

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ DE LA NOVA LÍNIA NOD.ACE2^{-/-}:
ESTUDI DE L'APARICIÓ DE DIABETIS I LA
PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA**

Tesi presentada per

Heleia Roca Ho

Per a optar al grau de Doctora en Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina

Directors

Dr. Julio Pascual Santos

Dra. M^a José Soler Romeo

Dra. Marta Riera Oliva

Tutora

Dra. Assumpció Bosch

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular – Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona**

Barcelona, Juny de 2015

CARACTERITZACIÓ DE LA NOVA LÍNIA NOD.ACE2^{-/-}: ESTUDI DE L'APARICIÓ DE DIABETIS I LA PROGRESSIÓ DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA

Tesi doctoral presentada per

Heleia Roca Ho

Per a optar al grau de Doctora en Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina

Directors

Dr. Julio Pascual Santos Dra. M^aJosé Soler Romeo Dra. Marta Riera Oliva

Tutora

Dra. Assumpció Bosch

Doctorand

Heleia Roca Ho

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular – Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona**

Barcelona, Juny de 2015

Als meus pares

ÍNDIX	
AGRAÏMENTS	8
PARTICIPACIÓ EN CONGRESSOS DERIVADA DEL TREBALL DE LA TESI	
DOCTORAL	11
AJUDES REBUDES	13
ABREVIATURES	15
RESUM	19
I. INTRODUCCIÓ	21
A. NEFROPATIA DIABÈTICA	22
A.1. DEFINICIÓ.....	22
A.2. SIMPTOMATOLOGIA CLÍNICA.....	22
A.3. ETIOLOGIA	24
A.4. FISIOPATOLOGIA.....	24
A.5. HISTOLOGIA.....	26
B. MODELS EXPERIMENTALS DE NEFROPATIA DIABÈTICA	27
B.1. CRITERIS DE VALIDACIÓ.....	27
B.2. MODELS MURINS DE NEFROPATIA DIABÈTICA: DIABETIS MELLITUS	
TIPUS 1.....	28
B.2.1. MODELS ESPONTANIS	28
B.2.2. MODELS INDUÏTS FARMACOLÒGICAMENT	29
B.2.3. MODELS INDUÏTS PER MODIFICACIÓ GENÈTICA	30
B.3. MODELS MURINS DE NEFROPATIA DIABÈTICA: DIABETIS MELLITUS	
TIPUS 2.....	31
B.3.1. MODELS ESPONTANIS	31
B.3.2. MODELS INDUÏTS	32
B.3.3. MODELS INDUÏTS PER MODIFICACIÓ GENÈTICA	33
C. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	34
C.1. GENERALITATS	34
C.2. ENZIM CONVERTIDOR D'ANGIOTENSINA (ECA2).....	37
D. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL RATOLÍ NO OBÈS DIABÈTIC	
(NOD).....	41
E. ESTUDI DE L'ECA2 EN MODELS EXPERIMENTALS	48
E.1. EFECTES DE LA DELECIÓ DEL GEN <i>eca2</i> EN EL SISTEMA	
CARDIOVASCULAR	48
E.2. EFECTES DE LA INHIBICIÓ I LA DELECIÓ DEL GEN <i>eca2</i> EN LA	
NEFROPATIA DIABÈTICA.....	51

E.3. EFECTES DE LA DELECIÓ DEL GEN <i>eca2</i> EN L'HOMÈOSTASI DE LA GLUCOSA I LA INSULINA	55
II. HIPÒTESI	59
III. OBJECTIUS	61
IV. MATERIALS I MÈTODES.....	63
A. DISSENY EXPERIMENTAL.....	64
B. OBTENCIÓ DE LES NOVES LÍNIES NOD.ACE2 ^{-/-} i NOR.ACE2 ^{-/-}	65
B.1. ANIMALS	65
B.2. DELECIÓ DEL GEN <i>eca2</i>	67
B.3. OBTENCIÓ DE LES LÍNIES I COMPROVACIÓ DEL GENOTIP	67
B.3.1. PROCÉS DE CRIA.....	67
B.3.2. PROCÉS DE GENOTIPAT	68
B.3.2.1. DISSENY DE PRIMERS	68
B.3.2.2. EXTRACIÓ D'ADN.....	69
B.3.2.3. GENOTIPAT	70
B.3.2.3.1. MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	70
B.3.2.3.2. MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	72
C. ESTUDI DE L'HOMÈOSTASI DE LA GLUCOSA I DE LA INSULINA	73
C.1. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL	74
C.2. RECOLLIDA DE SÈRUM PER A LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA.....	74
C.3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL	75
C.4. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA EN SÈRUM	75
C.5. CIRURGIA A PUNT FINAL D'ESTUDI	76
C.6. IMMUNOTINCIÓ D'INSULINA EN ELS ILLOTS PANCREÀTICS	76
C.7. ESTUDI D'APOPTOSI DE LES CÈL·LULES β DELS ILLOTS PANCREÀTICS.....	77
D. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA	77
D.1. DETERMINACIÓ DE LA GLICÈMIA CAPIL·LAR	77
D.2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL I LA FREQUÈNCIA CARDÍACA.....	78
D.3. CÀLCUL DE LA TAXA DE FILTRACIÓ GLOMERULAR PER BOLUS D'INULINA	78
D.4. CIRURGIA I EXTRACCIÓ DE MOSTRES AL FINAL D'ESTUDI.....	80
D.5. MESURA DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA D'ALBÚMINA	81
D.6. ANÀLISI DE L'ÀREA GLOMERULAR I L'ÍNDIX MESANGIAL	82
D.7. ANÀLISI PODOCITÀRIA	83

D.9. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS DE TEIXIT.....	83
D.10. EXPRESSIÓ PROTEICA D'ECA I ECA2 EN TEIXIT	84
D.11. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE L'ECA.....	85
D.12. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	87
V. RESULTATS.....	88
A. OBTENCIÓ DE LES NOVES LÍNIES NOD.ACE2 ^{-/-} i NOR.ACE2 ^{-/-}	89
A.1. RESULTAT DEL GENOTIPAT	89
A.1.1. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	89
A.1.2. PCR QUANTITATIVA (qPCR)	89
A.2. CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES.....	90
A.2.1. COMPROVACIÓ DE LA DELECIÓ DEL GEN <i>eca2</i>	90
A.2.2. COLOR DEL PELATGE.....	91
A.2.3. PES CORPORAL.....	92
A.2.3.1. LÍNIA NOD.ACE2 ^{-/-}	92
A.2.3.2. LÍNIA NOR.ACE2 ^{-/-}	93
B. ESTUDI DE L'HOMÈOSTASI DE LA GLUCOSA I LA INSULINA EN EL MODEL NOD.ACE2 ^{-/-}	94
B.1. EVOLUCIÓ DE LA GLICÈMIA BASAL	94
B.2. APARICIÓ DE LA DIABETIS	96
B.3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL.....	98
B.3.1. LÍNIA NOD.ACE2 ^{-/-}	98
B.3.2. LÍNIA NOR.ACE2 ^{-/-}	100
B.4. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL.....	102
B.4.1. LÍNIA NOD.ACE2 ^{-/-}	102
B.4.2. LÍNIA NOR.ACE2 ^{-/-}	103
B.5. ESTUDI DE LA PRIMERA FASE DE LA SECRECIÓ D'INSULINA	104
B.6. ESTUDI DE LA HISTOLOGIA PANCREÀTICA	105
B.6.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ D'INSULINA EN ILLOTS β PANCREÀTICS ...	105
B.6.2. ANÀLISI DE L'APOPTOSI DELS ILLOTS β PANCREÀTICS	107
C. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA EN ELS MODELS NOD.ACE2 ^{-/-} I NOR.ACE2 ^{-/-}	107
C.1. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES FISIOLÒGICS.....	108
C.1.1. CARACTERÍSTIQUES DELS ANIMALS INCLOSOS	108
C.1.2. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL	109
C.1.3. EVOLUCIÓ DE LA GLICÈMIA CAPIL·LAR	110
C.2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL	111

C.2.1. PRESSIÓ ARTERIAL SISTÒLICA.....	111
C.2.2. PRESSIÓ ARTERIAL DIASTÒLICA.....	112
C.2.3. FREQUÈNCIA CARDÍACA	113
C.2.4. PRESSIÓ ARTERIAL MITJA.....	114
C.2.5. PRESSIÓ ARTERIAL DEL POLS.....	115
C.3. QUOCIENT PES RENAL/PES CORPORAL	117
C.4. QUOCIENT PES CARDÍAC/PES CORPORAL	118
C.5. ESTUDI DE LA FUNCIO RENAL.....	119
C.5.1. ANÀLISI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA D'ALBÚMINA (EUA).....	119
C.5.2. ANÀLISI DE LA TAXA DE FILTRACIÓ GLOMERULAR (TFG).....	120
C.6. ESTUDI DE LA HISTOLOGIA RENAL.....	121
C.6.1. ANÀLISI DE L'ÀREA GLOMERULAR I L'ÀREA MESANGIAL.....	121
C.6.2. ANÀLISI PODOCITÀRIA.....	124
C.7. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA D'ECA.....	125
C.7.1. ANÀLISI EN EL SÈRUM	125
C.7.2. ANÀLISI EN EL CÒRTEX RENAL.....	126
C.8. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA D'ECA EN CÒRTEX RENAL	127
VI. DISCUSSIÓ.....	129
A. CARACTERITZACIÓ DE LES NOVES LÍNIES NOD.ACE2 ^{-/-} i NOR.ACE2 ^{-/-}	130
B. ESTUDI DE L'HOMEOSTASI DE LA GLUCOSA I DE LA INSULINA.....	131
C. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA	135
VII. CONCLUSIONS.....	141
VIII. LIMITACIONS I NOVES PERSPECTIVES.....	143
IX. BIBLIOGRAFIA	145

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi és també fruit de l'entusiasme i la feina de molta gent...

