–167. Retrieved from http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/14_3.pdf
- Perysinaki, G. S., Moysiadis, D. K., Bertsias, G., Giannopoulou, I., Kyriacou, K., & Nakopoulou, L. (2011). Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology, 781–791.
- Pinto-Cárdenas, J. C., Chávez-crisóstomo, D., Morales-salinas, E., Salas-, G., Sánchez-

- aguilar, A. C., & Valencia-mayoral, P. (2009). Amiloidosis generalizada en perros Sharpei. Comunicación de dos casos. *Patología Revista Latinoamericana*, 47(4), 341–345.
- Polzin, D. J., & Cowgill, L. D. (2013). Development of Clinical Guidelines for Management of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, S2–S4. <https://doi.org/10.1111/jvim.12225>
- Qiu, L., & Zhou, J. (2016). Simultaneous mutations of LAMB2 and NPHP1 genes in a Chinese girl with isolated congenital nephrotic syndrome: a case report. *BMC Pediatrics*, 16(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0583-0>
- Quaggin, S. E., & Kreidberg, J. A. (2008). Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development (Cambridge, England)*, 135(4), 609–620. <https://doi.org/10.1242/dev.001081>
- Raval, S. H., Joshi, D. V., Patel, B. J., Patel, J. G., Patel, S. J., Karanti, A. M., & Panchbuddhe, B. N. (2015). Renal dysplasia in labrador male dog: A case report. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 39(1), 87. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2015.00020.6>
- Reddy, M. A., Park, J. T., & Natarajan, R. (2012). Epigenetic modifications and diabetic nephropathy. *Kidney Research and Clinical Practice*, 31(3), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2012.07.004>
- Reiser, J., & Altintas, M. M. (2016). Podocytes. *F1000Research*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7255.1>
- Rico, M., Mukherjee, A., Konieczkowski, M., Bruggeman, L. A., Miller, R. T., Khan, S., ... Sedor, J. R. (2005). WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(2), F431–F441. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2004>
- Rinschen, M. M., Bharill, P., Wu, X., Kohli, P., Reinert, M. J., Kretz, O., ... Benzing, T. (2016). The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Human Molecular Genetics*, 25(7), 1328–1344. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw016>
- Román Ortiz, E. (2014). Síndrome Nefrótico Pediátrico. *Protoc Diagn Ter Pediatr.*, 2014;1:283, 283–301.
- Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Wetzels, J. F. M. (2012). Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(3), 882–890. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr771>
- Rørtveit, R., Lingaas, F., Bønsdorff, T., Eggertsdóttir, A. V., Grøndahl, A. M., Thomassen, R., ... Jansen, J. H. (2012). A canine autosomal recessive model of collagen type III glomerulopathy. *Laboratory Investigation*, 92(10), 1483–1491. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.112>

- Rudnicki, M., Eder, S., Perco, P., Enrich, J., Scheiber, K., Koppelstätter, C., ... Mayer, G. (2007). Gene expression profiles of human proximal tubular epithelial cells in proteinuric nephropathies. *Kidney International*, 71(4), 325–335. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002043>
- Schmid, H., Cohen, C. D., Henger, A., Irrgang, S., Schlöndorff, D., & Kretzler, M. (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 64(1), 356–360. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00074.x>
- Schneider, S. M., Cianciolo, R. E., Nabity, M. B., Clubb, F. J., Brown, C. A., & Lees, G. E. (2013). Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007-2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1). <https://doi.org/10.1111/jvim.12247>
- Sekulic, M., & Pichler Sekulic, S. (2013). A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy. *Pathology Research International*, 2013.
- Short, A. D., Holder, A., Rothwell, S., Massey, J., Scholey, R., Kennedy, L. J., ... Ollier, W. E. (2014). Searching for “monogenic diabetes” in dogs using a candidate gene approach. *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-8>
- Soares, M. (2005). Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. *Journal of Venomous ...*, (December), 579–593. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992005000400014>
- Sugahara, G., Hosaka, S., Mineshige, T., Kamiie, J., & Shirota, K. (2015). Clinical and histopathological features resembling those of human focal segmental glomerulosclerosis in a cat with nonimmune-mediated glomerulonephropathy. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0569-4>
- Suzuki, T., Matsusaka, T., Nakayama, M., Asano, T., Watanabe, T., Ichikawa, I., & Nagata, M. (2009). Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1675–1682. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080789>
- Tao, J., Polumbo, C., Reidy, K., Sweetwyne, M., & Susztak, K. (2014). A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 85(4), 972–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.463>
- Tsai, K. L., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2007). Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*, 18(6–7), 444–451. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9037-1>
- Vaden, S. L. (2011). Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 128–134. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>
- Vaden, S. L., Levine, J. F., Lees, G. E., Groman, R. P., Grauer, G. F., & Forrester, S. D.