Agraeixo als meus directors de tesi tot el què he après amb ells al llarg d'aquests anys i que m'ha ajudat a créixer tant en la vessant científica com la personal. Al Dr. Julio Pascual por ofrecerme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por tu pragmatismo. A la Dra. M^aJosé Soler per aportar visió clínica i sentit crític en tot moment. A la Dra. Marta Riera per la visió biològica, capacitat de treball així com l'ajuda durant el dia a dia al laboratori.

Als companys de grup amb qui he treballat, après i compartit vivències dins i fora del laboratori: Judit, Eva, Sergi, Guillem, Lidia, Marta, Budour i Vanesa. Moltes gràcies pel suport a la poïata, l'estabulari, amb l'SPSS... Per aguantar-me les dèries i les ofuscacions. Per fer el camí més fàcil.

Al Dr. Javier Gimeno del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar, por tu predisposición y ayuda.

Al tot el personal de l'estabulari del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (en especial als tècnics de la sala 60.21: Júlia, Sindy, Marc).

...però també ho és dels que han format part de la meva vida aquests darrers anys, aquells als qui no he parat de donar la tabarra...

A tres sols: a la Jordina, pisinmate a qui mai podré agrair prou estar allà en els pitjors moments però també en els millors. A la Núria, per cuidar-me tant sempre i perquè sense tu no sé què faria. A la Mireia, perquè sí, y lo sabes.

A 66% restant dels Eskins, l'Eva i l'Efrén. Pel suport incondicional en tots els àmbits. Perquè només amb vosaltres puc compartir moments tant únics com surrealistes pel plaer de divagar.

Als Bioguapos: Annita, Joan A, Moni, Olalla, Amado, Marc, Ernest, Lauryns, Roma, Pao, Txell i Lai. Pels dinars de Nadal, tertúlies polítiques, partides del Risk, zumba i llocs secrets que us fan tant especials. Per ser uns epicureistes nats.

Als Superhullahops: Sònia, Laura, Gemma, Lucía, Alba, Oriol, Martina, i Anna. No era ahir quan intentàvem entendre els excels dels horaris de la uni? Simplement per poder gaudir amb vosaltres 12 anys més (sempre que no sigui fent esquí de fons...).

Als Amics de Can Trocal per tots els festivals haguts i per haver. Per gaudir de la bona vida amb l'excusa del surf, l'snow, l'escalada, els karts, l'enduro...

A les Big Wednesday i les Yasu per donar-ho tot al camp les nits de dimecres. I al Volleyblots, pels sets batallats fins al final.

Al grup d'Anàlisi Comparativa de Sistemes de Desenvolupament del Dr. Jaeger i a la Bàrbara. I especialment als qui no vaig parar d'atabalar: Karl, Damjan, Astrid i Anna.

A quatre persones que estan acomplint els seus somnis (i no sempre és fàcil). Malgrat la distància, a l'Arnau i en Pol, dos amics especials. Per ser els primers que vaig conèixer a la carrera i dos grans científics. Per les converses que sempre agrairé. A la Maria i la Cris, perquè ara sou lluny però, per sort, sempre ens quedarà Dixi.

A l'Eli, per totes les coses en comú que hem anat descobrint. Gràcies per cada una de les vegades que he pogut comptar amb tu. A la Jo i la Rita per l'ajuda amb els pàncrees. Al Miquel, l'Àlex i al Toch per tots els esmorzars i dinars (i els cafès pendents...). Al Robert, per tot el teu positivisme. Al Joaquín per arrancar-me sempre un somriure. A la Sandra pels teus útils consells. A la futura Dra. Amorós (for sure my dear!). Al Pituku, pels seus sabios. A la Yoko, amb qui és com si no passessin els anys. A la Mariona, la millor professora que mai he pogut tenir (dues vegades).

Als Alsedà-Creus per haver-me acollit tant i tant bé.

A la meva família. La d'aquí, tiets Modest i Matilde, padrí Rafael i Connie, Sefa i Carlos. La d'allà. Xièxie to my dearest far far away family: Ku Deh, Kimin, Sheng Wei and Sheng Rui. I la que està a mig camí. Al Berenguer. Perquè estic molt orgullosa tu i, perquè encara que el dia a dia ens absorbeixi, mai em falles. Als meus pares, als que admiro. Per l'estima i els valors que em transmeteu. Per els consells i suport que m'oferiu. Per fer pinya i ajudar-me en tot, sempre.

Al Roger. Per creure incondicionalment en mi. Per tots aquells moments en què, malgrat no entendres res, has decidit recolzar-me i continuar pedalant amb mi. Pels moments en què riem a ple pulmó. Per ser el millor company de viatge.

...moltes gràcies!

**PARTICIPACIÓ EN CONGRESSOS DERIVADA DEL TREBALL
DE LA TESI DOCTORAL**

PARTICIPACIÓ EN CONGRESSOS DERIVADA DEL TREBALL DE LA TESI DOCTORAL

- **H Roca-Ho**, M Riera, M Rebull, J Pascual, MJ Soler. Deletion of *ace2* gene impairs glucose homeostasis in NOD mice. 52nd European Renal Association – European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress. London (United Kingdom), May, 2015.

AJUDES REBUDES

AJUDES REBUDES

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada gràcies a les següents ajudes:

- Ajut del Fons d'Investigació Sanitària de l'Institut Carlos III (FIS/ISCIII 2011).
"Actividad sérica del ECA2 en pacientes diabéticos con Enfermedad Renal Crónica. Efecto de la delección del ECA2 en la nefropatía diabética experimental." Gener 2011- Novembre 2013.

- Beca per a realitzar la tesi doctoral en el projecte "Efecte de la deleció del gen de l'eca2 en el model experimental de diabetis tipus 1 en el ratolí NOD." de la FIMIM - FUNDACIÓ IMIM. Desembre de 2010 – Novembre 2012.

- Ajut per a la finalització de tesis doctorals de la Fundació IMIM, 2015.

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ADN	àcid desoxiribonucleic	ECA2/ACE2	enzim convertidor d'angiotensina 2
AGE	productes avançats de la glicosilació	EDTA	àcid etildiamintetraacètic
Agt	angiotensinogen	EEM	error estàndard de la mitja
Akt	proteïna quinasa B	ELISA	assaig per immunoabsorció lligat a enzims
Alb	albúmina	eNOS	sintasa de l'òxid nítric endotelial
Ang-(1-7)	angiotensina 1-7	ERG-1	proteïna de resposta al creixement inicial 1
Ang-I	angiotensina 1	EUA	excreció urinària d'albúmina
Ang-II	angiotensina 2	FBS	sèrum fetal boví
AP-1	proteïna activadora 1	FG	filtrat glomerular
ARB	bloquejants dels receptors d'angiotensina	FITC	isotiocianat de fluoresceïna
ARN	àcid ribonucleic	g	grams
ARNm	ARN missatger	GAPDH	gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa
ATR1	receptor d'angiotensina 1	GLUT-2	proteïna transportadora de glucosa 2
ATR2	receptor d'angiotensin 2	H/E	hematoxilina-eosina
AUC	àrea sota la corba	HFD	dieta rica en greixos
BCA	àcid bicinconínic	HHL	histidil-hipuril-leucina
BSA	albúmina sèrica bovina	HRP	peroxidasa del rave
CoV	coronavirus	HTA	hipertensió arterial
Crea	creatinina	HZ	heterozigot
C_T	cicle llindar	iECA	inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina
C-terminal	carboxi-terminal	IL-1β	interleucina 1 β
DAB	3,3'-diaminobenzidina	i.p.	intraperitoneal
dL	decilitres		
DM	diabetis mellitus		
dNTP	desoxinucleòtid trifosfat		
DPX	distirè-tricresil fosfat- xilol		
ECA	enzim convertidor d'angiotensina		

JAK	quinases janus	nm	nanòmetres
kDa	quilodalton	nM	nanomolar
Kg	quilograms	NOD	no obès diabètic
KO	knockout	NOR	no obès resistent
LPE	lliure de patògens específics	NOS	sintasa de l'òxid nítric
M	molar	NS	no significatiu
MAPK	proteïna quinasa activada per mitògens	N-terminal	amino-terminal
MBG	membrana basal glomerular	NZO	Nova Zelanda obès
MCP-1	proteïna de quimioatracció de monòcits 1	p38	proteïna MAPK 38
ME	microscòpia electrònica	PA	pressió arterial
MEC	matriu extracel·lular	PAD	pressió arterial diastòlica
Mg	mil·ligrams	PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
MHC	complex major d'histocompatibilitat	PAM	pressió arterial mitja
mL	mil·lilitres	PAP	pressió arterial del pols
mm	mil·límetres	PAS	àcid periòdic Schiff
mM	mil·limolar	PAS	pressió arterial sistòlica
mmHg	mil·límetres de mercuri	pb	parell de bases
MRC	malaltia renal crònica	PCR	reacció en cadena de la polimerasa
MSA	estàndard d'albumina de ratolí	PI3K	fosfotinositol 3 cinasa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat	PKC	proteïna quinasa C
ND	nefropatia diabètica	POD	peroxidasa
NF-κB	factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades	PS	pèptid senyal
ng	nanograms	PVDF	polifluorur de vinilidè
		qPCR	PCR quantitativa
		QSP	quantitat suficient per
		RAGE	receptors dels AGE
		rI32	proteïna ribosomal L32
		ROS	espècies reactives d'oxigen

SARS	síndrome respiratori agut sever	TM	transmembrana
SD	dieta estàndard	TMB	tetrametilbenzidina
SDS	dodecil sulfat de sodi	TUNEL	marcatge de l'extrem lliure terminal amb desoxi-uridina trifosfat per desoxi-transferasat terminal
SRA	sistema renina angiotensina	U	unitats
STAT	transductors de la senyal i activadors de la transcripció	VEGF	factor de creixement vascular endotelial
STZ	estreptozotocina	WB	western Blot
TaqPol	polimerasa <i>Thermus aquaticus</i>	WT	wild-type
TBE	tris-borat-EDTA	WT-1	tumor de Wilm-1
TBS	Tris salí tamponat	µg	micrograms
TBS-T	Tris salí tamponat-Tween20	µL	microlitres
TFG	taxa de filtració glomerular	µm	micròmetres
TGF-β	factor de creixement transformant beta	µM	micromolar
		µm²	micròmetres quadrats

RESUM

L'enzim convertidor d'angiotensina (ECA) promou la formació de l'angiotensina II (Ang-II). Contràriament, l'ECA2, una monocarboxipeptidasa que presenta un 40% d'homologia amb l'ECA, degrada l'Ang-II (accions vasoconstrictores) a angiotensina 1-7 (Ang-(1-7) (accions vasodilatadores). L'eix ECA2/Ang-(1-7) desencadena accions oposades a les de l'eix ECA/Ang-II. A nivell clínic, el tractament amb inhibidors de l'ECA i/o bloquejants dels receptors d'angiotensina en pacients amb nefropatia diabètica (ND) ha demostrat disminuir l'albuminúria i frenar la progressió cap a malaltia renal crònica (MRC). Donat aquest fet i que l'ECA2 és un regulador negatiu del sistema renina angiotensina (SRA), hipotetitzem que la manca d'ECA2 contribuirà a un augment de l'aparició de la diabetis i a una major progressió de la ND en un model experimental espontani de diabetis tipus 1, la soca no obesa diabètica (NOD). Amb aquesta finalitat s'ha generat la nova línia de ratolins NOD.ACE2^{-/-} i els respectius controls. L'estudi de la diabetis en els animals NOD.ACE2^{-/-} s'ha observat: 1) viabilitat, fertilitat i, fenotípicament, una alteració de la coloració del pelatge i menor pes corporal, 2) major aparició de diabetis acompanyada d'una alteració en l'homeòstasi de la glucosa i 3) augment en la sensibilitat a la insulina exògena. En l'estudi de la ND, els animals NOD.ACE2^{-/-} mostren: 1) hipertrofia glomerular, expansió de la matriu mesangial i pèrdua podocitària sense alteracions en la filtració glomerular ni l'albuminúria, 2) menor activitat renal cortical d'ECA. En resum, la manca d'ECA2 en la soca NOD contribueix a un empitjorament en l'homeòstasi de la glucosa i de la insulina així com alteracions estructurals a nivell del glomèrul que inclouen: augment de l'àrea glomerular, expansió de la matriu mesangial i pèrdua podocitària.

Angiotensin converting enzyme (ACE) promotes angiotensin II (Ang II) formation. Conversely, ACE2, a monocarboxipeptidase that shares 40% homology with ACE, degrades promotes angiotensin 1-7 (Ang- (1-7) (vasodilator actions) formation from Ang-II (vasoconstrictor actions). ACE2/Ang-(1-7) axis actions opposite ACE/Ang-II axis actions. ACE inhibitors and/or angiotensin receptor blockers treatment in patients with diabetic nephropathy (DN) have shown to blunt albuminuria progression to chronic kidney disease (CKD). Given this and the fact that ACE2 acts as a negative regulator of the renin angiotensin system (RAS), we hypothesize that ECA2 loss contribute to an increase in diabetes development and a greater progression of DN in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes, the non obese diabetic (NOD) mice. With this aim, we have generated a new experimental model, the NOD.ACE2^{-/-} mice and their respective controls. The study of diabetes onset in NOD.ACE2^{-/-} showed: 1) viability, fertility and, phenotypically, a change in coat color and lower body weight, 2) higher diabetes incidence accompanied by altered glucose homeostasis and 3) increase in exogenous insulin sensitivity. Within the DN study, NOD.ACE2^{-/-} mice showed: 1) glomerular hypertrophy, mesangial matrix expansion and podocyte loss without changes in glomerular filtration rate nor albuminuria, 2) lower renal cortical activity. In summary, loss of ACE2 in the NOD strain contributes to a glucose homeostasis and insulin impairment involving structural alterations within the glomerulus, including: increased glomerular area, mesangial matrix expansion and podocyte loss.

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

A. NEFROPATIA DIABÈTICA

A.1. DEFINICIÓ

La nefropatia diabètica (ND) és el dany renal degut a diabetis mellitus (DM), tipus 1 (DM tipus 1) o tipus 2 (DM tipus 2), que clàssicament s'ha definit per la pèrdua de proteïna per l'orina (Gross et al. 2005). Es tracta, doncs, d'una complicació microvascular amb repercussió estructural i funcional a nivell renal.

La ND és la principal causa de malaltia renal crònica (MRC) i de mortalitat cardiovascular en els països occidentals (Cooper 1998; Gross et al. 2005; Gilbertson et al. 2005). A Catalunya segons les dades recollides pel Registre de Malalts Renals del 2012, la majoria dels pacients que inicien teràpia renal substitutiva presenten malaltia diabètica renal (Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT) 2012). Les dades recollides a nivell d'Espanya per l'estudi EPIRCE (Epidemiologia de la Insuficiència Renal Crònica a Espanya) demostren que aproximadament el 10% de la població pateix MRC. En pacients amb hipertensió o DM la prevalença de la MRC augmenta fins al 35-40% (Otero et al. 2010).

A.2. SIMPTOMATOLOGIA CLÍNICA

La història natural de la ND presenta una evolució gradual. En una fase inicial apareixen hiperfiltració i hipertrofia renal. Posteriorment, es progressa cap a una ND incipient, que es caracteritza per la detecció d'albumina en orina (microalbuminúria) determinada per valors en l'excreció urinària d'albumina (EUA) d'entre 30 i 299 mg d'albumina/gr de creatinina persistents en almenys dues ocasions. D'allí, s'evoluciona cap a una ND establerta en la què els valors d'EUA es situen per sobre dels 300mg/gr (macroalbuminúria) (Gross et al. 2005). En una fase final, el pacient acaba progressant cap a una insuficiència renal amb una clara disminució de la taxa de filtració glomerular (TFG) que condueix a la MRC terminal.

A més d'aquestes alteracions funcionals, en la progressió de la ND també s'han descrit una sèrie d'alteracions estructurals a nivell renal (Schena & Gesualdo 2005):

- En un estadi inicial de la malaltia, s'observa un augment de la membrana basal glomerular (MBG), seguida d'acumulació progressiva i gradual de matriu extracel·lular (MEC) al mesangi.

- Posteriorment i a mesura que avança la ND, també apareixen alteracions estructurals addicionals com la formació de nòduls mesangials i lesions tubulointersticials.

La progressió de la malaltia però, no condueix de manera ràpida cap a la MRC sinó que es tracta d'un procés que es desenvolupa de forma larvada (Cooper 1998). L'evolució natural de la ND es va categoritzar l'any 1987 en una sèrie d'estadis successius (Mogensen 1987) encara vigents, tal i com s'exposa a la **Taula 1**.

ESTADI ND	DESIGNACIÓ	CARACTERÍSTIQUES	CANVIS ESTRUCTURALS	TFG (mL/min)	EUA (mg/g)	PA (mmHg)
1	Hiperfuncionalitat	hipertròfia i hiperfiltració	hipertròfia glomerular	>150	<30	normal
2	Silent	normoalbuminúria	hipertròfia glomerular, engruiximent de la MBG i expansió de la matriu mesangial	~150	<30	normal
3	ND incipient	microalbuminúria	hipertròfia glomerular, engruiximent de la MBG i expansió de la matriu mesangial severes	~130	30-299	elevada
4	ND establerta	macroalbuminúria	hipertròfia glomerular general	<100	>300	hipertensió
5	Urèmia	fallada renal: insuficiència renal crònica terminal	glomeruloesclerosi (tancament glomerular), atròfia tubular, fibrosi intersticial	0-10	>300	hipertensió

Taula 1.- Estadis de la ND. La taula exposa els diferents estadis, característiques, canvis estructurals i valors líndar de TFG, EUA i pressió arterial (PA) descrits per cada un d'ells. Taula modificada de Mogensen (1987).

L'estadi 1 es caracteritza per una hiperfuncionalitat renal deguda a una hiperfiltració glomerular que s'acompanya d'hipertròfia glomerular. A mesura que el dany avança, es detecten un seguit de canvis estructurals englobats en l'estadi 2 o silent, que inclouen hipertròfia glomerular, engruiximent de la MBG, expansió de la matriu mesangial causades per la presència de dipòsits de matriu extracel·lular i una lleugera expansió en l'interstici tubular. Aquestes alteracions es troben de manera més severa en l'estadi 3 o de ND incipient. En aquest estadi s'observen canvis en la TFG i en la EUA, situant-se en el rang de la microalbuminúria (30-299mg/g). La microalbuminúria té un important valor predictiu en el desenvolupament d'una proteïnúria manifesta, sobre tot en la DM tipus 1. En l'estadi 4 o de ND establerta, els valors de la EUA se situen en el rang de la macroalbuminúria, per sobre de 300mg/gr. L'augment de l'albuminúria s'acompanya d'una clara disminució en els valors de la TFG i d'un augment de la pressió arterial (PA). Finalment, l'estadi 5 o d'urèmia, es caracteritza per una fallada renal que condueix a una insuficiència renal crònica terminal. A nivell estructural s'observa glomeruloesclerosi, atròfia tubular i fibrosi intersticial. A nivell funcional hi ha una caiguda dràstica en els valors de la TFG

(principal indicador de fallada renal) comportant la necessitat de programes de diàlisi o de transplantament renal del pacient (Mogensen et al. 1983; Cooper 1998).

A.3. ETIOLOGIA

La diabetis es defineix com un estat d'hiperglicèmia crònica. Es coneix que la presència de nivells de glucosa permanentment elevats provoquen danys a llarg termini en diferents òrgans. Per tant, tot i que no s'ha designat un mecanisme clar, es creu que els processos dependents de glucosa són una de les causes principals de l'establiment i progressió de la ND (Gross et al. 2005; Fioretto & Mauer 2007).

No obstant, altres factors com la genètica i l'ètnia (Seaquist et al. 1989; Iyengar et al. 2007), la presència d'hipertensió arterial (HTA), la dislipèmia i l'hàbit tabàquic dels pacients també són factors de risc importants en la progressió de la malaltia (Gall et al. 1997; Freedman et al. 2007).