- (2005). Renal biopsy: a retrospective study of methods and complications in 283 dogs and 65 cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02767.x>
- Vala, H., Mega, A. C., Mesquita, J., Nóbrega, C., Cruz, R., Esteves, F., ... Reis, F. (2013). Presence of Kimmelstiel-Wilson-like Lesions in Canine Chronic Kidney Disease. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 100. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.219>
- Vogtländer, N. P. J., Dijkman, H., Bakker, M. a H., Campbell, K. P., van der Vlag, J., & Berden, J. H. M. (2005). Localization of alpha-dystroglycan on the podocyte: from top to toe. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(11), 1345–1353. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6596.2005>
- Wakamatsu, N., Surdyk, K., Carmichael, K. P., & Brown, C. a. (2007). Histologic and ultrastructural studies of juvenile onset renal disease in four Rottweiler dogs. *Veterinary Pathology*, 44(1), 96–100. <https://doi.org/10.1354/vp.44-1-96>
- Wang, G., Lai, F. M. M., Lai, K. B., Chow, K. M., Kwan, B. C. H., Li, P. K. T., & Szeto, C. C. (2008). Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. *European Journal of Endocrinology*, 158(3), 317–322. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0708>
- Whiteley, M. H., Bell, J. S., & Rothman, D. A. (2011). Novel Allelic Variants in the Canine Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Promoter Are Associated with Renal Dysplasia in Dogs. *PLoS One*, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016684>
- William, J., Hogan, D., & Batlle, D. (2005). Predicting the development of diabetic nephropathy and its progression. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 202–211. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.02.001>
- Yhee, J.-Y., Yu, C.-H., Kim, J.-H., Im, K.-S., Chon, S.-K., & Sur, J.-H. (2010). Histopathological retrospective study of canine renal disease in Korea, 2003–2008. *Journal of Veterinary Science*, 11, 277–283. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.4.277>
- Zhang, S.-Y., Marlier, A., Gribouval, O., Gilbert, T., Heidet, L., Antignac, C., & Gubler, M. C. (2004). In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney International*, 66(3), 945–954. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00840.x>
- Zheng, M., Lv, L. L., Ni, J., Ni, H. F., Li, Q., Ma, K. L., & Liu, B. C. (2011). Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS ONE*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020431>

4. Discusión General

Las enfermedades glomerulares son una de las principales causas de enfermedad renal crónica en los animales de compañía y humanos. Las enfermedades glomerulares son diversas y se necesita una biopsia renal o estudio complejo para determinar la afección específica. Las glomerulopatías familiares ocurren frecuentemente en humanos y en muchas razas de perros. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con enfermedad glomerular han adquirido una lesión glomerular mediada por inmunocomplejos o debido a factores sistémicos, que se cree que son el resultado de un proceso de enfermedad en otros lugares (secundarias) (Lees et al., 2011; Mathieson, 2011; Neusser et al., 2010; Vaden, 2011).

La enfermedad renal crónica progresa a enfermedad en etapa terminal y puede aumentar el riesgo de desarrollo de enfermedades complejas como la diabetes y la hipertensión (Khoury, Chen, & Ziyadeh, 2015; William et al., 2005). Un aumento en el número de pacientes con ERC no sólo se ha observado en humanos sino también en pequeños animales, como resultado de las formas de vida y el envejecimiento. De modo similar a los seres humanos, la ERC es una de las causas más común de muerte en perros y gatos (Ichii et al., 2011; Lees et al., 2011; Nicholson, Gee, Harris, & Anderson, 2006).