A.4. FISIOPATOLOGIA

S'ha postulat que la ND és el resultat de la interacció entre factors metabòlics i hemodinàmics en la microcirculació renal en un estat d'hiperglicèmia crònica (Cooper 1998). Per tant, la glucosa i els processos dependents de la glucosa hi juguen un paper clau. A nivell molecular s'ha comprovat que la hiperglicèmia afavoreix: (i) la producció de productes avançats de la glicosilació (AGE), (ii) l'activació de la via del polioliol (Dunlop 2000), (iii) la proteïna quinasa C (PKC) (Derubertis & Craven 1994) i (iv) la síntesi d'angiotensina II (Ang-II) mitjançant l'activació del sistema renina angiotensina (SRA) (Yoo et al. 2007). La via del polioliol s'activa en resposta a nivells elevats de glucosa intracel·lular amb l'objectiu de metabolitzar la glucosa a sorbitol per acció de l'enzim aldosa reductasa (AR). El sorbitol és convertit al seu torn en fructosa per acció de l'enzim sorbitol deshidrogenasa (SDH). Tant els AGE, a través de la interacció amb el seu receptor (RAGE), com la via del polioliol s'ha vist que promouen la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (Coughlan et al. 2009; Chung et al. 2003). Addicionalment, en presència d'elevats nivells de glucosa, aquestes ROS poden ser produïdes també a través de l'activació de l'activitat mitocondrial i la producció de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) (Etoh et al. 2003). Se sap que aquests mecanismes no només actuen cascada avall si no que també interaccionen entre ells. No obstant, encara no s'ha pogut establir una hipòtesi

unificadora consensuada sobre com es produeixen aquestes interaccions (Brownlee 2001). L'excés de ROS activa un seguit de vies de senyalització (entre les que s'inclouen MAPK, p38, PI3K/Akt i JAK) que confluiran en activar els factors de transcripció NF- κ B, AP-1, STAT i EGR1 (Chin et al. 2001; Lu et al. 2009). En darrera instància s'iniciarà, principalment, la transcripció del factor de creixement transformant beta (TGF- β), una citoquina pro-fibròtica que juga un paper clau en els desenvolupament de la ND (Cooper 1998).

Per efecte de l'activació del TGF- β , s'engruixeix progressivament la MEC i es produeix hipertròfia cel·lular a nivell glomerular i disfunció endotelial a través de l'activació del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) (Kumar et al. 2012). A mesura que la malaltia avança, s'observen els canvis estructurals característics de la ND establerta com ara glomeruloesclerosi, atròfia tubular i fibrosi tubulointersticial que, finalment, condueixen a una fallada de la funció renal (**Figura 1**).

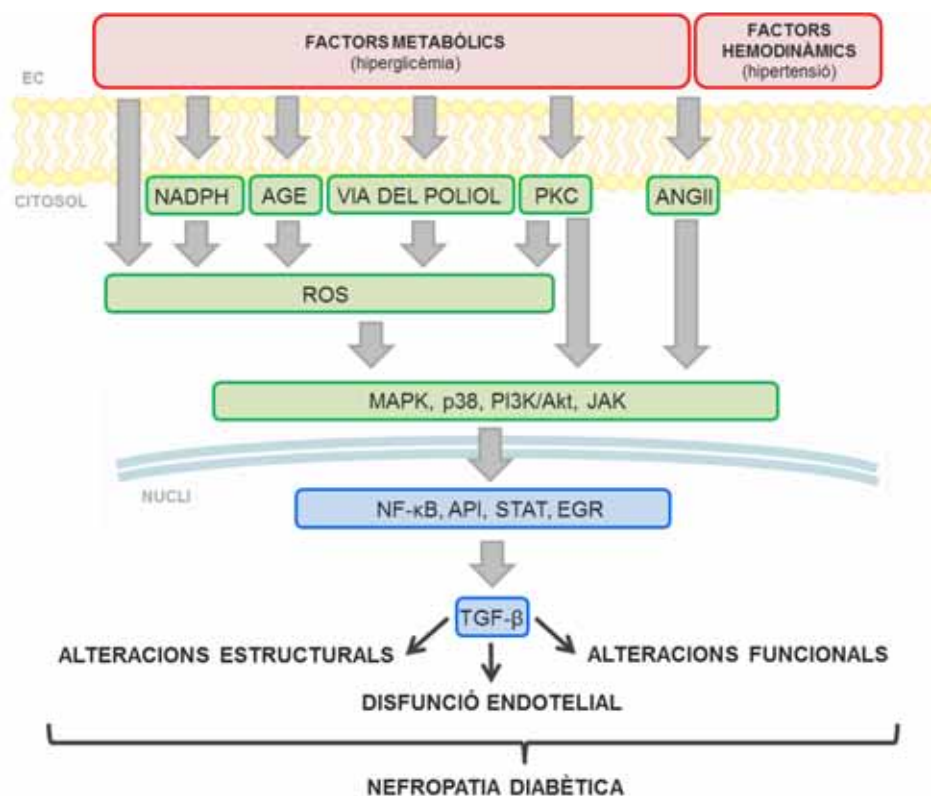


Figura 1.- Esquema dels principals mecanismes moleculars implicats en la fisiopatologia de la ND. En una situació d'hiperglicèmia, els factors metabòlics i hemodinàmics extracel·lulars activen mecanismes moleculars a nivell intracel·lular. En última instància, l'activació de la transcripció del TGF- β constitueix un dels efectors principals dels canvis estructurals observats en la ND.

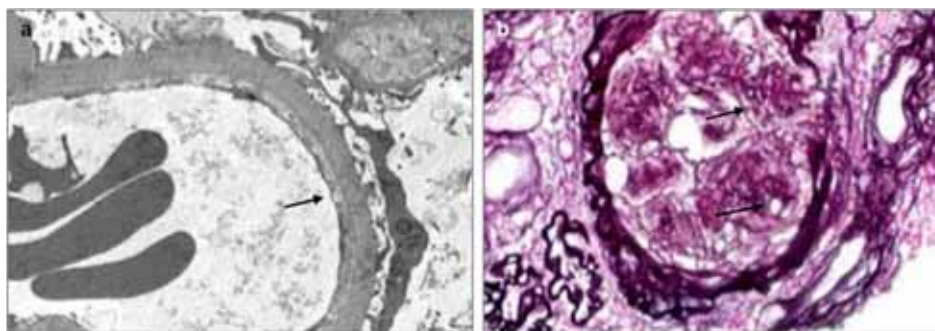
A.5. HISTOLOGIA

El grup del Dr. Tervaert, mitjançant l'estudi de biòpsies humanes en pacients afectes de ND, estableix una classificació estandarditzada dels principals canvis estructurals a nivell glomerular i els correlaciona amb una sèrie de criteris per a la caracterització del grau de severitat de les lesions histològiques renals (Tervaert et al. 2010) (**Taula 2**).

CLASSE	DESCRIPCIÓ	CRITERIS D'INCLUSIÓ
I	Canvis lleugers o no específics descrits per microscòpia òptica o electrònica - engruïment de la MBG comprovat	- Les biòpsies no reuneixen cap dels criteris descrits en la classificació II, III o IV - MBG >395nm en dones i >430nm en homes a partir dels 9 anys d'edat
Ila	Expansió lleugera de la matriu mesangial	- Les biòpsies no reuneixen els criteris descrits en la classificació III o IV - Expansió lleugera en >25% del mesangi observat
Ilb	Expansió severa de la matriu mesangial	- Les biòpsies no reuneixen els criteris descrits en la classificació III o IV - Expansió severa en >25% del mesangi observat
III	Esclerosi nodular (lesió Kimmelstiel-Wilson)	- Les biòpsies no reuneixen els criteris descrits en la classificació IV - Descripció d'una lesió Kimmelstiel-Wilson convincent com a mínim
IV	Glomeruloesclerosi diabètica avançada	- Les biòpsies reuneixen els criteris descrits en la classificació de la I a la III - Esclerosi glomerular global en >50% dels glomèruls observats

Taula 2.- Classificació dels principals canvis estructurals glomerulars que es donen en la ND segons el grau de severitat. Taula modificada de Tervaert et al. 2010.

Els canvis histològics inicials inclouen un engruïment de la MBG, hipertròfia glomerular i una lleugera expansió del mesangi. A mesura que la patologia progressa, es produeix una expansió severa de la matriu mesangial i, en un estadi més avançat, una esclerosi nodular que cursa amb la presència de nòduls de Kimmelstiel-Wilson (**Imatge 1**). Els nòduls glomerulars consisteixen en àrees amb marcada expansió mesangial o hialinosi en forma de cabdells ovals d'aspecte fibril·lar amb absència de nuclis que contribueixen a una pèrdua de la funció glomerular a més d'una compressió dels capil·lars associats al glomèrul (Fioretto & Mauer 2007). Més enllà de les lesions estrictament glomerulars, també s'han descrit lesions a nivell de la vasculatura renal, caracteritzades per un progressiu engruïment de les parets capil·lars per deposició de hialina (hialinosi) i, a nivell tubular, englobant fibrosi intersticial i atròfia tubular (Tervaert et al. 2010).



Imatge 1.- Exemples representatius de les lesions histològiques de la ND establerta en humans. a) Engruiximent de la MBG (fletxa negra) en una imatge de microscòpia electrònica (ME). b) Nòduls de de Kimmelstiel-Wilson (fletxa superior) i hialinosi arteriolar (fletxa inferior) identificables per tinció positiva intensa amb metenamina de plata. Figura modificada de Soler et al. (2012).