Con la idea contribuir al entendimiento de los mecanismos que inducen los diferentes cambios glomerulares en los individuos con proteinuria, se realizó este estudio simultaneo en especímenes de caninos y humanos que presentaban algún grado de proteína en orina para determinar y clasificar el tipo de afección renal y glomerular que se presentaba en los caninos y aclarar algunos de los mecanismos asociados al proceso patológico relacionado con los cambios glomerulares y podocitarios así como, con las proteínas del podocito y la

MBC. De la misma forma, realizar una comparación entre los hallazgos, para establecer si se presentaba algún grado de similitud de las lesiones y los mecanismos entre caninos y humanos como ha sido documentado para otras enfermedades (Tsai et al., 2007).

La proteinuria es la manifestación clásica de las glomerulopatías y se debe a una falla en el funcionamiento de la barrera de filtración glomerular. Numerosos autores han relacionado el aumento de la excreción urinaria de proteínas con la disminución de la supervivencia de los pacientes, de forma independiente a otro factor. En el presente estudio se encontró asociado positivamente el rango de proteinuria al grado de afección glomerular, coincidiendo con la literatura, tanto en humanos como en perros, por lo que se especula que la proteinuria en sí misma no solo es la consecuencia, sino que contribuye además, al daño renal continuo (Harley & Langston, 2012a; Jacob et al., 2005; LeVine et al., 2010; Maas et al., 2013).

El podocito es una célula terminalmente diferenciada, muy especializada, que realiza funciones únicas en el organismo y que posee uniones intercelulares específicas, asociadas con el citoesqueleto, que mantienen una estructura única en la unión de sus prolongaciones denominada diafragma de filtración. Esta célula juega un papel central en la permselectividad de la filtración glomerular y responde a la injuria con cambios reversibles o irreversibles según la severidad y la duración del proceso estresante (Kriz et al., 2013; Ohse et al., 2009). El podocito tiene mínima capacidad proliferativa así que, la pérdida de podocitos resulta en hipertrofia de los restantes para cubrir la superficie de la MBC (Bierzynska et al., 2015; Kriz & LeHir, 2005; Neusser et al., 2010; Tao et al., 2014). Los hallazgos de este trabajo muestran evidencias de las diferentes lesiones podocitarias en grados moderados a severos en los animales con GP, mostrando asociación entre el daño del podocito y el grado de proteinuria como se ha documentado ampliamente.

Los dos tipos principales de lesión del podocito son, la lesión subletal de las nefropatías potencialmente reversibles y la lesión letal, irreversible que daría lugar a una nefropatía progresiva. En humanos, en muchos casos de síndrome nefrótico infantil y en la mayoría de las nefropatías proteinúricas del adulto, la pérdida de pedicelos es considerada una manifestación temprana de una fase continua de lesión del podocito que incluye vacuolización, acumulo de filamentos, hipertrofia, desprendimiento del podocito de la

membrana basal y finalmente, pérdida de la célula podocitaria (Kriz & LeHir, 2005; Li et al., 2015; Román Ortiz, 2014). Las lesiones ultraestructurales descritas en los tejidos de nuestro estudio coinciden completamente con las de los humanos y las reportadas por los anteriores autores.

A partir del estudio histopatológico en caninos se logró identificar tres entidades principales, displasia renal (DR), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) y glomerulonefritis (GN). Todos los animales del estudio presentaron algún grado de glomerulopatía a diferencia de los animales del grupo control; adicionalmente los animales enfermos mostraron grados variables de daño tubulointersticial, siendo más severo en los animales con DR y GN. El grupo de caninos con displasia renal presentó un grado de proteinuria más severo que los demás grupos lo cual puede explicarse por el daño tubulointersticial adicional, similar a lo reportado por varios autores, donde la disfunción y daño tubular aumenta el grado de proteinuria debido a la falta de reabsorción tubular activa (Brum et al., 2008; Harley & Langston, 2012b; Raval et al., 2015).

La GEFS fue la lesión más frecuentemente observada en los caninos en este estudio, lo que concuerda con lo mostrado por Cianciolo y col. en 2016 y Schneider y col. en 2013, quienes en investigaciones realizadas en caninos, determinaron la GEFS como la causa más común de GP en perros, razón por la cual se decidió comparar estos hallazgos con especímenes de pacientes humanos con GEFS (Akchurin & Reidy, 2014; Arias et al., 2009; Carney, 2014; Erkan et al., 2004; Maas et al., 2013).

Desde el primer caso documentado de GEFS en perros (Aresu et al., 2010), esta afección ha sido reconocida como la causa más común de enfermedad glomerular en caninos. Los últimos estudios sobre enfermedad renal canina, demostraron que la GEFS es una causa común de proteinuria, lo que explica el 20,6% de los casos (Schneider et al., 2013).

Las enfermedades proteinúricas están relacionadas con daños estructurales en las células podocitarias y con cambios en los patrones de expresión de las proteínas del diafragma de filtración y otras moléculas asociadas con las lesiones glomerulares escleróticas (Arif et al., 2014; Gupta et al., 2000; Perysinaki et al., 2011; Reiser & Altintas, 2016). En el presente estudio se encontró una disminución significativa en la expresión de las moléculas del diafragma de filtración tanto en perros como humanos con glomerulopatías y un cambio

importante en los patrones de marcación, intensidad y colocalización de estas proteínas al compararlos con especímenes de pacientes control sanos. Estos hallazgos coinciden con varios estudios que reportan una disminución en la expresión de las proteínas del DF y una correlación con enfermedad glomerular tanto en humanos como animales (Ichii et al., 2011; Kawachi et al., 2009; Kobayashi et al., 2011b; Tao et al., 2014).

Se ha comprobado en varias glomerulopatías heredofamiliares, que las alteraciones genéticas en algunas de las proteínas que forman parte del diafragma de filtración inducen proteinuria o síndrome nefrótico de inicio temprano. Sin embargo, otras causas no genéticas del síndrome nefrótico también producen este tipo de alteraciones (Arias et al., 2009; Bierzynska et al., 2015). Las modificaciones en la expresión génica son la respuesta de la célula podocitaria a las constantes modificaciones de su microambiente. Estos cambios en la expresión de las proteínas del DF y las proteínas de citoesqueleto producen modificaciones en los pedicelos que al ser crónicos, pueden terminar en lesión podocitaria irreversible (Armelloni et al., 2014; Reiser & Altintas, 2016) .

Este trabajo encontró cambios significativos en las mediciones de expresión de nefrina, podocina y alfa-actinina 4 y en la cantidad de ARNm de NPHS1, NPHS1 y ACTN4 en perros y humanos con glomerulopatías. Estos resultados muestran similitudes de especie en cuanto a la patogénesis de la GEFS canina y humana y comprueban que los podocitos tienen mecanismos similares de lesión, con susceptibilidades generales entre las dos especies. Kobayashi y col en 2011, en estudios realizados comparando la expresión de las proteínas de la DF en caninos y felinos, encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los caninos y felinos, proponiendo diferentes vías y susceptibilidades en la respuesta de los podocitos a la injuria en estas dos especies.