B. MODELS EXPERIMENTALS DE NEFROPATIA DIABÈTICA

B.1. CRITERIS DE VALIDACIÓ

Existeixen pocs models murins en l'actualitat amb capacitat per a reproduir la ND que s'observa en humans (Soler et al. 2012; Ortiz et al. 2015). Amb finalitat d'unificar criteris es va crear el Diabetic Complications Consortium (<http://www.diacomp.org/>) per part del National Institute of Health dels Estats Units d'Amèrica. El consorci proposa tres criteris principals per a la validació de soques aptes com a models de ND (**Taula 3**):

- I) una disminució major del 50% en la TFG durant la vida de l'animal
- II) un augment 10 vegades superior en els valors d'albuminúria en comparació als animals del grup control aparellats per edat i gènere
- III) presència de canvis histopatològics que inclouen: avançada expansió de la matriu mesangial, esclerosi nodular i mesangiòlisi, engruiximent de la MBG de més del 50% en comparació al basal mesurat per tècniques de microscòpia electrònica, hialinosi arteriolar en qualsevol grau i fibrosi tubulointersticial

CRITERIS DE VALIDACIÓ	Referents a la funció renal	
1	TFG disminuït >50% durant la vida de l'animal	
2	Albuminúria augmentada >10 vegades en comparació als controls de la soca (aparellats per edat i sexe)	
3	Referents a la patologia renal	
	Patologia glomerular	Avançada expansió de la matriu mesangial ±mesangiòlisi i esclerosi nodular
	Patologia vascular	Esclerosi mesangial (augment >50% volum mesangial)
	Patologia tubulointersticial	Hialinosi arteriolar Fibrosi tubulointersticial

Taula 3.- Criteris de validació funcionals i estructurals per a l'establiment de models murins de ND experimental. Taula modificada del Diabetic Complications Consortium.

Com ja s'ha esmentat i malgrat els esforços del consorci, no existeix actualment cap model que reuneixi els tres punts descrits. Per tant, a l'hora de treballar amb models murins de ND, cal enfocar els criteris de validació com a objectius a assolir i no pas com a condicions requerides (Brosius et al. 2009). Així, sembla necessària la creació de nous models que s'apropin més a la ND en humans. En aquest sentit, recentment han aparegut models amb modificacions de la via NOS en diabetis tipus 1 i tipus 2 on les lesions histològiques són més evidents (Soler et al. 2012).

B.2. MODELS MURINS DE NEFROPATIA DIABÈTICA: DIABETIS MELLITUS TIPUS 1

Els models murins de ND en ratolins que imiten la diabetis tipus 1 es poden subcategoritzar entre espontanis, induïts farmacològicament i modificats genèticament segons les característiques dels animals a l'hora de desenvolupar la malaltia (**Taula 4**).

B.2.1. MODELS ESPONTANIS

No obès diabètic (NOD): es tracta d'un model de ratolins que desenvolupen espontàniament una DM de característiques molt similars a la DM tipus 1 en humans. Es tracta del model espontani de DM tipus 1 més extensament estudiat (Kong et al. 2013). Es va obtenir casualment durant l'obtenció d'una línia de ratolins propensos al desenvolupament de cataractes a partir de la línia exogènica Jcl:ICR (Makino et al. 1980). La soca NOD endogàmica presenta una autoimmunitat d'origen poligènic que afecta gens del MHC i que provoca una destrucció progressiva de les cèl·lules β pancreàtiques per insulinitis, amb un inici a les 3-4 setmanes de vida (Atkinson & Leiter

1999). Una altra característica rellevant d'aquest model és la variable franja d'edat en que pot aparèixer la diabetis. La hiperglicèmia en el model NOD té un marcat dimorfisme sexual amb a una major taxa d'aparició de la diabetis en femelles, que és d'un 80% aproximadament a les 30 setmanes d'edat, en comparació als mascles, que és d'un 20% (Makino et al. 1980). A nivell renal s'ha demostrat que presenten albuminúria, hipertrofia glomerular i expansió de la matriu mesangial així com alteracions estructurals en el túbul proximal (Maeda et al. 2003; Riera et al. 2014). Un dels principals problemes de la soca és la necessitat de la teràpia amb insulina per sobreviure durant un període perllongat de temps (Kong et al. 2013). A més, s'ha demostrat que la proliferació com l'expansió de la matriu mesangial es produeixen a través de l'activació del TGF β i AGEs amb un mecanisme molt semblant al dels humans (Sharma & Ziyadeh 1994; He et al. 2000). Malgrat l'absència d'una soca control estàndard, existeixen una sèrie de models establerts que es poden comparar a la soca NOD. Algunes de les soques lliures d'insulinitis i diabetis útils com a controls són: NOR/Lt, NON/Lt, NOD-*scid* i ICR (Leiter 2001).

Insulin-2 Akita: aquest model presenta una mutació autosòmica dominant en el gen *Ins-2* causant un mal plegament de la insulina. La insulina mal plegada és tòxica per les cèl·lules β pancreàtiques i, conseqüentment, la capacitat dels illots per secretar insulina es veu disminuïda, desenvolupant DM tipus 1 (Yoshioka et al. 1997). Es tracta doncs d'una alternativa a la toxicitat inespecífica causada per l'estreptozotocina (model que s'explica amb detall més endavant). Els animals presenten hiperglicèmia (detectada en menor grau en femelles) i una discreta albuminúria (Fujita et al. 2001; Kong et al. 2013). A nivell renal, s'ha descrit un augment de la matriu mesangial i engruiximent de la MBG sense presència de mesangiòlisi ni esclerosi nodular mesangial. La mutació inicialment originada en la soca C57BL/6 està descrita en diferents fons, que poden fer variar el fenotip renal (Gurley et al. 2010).

B.2.2. MODELS INDUÏTS FARMACOLÒGICAMENT

Estreptozotocina (STZ): es tracta d'un dels models d'inducció de DM tipus 1 més extensament emprats. El seu mecanisme d'acció és el següent: l'estreptozotocina entra a la cèl·lula a través de la unió al transportador GLUT-2 on actua com a agent alquilant, induint danys a l'ADN i provocant l'apoptosi per acumulació de ROS. Tot i que presenta citotoxicitat inespecífica, actua preferentment en les cèl·lules β dels illots de Langerhans degut a l'elevada expressió de GLUT-2 que presenten (Szkudelski

2001). És un model àmpliament emprat en el fons C57BL/6, però també s'ha reportat el seu ús en d'altres soques (Wolf et al. 1984). El model de diabetis per STZ presenta lesions a nivell renal com hipertròfia glomerular, expansió de la matriu mesangial (en grau variable en funció de la soca murina), hialinosi arteriolar o glomeruloesclerosi nodular, només en algunes soques amb major susceptibilitat (Wolf et al. 1984). És, per tant, un model de toxicitat pancreàtica àmpliament establert, estudiat i reproduïble que presenta danys similars a la ND descrita en humans (Kong et al. 2013). Existeixen dues formes estandaritzades per induir DB amb estreptozotocina. Un protocol a dosi alta consistent en una sola dosi de 150-200mg/Kg que pot presentar toxicitat no específica (com per exemple nefrotoxicitat) i un protocol d'administració a dosis baixes que consisteix en injeccions de 40-60mg/Kg en 5 dies consecutius. Aquest últim té l'avantatge de presentar menor nefrotoxicitat renal directa, però també s'acompanya d'una menor taxa d'aparició de diabetis i menys dany renal (Breyer et al. 2005). En conclusió, malgrat que requereix ser ajustat en funció de la soca, la inducció de diabetis per STZ és un bon model per estudiar les lesions renals provocades per diabetis.

B.2.3. MODELS INDUÏTS PER MODIFICACIÓ GENÈTICA

OVE26: es tracta d'un model murí modificat genèticament sobre un fons FVB. Els ratolins desenvolupen dany pancreàtic per sobreexpressió del transgen de calmodulina regulat pel promotor d'insulina (Epstein et al. 1989). El model presenta albuminúria, augment de la PA i disminució de la TFG, factors que s'ha vist que es desenvolupen de manera similar a la ND en humans. No obstant, els animals presenten una elevada taxa de mortalitat i la necessitat de la teràpia amb insulina per sobreviure durant un període prolongat (Brosius et al. 2009). A nivell de lesions renals, s'ha observat un augment de la mida glomerular i una expansió nodular i difusa de la matriu mesangial, expansió de la MBG, glomeruloesclerosi nodular i atròfia tubulointersticial amb presència de fibrosi i infiltrats mononuclears (Zheng et al. 2004).

TIPUS	MODEL	MECANISME	MANIFESTACIONS CLÍNiques	HISTOPATOLOGIA RENAL
ESPONTANIS	NOD	Autoimmunitat d'origen poligènic que afecta gens del MHC i provoquen una destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques.	Hiperglicèmia, albuminúria, polidipsia i poliúria.	Hipertròfia glomerular i expansió de matriu mesangial. Alteracions estructurals en el túbul proximal.
	Insulin-2 Akita	Mutació autosòmica dominant en el gen <i>Ins-2</i> que causa mal plegament de la insulina.	Hiperglicèmia, discreta albuminúria, polidipsia i poliúria.	Augment de la matriu mesangial i engruiximent de la MBG, sense presència de mesangiòlisi ni esclerosi nodular mesangial.
INDUÏTS	Estreptozotocina	Toxicitat pancreàtica per administració d'un agent alquilant	Hiperglicèmia, albuminúria, polidipsia i poliúria.	Hipertròfia glomerular. Expansió de la matriu mesangial (el grau varia en funció de la soca). Hialinosi arteriolar o glomeruloesclerosi nodular només en algunes soques.
MODIFICATS GENÈTICAMENT	OVE26	Dany pancreàtic per sobreexpressió del transgen de calmodulina regulat pel promotor d'insulina.	Hiperglicèmia, albuminúria, elevada PA i disminució del TFG.	Hipertròfia glomerular i expansió de matriu mesangial. Expansió de la MBG, glomeruloesclerosi nodular, atròfia túbul-intersticial (presència de fibrosi i infiltrats mononuclears). Augment de PA.

Taula 4.- Resum dels principals models murins de ND degut a DM tipus 1 i les seves característiques.

B.3. MODELS MURINS DE NEFROPATIA DIABÈTICA: DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

Existeixen diferents models en DM tipus 2 que es poden classificar en espontanis, induïts i modificats genèticament (**Taula 5**).