Además de una disminución significativa en la expresión de las proteínas de filtración, los cambios en la localización de estas y su distribución en las células y el glomérulo, implica principalmente una modificación en la colocación y la asociación de las proteínas, y por lo tanto en el ensamblaje del citoesqueleto. Lo anterior ha sido documentado por varios autores, donde se describe las diferentes respuestas del podocito a la injuria, llevando a cambios ultraestructurales y en la expresión génica en estas células (Patrakka & Tryggvason, 2010; Reiser & Altintas, 2016; Suzuki et al., 2009). Shankland y colaboradores

en 2006, describen como las diferentes injurias y lesiones inducen cambios en las proteínas y desencadenan diferentes tipos de glomerulopatías, muchas veces induciendo cambios irreversibles como la GEFS. Las causas adquiridas no inmunes de la lesión podocitaria son múltiples. Estas incluyen causas infecciosas (VIH, Parvo B19) metabólicas (diabetes) y existe una evidencia creciente de literatura que muestra que el estrés-tensión que se dan como resultado de aumento de la presión intraglomerular, causa lesión de los podocitos. Las enfermedades infiltrativas de los podocitos son menos comunes, en el caso del amiloide, varios estudios han demostrado que las espículas amiloides individuales se "proyectan" a través del GBM, penetrando en los podocitos adyacentes, causando lesión y adicionalmente, aunque la gran mayoría de las mutaciones de las proteínas del DF son congénitas o hereditarias, estudios recientes han demostrado que la GEFS esporádica puede surgir debido a mutaciones en la podocina, donde se hipotetiza que una mutación genética que por sí sola puede no ser suficiente para causar proteinuria, en presencia de una segunda lesión, como hipertensión o hipercolesterolemia, o cambios inflamatorios, se convierte en una lesión de los podocitos (Baelde et al., 2007; Lowik et al., 2009; Zhang et al., 2004).

La realización de este trabajo de investigación permitió la primera descripción compleja de la histopatología renal canina con utilización de metodologías avanzadas en nuestro medio y posterior elaboración de un estudio comparativo con las glomerulopatías humanas, llevando a establecer hipótesis de los mecanismos de enfermedad de las enfermedades podocitarias más representadas. Se corroboró que las proteínas podocitarias presentan cambios en sus niveles de expresión tanto genómico como estructural, mostrando estos mecanismos como los eventos celulares iniciales que desencadenan los cambios ultraestructurales de adaptación y posteriormente de remodelación que se observan en los pacientes, caninos y humanos, con glomerulopatías.

En conclusión, en el presente trabajo se evidenciaron cambios histopatológicos, ultraestructurales, en los niveles de expresión y en la localización de las proteínas podocitarias y la citoquina TGFB1 asociados al desarrollo de enfermedades proteinúricas tanto en humanos como en caninos. El estudio comparativo permitió definir las similitudes que existen entre las estructuras del glómulo y del DF entre caninos y humanos y los mecanismos celulares que inducen este tipo de lesiones, confirmando una vez más al canino como un modelo biológico espontáneo para este tipo de enfermedades complejas en humanos.

5. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados de este trabajo permitieron el estudio complejo de la biopsia renal en caninos, demostrando su amplia utilidad pues proporciona numerosa y valiosa información que permite la descripción de patrones de enfermedad y sus diferentes combinaciones, aportando en el entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades glomerulares tanto para el estudio en ciencias básicas, modelos para la patología comparada, así como para ser utilizado en la práctica clínica para un mejor y correcto abordaje de los pacientes proteinúricos en medicina veterinaria.

Debido a que, en el momento de la planeación del estudio, se pretendía realizar la investigación sobre especímenes de tejido renal de animales vivos que cursaran con proteinuria idiopática masiva o persistente, se pudo determinar que no se realiza de manera rutinaria la toma de biopsias renales, ni en clínicas privadas, ni en hospitales universitarios de las principales ciudades del país.

Este trabajo pretende hacer visible como el uso poco frecuente o el desconocimiento de las herramientas actualmente disponibles para el diagnóstico preciso en la biopsia renal canina, ha creado preocupaciones infundadas asociadas con la baja utilidad o la oportunidad del uso de esta herramienta en la clínica veterinaria.

Adicionalmente, se busca promover la toma de biopsias renales adecuadas, con planeación pertinente y demostrar la disponibilidad de los servicios diagnósticos completos que permitan el adecuado y completo estudio de esta. Este tipo de estudios pretenden adicionalmente afianzar el conocimiento sobre la utilidad de las herramientas

histopatológicas en la práctica clínica, como ocurre por ejemplo en el caso de la oncología donde se usa de manera rutinaria.