B.3.1. MODELS ESPONTANIS

LepR^{db}/LepR^{db} (db/db): Obtinguda originalment en la soca C57BLKS, es tracta d'una mutació autosòmica recessiva en el gen del receptor de leptina, encarregat de regular la sensació de sacietat (Hummel et al. 1966). Malgrat que és la primera mutació descrita en ratolins que reproduïx un fenotip de DM tipus 2 en humans, cal esmentar que les mutacions en el receptor de Leptina constitueixen una causa rara d'obesitat i DM tipus 2 a nivell de la població. S'ha observat que el model presenta obesitat, hiperglicèmia i albuminúria, però no lesions estructurals renals a les 8

setmanes d'edat (Ye et al. 2006). A partir de les 16 setmanes però, l'estudi histopatològic renal revela hipertròfia glomerular, expansió de la matriu mesangial i engruiximent de la MBG sense presentar mesangiòlisi ni esclerosi mesangial nodular (Lee & Bressler 1981). Es tracta d'un model àmpliament emprat en l'estudi de la nefropatia diabètica i l'obesitat mòrbida en la DM tipus 2 (Soler et al. 2012).

Lep^{ob}/Lep^{ob} (ob/ob): Els ratolins ob/ob presenten una mutació autosòmica recessiva en el gen de la leptina (Chua et al. 1996). Aquest model existeix en diferents soques com C57BL/6J, DBA2/J i FVB, presentant obesitat, hiperglicèmia i albuminúria però lleus efectes en la funció renal (Chua et al. 2002). Per aquest motiu, actualment està en desús (Soler et al. 2012).

Agouti: Es tracta d'un model basat en la mutació en el gen *agouti* (*A^y*) que afecta al pelatge i la regulació del pes corporal, provocant obesitat, DM tipus 2 i un fenotip de pèl groguenc en la soca KK. Els animals presenten hiperglicèmia, albuminúria, hipertriglicèrdèmia i uropatia obstructiva (Okazaki et al. 2002). A nivell renal, presenta hipertròfia glomerular, expansió de la matriu mesangial entre lleu i moderada i glomerulonefritis segmentària progressiva (Ito et al. 2006). Amb l'edat però, desenvolupen espontàniament hidronefrosi, pelvis dilatada i atròfia parenquimatososa, fet pel qual no s'utilitza per a l'estudi de la ND avançada (Ninomiya et al. 1999).

New Zealand Obese (NZO): A diferència dels models monogènics anteriorment esmentats, el model de ratolins NZO és una soca endogàmica seleccionada per obesitat d'herència poligènica que es manifesta només en mascles (Kanasaki & Koya 2011). S'ha observat que els animals NZO desenvolupen proliferació glomerular, dipòsits mesangials, engruiximent lleu de la MBG, glomeruloesclerosi que cursa amb presència de nòduls eosinofílics en alguns glomèruls, hialinosi i inflamació arteriolar ocasional. La soca NZO presenta hiperglicèmia i albuminúria i també certa predisposició a la malaltia autoimmune ja que s'han detectat característiques de nefritis lúpica i no només per diabetis (Melez et al. 1980), pel que no es un model emprat en estudi de ND.

B.3.2. MODELS INDUÏTS

Dieta rica en greixos (“high fat diet” HFD): En aquest model la inducció d'obesitat i la resistència a la insulina, es realitza a través d'una dieta rica en greixos en el fons C57BL/6 (Black et al. 1998). Tot i que l'efecte de la dieta varia molt en funció

de la soca (Black et al. 1998), està considerat un bon model de ND i d'arteriosclerosi en DM tipus 2 (Schreyer et al. 1998). A nivell renal els ratolins que segueixen una dieta HFD presenten expansió mesangial i glomeruloesclerosi terminal juntament amb acumulació lipídica, infiltració per macròfags i un augment de l'estrès oxidatiu (Deji et al. 2009).

B.3.3. MODELS INDUÏTS PER MODIFICACIÓ GENÈTICA

eNOS^{ko} / db/db: Resulta de creuar animals db/db de la soca C56BL/KS amb animals deficients per la sintasa endotelial de l'òxid nítric (eNOS^{ko}) (Zhao et al. 2006). Els animals presenten obesitat, hiperglicèmia, hipertensió, albuminúria i disminució de la TFG (Inagi et al. 2006). Es tracta d'un model potent per a l'estudi de la ND ja que presenta lesions típiques de ND avançada: expansió de la matriu mesangial, engruiximent de la MBG, hialinosi arteriolar, mesangiolisi, microaneurismes, glomeruloesclerosi nodular segmental i focal, nòduls Kimmelstiel-Wilson, acumulació de fibronectina glomerular, fibrosi tubulointersticial mínima.

BTBR^{ob/ob}: Recentment s'ha descrit la mutació ob/ob en la soca BTBR (Clee et al. 2005). El model presenta un fenotip de ND molt semblant a la humana: dany glomerular, expansió mesangial i mesangiolisi i pèrdua podocitària amb augment progressiu de l'albuminúria amb l'edat. Es tracta doncs, d'una soca molt atractiva per a l'estudi de la ND en DM tipus 2 (Hudkins et al. 2010).

TIPUS	MODEL	MECANISME	MANIFESTACIONS CLÍNIQUES	HISTOPATOLOGIA RENAL
ESPONTANIS	db/db	Mutació en el gen del receptor de la leptina que afecten la sensació de sacietat.	Obesitat, hiperglicèmia, poliúria, polidipsia, polifàgia i albuminúria.	Hipertròfia glomerular, expansió de la matriu mesangial i engruiximent de la MBG.
	ob/ob	Mutació en el gen de la leptina.	Obesitat, hiperglicèmia, polifàgia i albuminúria.	Efectes lleus en l'estructura renal.
	Agouti (KK-A ^y)	Mutació en el gen agouti que afecta al pelatge i el pes corporal provocant obesitat i DM2.	Hiperglicèmia, albuminúria, hipertriglicèridèmia i uropatia obstructiva.	Hipertròfia glomerular, expansió de la matriu mesangial entre lleu i moderada i glomerulonefritis segmental progressiva.
	NZO	Inducció d'obesitat i diabetis per herència poligènica.	Hiperglicèmia i albuminúria.	Proliferació glomerular, dipòsits mesangials, engruiximent lleu de la MBG, glomeruloesclerosi, presència de nòduls eosinofílics en alguns glomèruls, hialinosi i inflamació arteriolar ocasional. Característiques de nefritis per lupus.
INDUÏTS	HFD	Inducció d'obesitat i resistència a la insulina a través d'una dieta alta en greixos.	Hiperglicèmia, albuminúria i síndrome metabòlic.	Expansió mesangial i glomeruloesclerosi terminal. Acumulació lipídica, infiltració (macròfags), augment de l'estrès oxidatiu.
MODIFICATS GENÈTICAMENT	eNOS ^{-/-} / db/db	Creuament db/db amb eNOS ^{-/-} .	Obesitat, hiperglicèmia, hipertensió, poliúria, polidipsia, polifàgia, albuminúria i disminució del TFG.	Expansió mesangial, engruiximent de la MBG, hialinosi arteriolar, mesangiòlisi, microaneurismes, glomeruloesclerosi nodular segmental i focal, nòduls Kimmelstiel-Wilson, acumulació de fibronectina glomerular, fibrosi túbul-intersticial mínima.
	BTBR ^{ob/ob}	Creuament de la soca BTBR amb ob/ob.	Hiperglicèmia, hipertriglicèridèmia, polifàgia i albuminúria progressiva amb l'edat	Dany glomerular, expansió mesangial i mesangiòlisi i pèrdua podocitària progressius

Taula 5.- Resum dels principals models murins de ND en DM tipus 2 i les seves característiques.

C. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

C.1. GENERALITATS

El sistema renina angiotensina (SRA) consisteix en una cascada hormonal amb implicacions en la regulació de la pressió arterial sanguínia així com en l'homeòstasi dels fluids i els electròlits en l'organisme (Peach 1977).

El sistema tal i com s'ha descrit clàssicament, s'inicia quan la renina, un enzim proteolític sintetitzat a l'aparell juxtaglomerular renal, s'allibera a la circulació general en resposta a vasodilatació, nivells baixos de sodi i a l'augment de l'activitat simpàtica (Marcus et al. 2013). La renina trenca l'angiotensinogen (Agt) produint el decapeptid angiotensina I (Ang-I). Aquesta Ang-I serà degradada a l'octapeptid angiotensina II (Ang-II) per acció d'una dicarboxipeptidasa coneguda com a enzim convertidor d'angiotensina (ECA) (**Figura 2**). L'Ang-II, principalment a través de la seva unió als receptors d'angiotensina de tipus 1 (AT1R) exerceix una sèrie d'accions a curt i llarg termini que es citen a continuació (Ruggenti et al. 2010).

Entre les accions a curt termini s'enumeren:

- a) Constricció de les cèl·lules de la musculatura vascular llisa de les arterioles.
- b) Reabsorció de sodi a nivell dels túbuls renals.
- c) Estimulació de la secreció d'aldosterona.
- d) Augment de la resposta simpàtica.

Altres efectes a llarg termini inclouen:

- a) Estimulació de la fibrosi, proliferació i diferenciació cel·lular.
- b) Inflamació.
- c) Apoptosi.
- d) Generació de ROS.
- e) En última instància, la inhibició de l'alliberament de la renina al torrent circulatori.

Els inhibidors d'ECA (iECA) i els bloquejants dels AT1R (ARB) han demostrat les importants implicacions que té el SRA a nivell cardiovascular i en la fisiopatologia de la malaltia renal d'origen diabètic (Brenner et al. 2001; Lewis et al. 1993). Estudis posteriors han demostrat una important interrelació entre el sistema i patologies com la diabetis (Bindom & Lazartigues 2009; Härdtner et al. 2013) o la insuficiència respiratòria pulmonar aguda (Imai et al. 2005).

A nivell clínic, el tractament amb iECA i/o ARB en pacients amb ND ha demostrat disminuir l'albuminúria i ésser capaços de frenar la progressió de la ND a malaltia renal terminal, convertint-los en els fàrmacs d'elecció preferent (De Zeeuw et al. 2004).

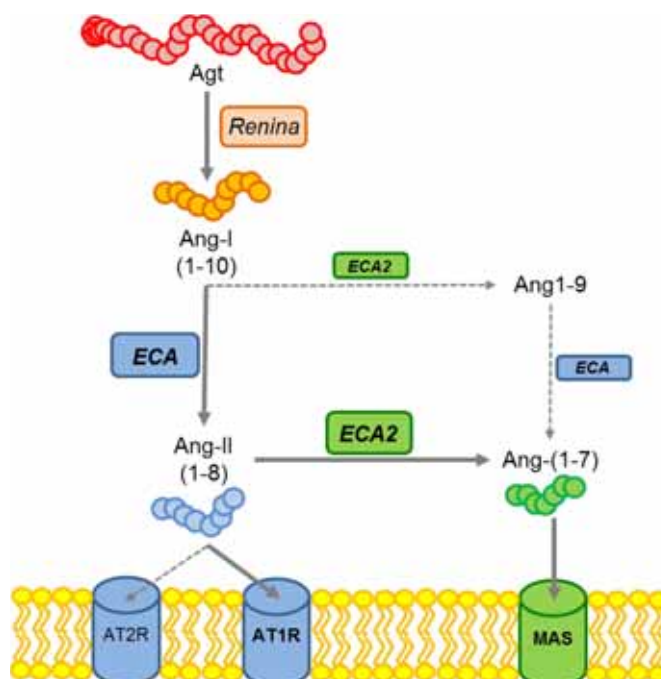


Figura 2.- Esquema general del sistema renina angiotensina i dels seus principals elements. Per acció de la renina, l'Agt es trenca a Ang-I que és degradada per ECA a Ang-II, exercint les seves accions, principalment a través del receptor AT1. L'acumulació d'Ang-II es prevé gràcies a l'acció d'ECA2 obtenint Ang-(1-7), que exercirà efectes oposats a Ang-II per unió al receptor MAS. Les fletxes contínues indiquen substrats, enzims i receptors d'acció preferencial.

Com ja s'ha comentat, el sistema es va descriure, en un principi, com una cascada endocrina circulant on els diferents components eren sintetitzats en teixits concrets però exercien efectes a nivell sistèmic. Així, inicialment la síntesi d'Agt es va restringir al fetge (Deschepper 1994), la de la renina a nivell renal (Imai et al. 1983) i la de l'ECA al pulmó (Studdy et al. 1983). No obstant en les darreres dècades s'ha demostrat la presència dels elements del SRA en diferents òrgans, donant suport a l'existència d'un SRA tissular (Leung 2007). Per tant, hi ha evidències clares sobre l'existència d'un SRA local amb accions paracrines, autocrines i intracrines independents de la funció

reguladora sobre la PA i l'homeòstasi dels fluids corporals que coexisteix i interactua via endocrina amb un SRA sistèmic circulant (Astin et al. 2013; Paul et al. 2006).

C.2. ENZIM CONVERTIDOR D'ANGIOTENSINA (ECA2)

L'any 2000, amb l'objectiu de trobar l'enzim responsable de la formació de l'Ang-(1-7), es van realitzar estudis genòmics per obtenir seqüències homòlogues a l'ECA a partir d'una llibreria d'ADN codificant procedent d'un ventricle de cor humà amb insuficiència cardíaca. D'entre les 19000 seqüències obtingudes, es va clonar el gen de l'enzim convertidor d'angiotensina 2 (ECA2) codificant per un pèptid biològicament actiu i amb un 42% d'identitat amb el domini catalític de l'ECA, suggerint-ne un origen per duplicació a partir d'un ancestre comú. Mitjançant l'anàlisi de l'expressió gènica es va determinar que l'ECA2 s'expressava específicament en l'endoteli cardíac, el ronyó i en menor mesura en els testicles (Donoghue et al. 2000). Estudis realitzats posteriorment sobre la distribució tissular de l'ARN missatger (ARNm) en ratolins i rates han determinat també la presència d'ECA2 en d'altres òrgans com el pulmó, la bufeta urinària, l'estómac, l'ili, el còlon, el tronc de l'encèfal i el teixit adipós (Gembardt et al. 2005; Hamming et al. 2004; Rivière et al. 2005) (**Figura 3**).

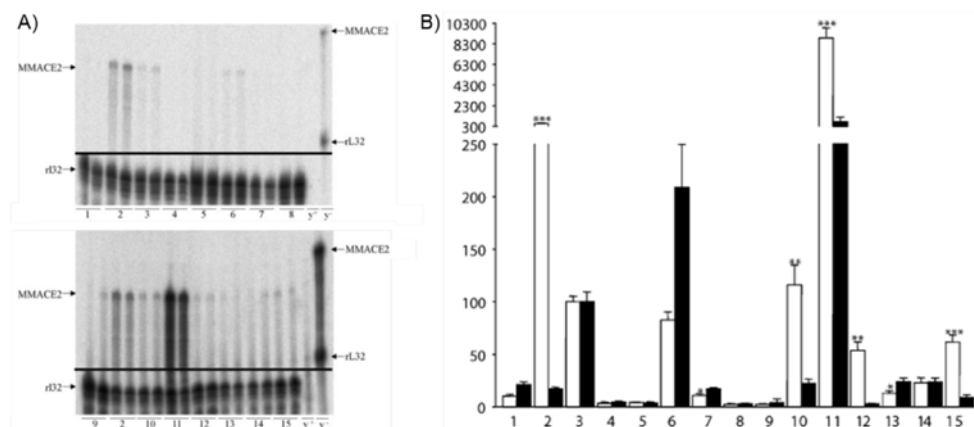


Figura 3.- Estudi de l'expressió de l'ARNm en diferents teixits de ratolí. A) Resultats de l'RNAse protection assay en diferents teixits de ratolins de la soca C57BL/6. A l'esquerra: bandes específiques de l'ARNm d'ECA2 i de rL32 (control). A la dreta: expressió de les sondes ECA2 i rL32. B) Quantificació de l'assaig de protecció de l'ARNasa en ratolí (barres blanques) i en rata (barres negres). Valors expressats en percentatge en relació a la quantificació en el pulmó establerta al 100% ($N \leq 4$). Les expressions s'han estudiat en: 1. ventricle, 2. ronyó, 3. pulmó, 4. fetge, 5. testicles, 6. bufeta urinària, 7. prosencèfal, 8. melsa, 9. tim, 10. estómac, 11.

ili, 12. còlon, 13. tronc de l'encèfal, 14. aurícula, 15. teixit adipós. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ en ratolí en comparació amb rata. Figura modificada de Gembardt et al. (2005).

S'ha identificat que el gen *eca2* en humans es troba a la banda 22 del braç p del cromosoma X (Xp22.2) (Crackower et al. 2002). En el genoma de ratolí, en canvi, tot i que també es troba localitzat cromosoma X, el locus d'ECA2 es situa a la banda F5 del braç q (Komatsu et al. 2002), entre la posició 164139332 i la 16418842Mb de la cadena + (XqF5). Com en humans, la seqüència en el genoma de ratolí consta de 19 exons, 18 d'ells codificants per l'enzim ECA2, una proteïna de 805 aminoàcids de llargada i un pes molecular de 90kDa (Tipnis et al. 2000) (**Figura 4**).



Figura 4.- Localització del gen *eca2* en el genoma de ratolí (*Mus musculus*) segons l'anotació a la base de dades Ensembl. Esquema del braç q del cromosoma X. Els diferents colors corresponen a les citobandes.

L'ECA2 es una proteïna transmembrana composta per un pèptid senyal N-terminal a la regió extracel·lular, una regió d'ancoratge a la membrana i una porció citoplasmàtica C-terminal. En la regió extracel·lular es localitza el centre actiu que conté una única seqüència HEMGH d'unió a zinc (Tipnis et al. 2000; Donoghue et al. 2000). A través d'aquest domini catalític, l'ECA2 actua com a monocarboxipeptidasa, ja que hidrolitza un sol aminoàcid de l'extrem C-terminal de l'Ang-II, afavorint la producció d'Ang-(1-7) i contrarestant així l'acció de l'eix ECA/Ang-II (Der Sarkissian et al. 2006). A través de la unió de l'Ang-(1-7) amb el receptor MAS acoblat a proteïna G, es desencadenen les accions de l'eix ECA2/Ang-(1-7), bàsicament contraposades a les de l'eix ECA/Ang-II entre les quals hi ha accions vasodilatadores i de protecció vascular, efectes anti-fibròtics, anti-proliferatius i anti-inflamatoris (Bindom & Lazartigues 2009; Santos et al. 2008) (**Figura 5**). Tot i que s'han descrit altres

substrats (apelina 13 i dinorfina A 1-13), l'Ang-II constitueix l'únic substrat amb elevada afinitat per ECA2 en el marc del SRA (Vickers et al. 2002).

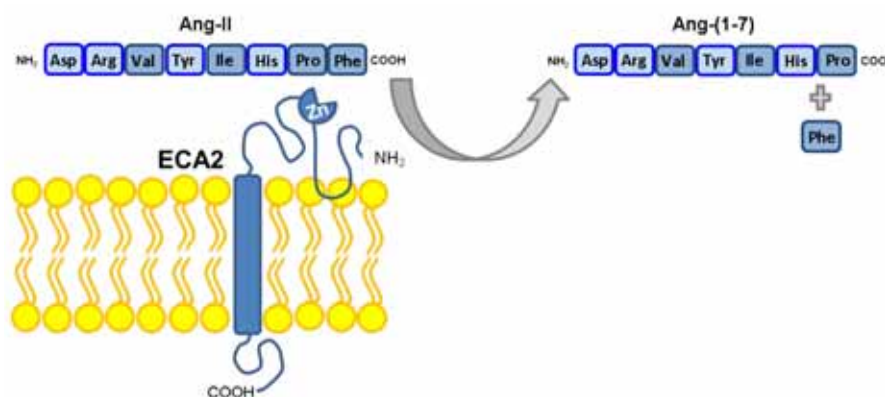


Figura 5.- Representació de l'activitat enzimàtica de la monoxipeptidasa ECA2. La fenilalanina (hidrofòbic) de l'extrem C-terminal de l'Ang-II (un octapeptid) és hidrolitzat per l'ECA2, a través del motiu HEMGH d'unió a zinc del centre actiu, alliberant Ang-(1-7).