Finalmente, la comparación de los hallazgos histopatológicos y moleculares en caninos, con aquellos descritos para las muestras humanas, mostraron similitudes importantes entre el tipo de lesiones y los mecanismos de patogénesis, evidenciando la gran similitud en las dos especies en cuanto a enfermedades de presentación espontánea. Lo anterior refuerza como el canino es considerado actualmente un modelo de diversas enfermedades complejas en humanos y muestra que es un modelo adecuado para el estudio de las patologías renales de diversa índole, teniendo múltiples ventajas sobre los modelos murinos, especialmente la presentación natural de las afecciones.

5.1 Bibliografía

- Akchurin, O., & Reidy, K. J. (2014). Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatric Nephrology*, *30*(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2753-3>
- Aresu, L., Zanatta, R., Luciani, L., Trez, D., & Castagnaro, M. (2010). Severe renal failure in a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Comparative Pathology*, *143*(2–3), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.12.016>
- Arias, L. F., Henao, J., Giraldo, R. D., Carvajal, N., Rodelo, J., & Arbeláez, M. (2009). Glomerular diseases in a Hispanic population: Review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Medical Journal*, *127*(3), 140–144. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000300006>
- Arif, E., Rathore, Y. S., Kumari, B., Ashish, F., Wong, H. N., Holzman, L. B., & Nihalani, D. (2014). Slit diaphragm protein nephl1 and its signaling: A novel therapeutic target for protection of podocytes against: Glomerular injury. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(14), 9502–9518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505743>
- Armelloni, S., Corbelli, A., Giardino, Laura1. Armelloni S, Corbelli A, Giardino L, et al. P. R. biomolecular developments. *B. C.* 2014;*5*(4):319-330. doi:10. 1515/bm.-2014-0020., Li, M., Ikehata, M., Mattinzoli, D., ... Rastaldi, M. P. (2014). Podocytes: Recent biomolecular developments. *Biomolecular Concepts*, *5*(4), 319–330.
- Baelde, H. J., Eikmans, M., Lappin, D. W. P., Doran, P. P., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P.-T., ... Bruijn, J. a. (2007). Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney International*, *71*(7), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002101>
- Bierzynska, A., Soderquest, K., & Koziell, A. (2015). Genes and podocytes - New insights into mechanisms of podocytopathy. *Frontiers in Endocrinology*, *6*(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00226>
- Brum, K. B., Juliano, R. S., Souza, M. A., Fleury, L. F. F., & Damasceno, A. D. (2008). Renal dysplasia in a Boxer dog: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *60*(5), 1084–1088. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000500007>
- Carney, E. F. (2014). Glomerular disease: Frequency of podocyte-related gene mutations in FSGS. *Nrn*, *10*(4), 184. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.29>
- Erkan, E., Garcia, C. D., Patterson, L. T., Mishra, J., Mitsnefes, M. M., Kaskel, F. J., & Devarajan, P. (2004). Induction of Renal Tubular Cell Apoptosis in Focal Segmental Glomerulosclerosis: Roles of Proteinuria and Fas-Dependent Pathways. *Journal of the American Society of Nephrology*, *(22)*, ASN. <https://doi.org/10.1681/ASN.2003100861>

- Gupta, S., Clarkson, M. R., Duggan, J., & Brady, H. R. (2000). Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*, 58(4), 1389–1399. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00301.x>
- Harley, L., & Langston, C. (2012a). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*.
- Harley, L., & Langston, C. (2012b). Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*, 53(June), 631–638.
- Ichii, O., Yabuki, A., Sasaki, N., Otsuka, S., Ohta, H., Yamasaki, M., ... Kon, Y. (2011). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histology and Histopathology*, 26(10), 1243–1255.
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A., & Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393–400. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.393>
- Kawachi, H., Suzuki, K., Miyauchi, N., Hashimoto, T., Otaki, Y., & Shimizu, F. (2009). Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(4), 275–280. <https://doi.org/10.1007/s10157-009-0162-x>
- Khoury, C. C., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2015). *Chronic Renal Disease*. *Chronic Renal Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411602-3.00013-5>
- Kobayashi, R., Kamiie, J., Yasuno, K., Ogihara, K., & Shiota, K. (2011). Expression of nephrin, podocin, α -actinin-4 and α 3-integrin in canine renal glomeruli. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.007>
- Kriz, W., & LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - Insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), 404–419. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x>
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., Lehir, M., & Lemley, K. V. (2013). The podocyte 's response to stress : the enigma of foot process effacement. *Am Physiol REnal Physiol*, 333–347. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00478.2012>
- Lees, G. E., Cianciolo, R. E., & Clubb, F. J. (2011). Renal biopsy and pathologic evaluation of glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 143–153. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.006>
- LeVine, D. N., Zhang, D., Harris, T., & Vaden, S. L. (2010). The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein: Creatinine ratios. *Veterinary Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00167.x>
- Li, X., Chuang, P. Y., D'Agati, V. D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., ... He, J. C. (2015). Nephrin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1–17.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>

- Lowik, M. M., Groenen, P. J., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1017-x>
- Maas, R. J., Deegens, J. K., van den Brand, J. A., Cornelissen, E. A., & Wetzels, J. F. (2013). A retrospective study of focal segmental glomerulosclerosis: clinical criteria can identify patients at high risk for recurrent disease after first renal transplantation. *BMC.Nephrol.*
- Mathieson, P. (2011). Primary glomerular disease. *Medicine*, 39(8), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.05.005>
- Neusser, M. a, Lindenmeyer, M. T., Moll, A. G., Segerer, S., Edenhofer, I., Sen, K., ... Cohen, C. D. (2010). Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *The American Journal of Pathology*, 176(2), 594–607. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090268>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Harris, A., & Anderson, E. (2006). Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01323>
- Ohse, T., Pippin, J. W., Chang, A. M., Krofft, R. D., Miner, J. H., Vaughan, M. R., & Shankland, S. J. (2009). The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney International*, 76(12), 1225–1238. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.386>
- Patrakka, J., & Tryggvason, K. (2010). Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.069>
- Perysinaki, G. S., Moysiadis, D. K., Bertsiadis, G., Giannopoulou, I., Kyriacou, K., & Nakopoulou, L. (2011). Podocyte main slit diaphragm proteins , nephrin and podocin , are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology, 781–791.
- Raval, S. H., Joshi, D. V., Patel, B. J., Patel, J. G., Patel, S. J., Karanti, A. M., & Panchbuddhe, B. N. (2015). Renal dysplasia in labrador male dog: A case report. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 39(1), 87. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2015.00020.6>
- Reiser, J., & Altintas, M. M. (2016). Podocytes. *F1000Research*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7255.1>
- Román Ortiz, E. (2014). Síndrome Nefrótico Pediátrico. *Protoc Diagn Ter Pediatr.*, 2014;1:283, 283–301.
- Schneider, S. M., Cianciolo, R. E., Nabity, M. B., Clubb, F. J., Brown, C. A., & Lees, G. E. (2013). Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007-2012). *Journal of Veterinary*

- Internal Medicine*, 27(S1). <https://doi.org/10.1111/jvim.12247>
- Suzuki, T., Matsusaka, T., Nakayama, M., Asano, T., Watanabe, T., Ichikawa, I., & Nagata, M. (2009). Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1675–1682. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080789>
- Tao, J., Polumbo, C., Reidy, K., Sweetwyne, M., & Susztak, K. (2014). A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 85(4), 972–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.463>
- Vaden, S. L. (2011). Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 128–134. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>
- William, J., Hogan, D., & Battle, D. (2005). Predicting the development of diabetic nephropathy and its progression. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 202–211. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.02.001>
- Zhang, S.-Y., Marlier, A., Gribouval, O., Gilbert, T., Heidet, L., Antignac, C., & Gubler, M. C. (2004). In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney International*, 66(3), 945–954. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00840.x>