L'ECA2 és una carboxipeptidasa amb accions principals a nivell del SRA i, per extensió, amb impacte a nivell cardiovascular i renal. No obstant, se li han atribuït altres funcions biològiques independents del SRA i que no impliquen la seva activitat enzimàtica. En primer lloc, a nivell pulmonar, l'ECA2 és un receptor funcional pel coronavirus causant de la síndrome respiratòria aguda severa (SARS-CoV). A través del domini N-terminal de l'enzim, la proteïna Spike expressada pel SARS-CoV interacciona amb ECA2, afavorint-ne l'endocitosi i la infecció (Kuhn et al. 2004). A nivell intestinal, s'ha demostrat que l'ECA2 a través del seu domini C-terminal, s'uneix al transportador d'aminoàcids B⁰AT1. D'aquesta manera ECA2 afavoreix en l'intestí l'absorció d'aminoàcids neutres provinents de la dieta, de manera similar a l'acció en el ronyó de la colectrina (Camargo et al. 2009) que és una proteïna no catalítica implicada en la reabsorció d'aminoàcids, la proliferació de cèl·lules β pancreàtiques i possiblement en l'exocitosi de la insulina (Cechova et al. 2013). En darrer lloc, altres estudis han comprovat la unió entre ECA2 i la integrina β 1 en homogenats de mostres de cor d'origen humà amb fallada cardíaca, suggerint el paper d'ECA2 en la senyalització per integrines en malalties cardiovasculars (Clarke et al. 2012).

La varietat de funcions moleculars atribuïdes a l'ECA2 s'expliquen a través de la seva estructura (**Figura 6**). D'una banda, com s'ha comentat anteriorment, ECA2

presenta un 42% d'identitat amb l'ECA en la regió N-terminal corresponent a la seqüència aminoacídica del centre actiu (Tipnis et al. 2000). D'altra banda, en el seu domini transmembrana (regió C-terminal), l'enzim mostra un 48% d'identitat amb la colectrina (Zhang et al. 2001). Per tant, ECA2 és una proteïna quimèrica que presenta una regió d'elevada homologia amb l'ECA però també una altra amb la colectrina.

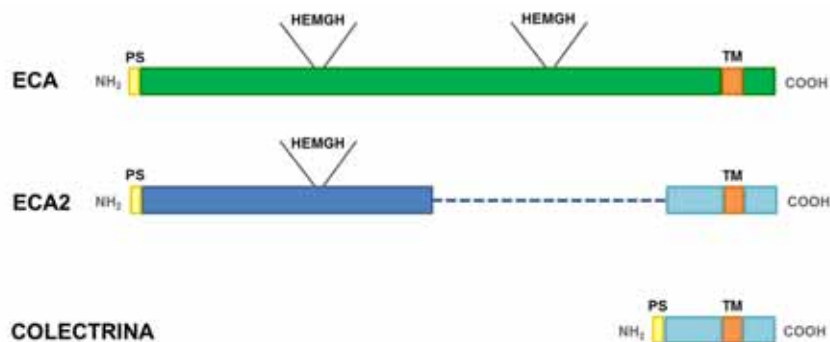


Figura 6.- Comparació dels dominis en l'ECA, l'ECA2 i la colectrina. L'ECA2 és una proteïna quimèrica amb elevada homologia amb l'ECA en la regió N-terminal i amb la colectrina en la regió C-terminal. PS= pèptid senyal, TM= domini transmembrana; HEMGH= seqüència d'unió a zinc corresponent al centre actiu. Figura adaptada de Turner & Hooper (2002).

Malgrat l'elevada similitud estructural, cal emfatitzar que l'ECA2 i l'ECA presenten una sèrie de diferències substancials (**Figura 7**). En primer lloc, ECA2 és una monocarboxipeptidasa que conté un únic domini catalític encarregat d'hidrolitzar un sol residu del seu substrat (Donoghue et al. 2000). En canvi, l'ECA és una dipeptidil carboxipeptidasa ja que conté dos centres actius idèntics encarregats d'hidrolitzar els dos darrers residus del substrat Ang-I (Yang et al. 1971). A través d'aquesta característica doncs, s'explica el fet que l'ECA2 no és susceptible a l'acció dels inhibidors de l'ECA (Turner et al. 2002). En segon lloc, com ja s'ha comentat, l'ECA2 és un enzim que regula l'activació del SRA: mentre que l'ECA afavoreix la producció d'Ang-II, ECA2 la degrada i en prevé l'acumulació (**Figura 6**).

Finalment, en relació a la distribució renal, s'ha observat que ambdues proteïnes s'expressen tant a nivell glomerular com tubular però amb un patró diferenciat. Al glomèrul s'ha observat ECA2 en mesangi i també s'ha descrit la seva col·localització amb marcadors podocitaris, mentre que l'ECA, es troba principalment a les cèl·lules endotelials (Ye et al. 2006). D'altra banda, en els túbuls renals, l'expressió d'ECA està descrita en les membranes apicals i basolaterals de les cèl·lules epitelials mentre que ECA2 es localitza preferentment a la zona luminal (Warner et al. 2005).

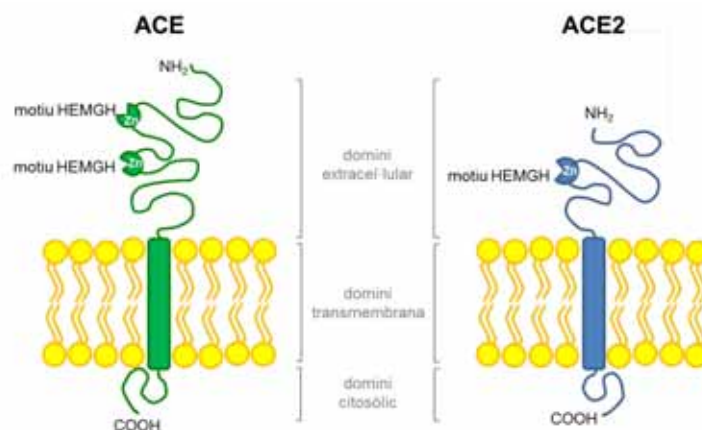


Figura 7.- Representació comparativa de l'estructura entre els enzims ECA i ECA2. ECA consta d'un domini transmembrana i dos motius HEMGH d'unió a zinc al centre actiu i ECA2 consta d'un domini transmembrana i un sol motiu HEMGH d'unió a zinc al centre actiu.

D. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL RATOLÍ NO OBÈS DIABÈTIC (NOD)

Existeixen pocs estudis enfocats en el coneixement del SRA en el model de ratolí diabètic NOD que s'exposen a continuació.

Chipitsyna i cols. estudiaren el paper de l'Ang-II en l'afectació pancreàtica i en concret en la implicació en la inflamació dels illots. Els estudis realitzats *in vivo* en el model NOD demostraren que el patró temporal d'expressió d'ECA es correlaciona amb el de la progressió amb insulinitis (**Figura 8**). Els estudis histològics realitzats demostren que existeix una col·localització entre la tinció per ECA i la del marcador d'inflamació MCP-1 (proteïna de quimioatracció de monòcits tipus 1) en cèl·lules dels illots pancreàtics. En aquest estudi es demostra que a través de la síntesi d'Ang-II s'indueix l'expressió de MCP-1 en el pàncrees (Chipitsyna et al. 2007).

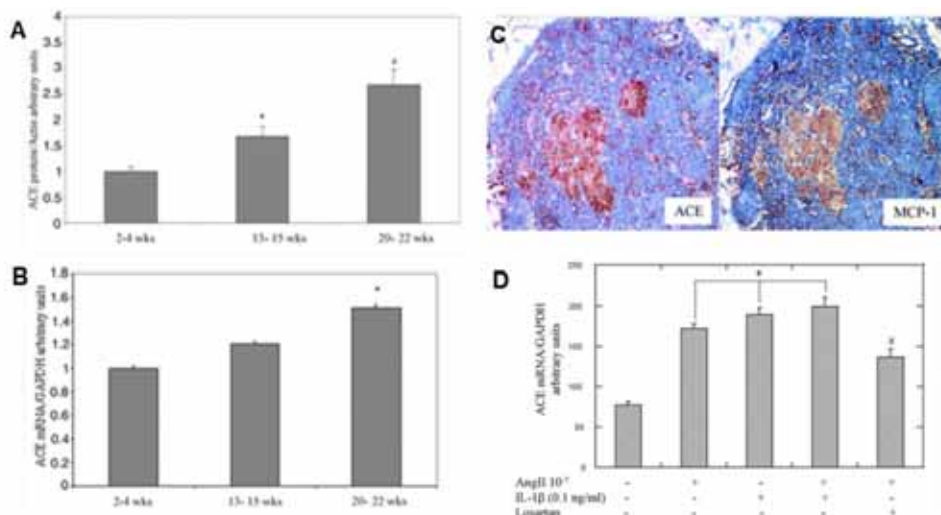


Figura 8.- Estudi de l'activació del SRA en el model NOD. A) L'expressió proteica d'ECA augmenta en el pàncrees del grup diabètic (13-15 setmanes d'edat) en comparació al no diabètic (2-4 setmanes d'edat). En el grup amb diabetis severa (20-22 setmanes d'edat) l'augment es multiplica pràcticament per 3 en comparació als no diabètics. B) L'estudi de l'expressió gènica mostra el mateix patró temporal que l'expressió proteica. C) Col·localització d'ECA i MCP-1 en el pàncrees endocrí dels animals NOD (imatges a 200 augments). D) Anàlisi *in vitro* de l'expressió gènica de MCP-1 en cèl·lules de pàncrees d'animals NOD tractats amb Ang-II, amb o sense tractament previ amb IL-1 β (un inductor de l'expressió de MCP-1 al pàncrees) i losartan (un ARB). L'Ang-II induïx l'expressió gènica de MCP-1 i es potencia per efecte de la IL-1 β . L'addició de losartan bloqueja la inducció de MCP-1 a través d'Ang-II. Figura modificada de Chipitsyna et al. (2007).

En la línia de la interacció entre diabetis i SRA, s'ha pogut establir que la teràpia amb iECA contribueix a una millora en la hipertensió i malaltia renal en humans i, fins i tot, a una prevenció del risc cardiovascular més enllà del seu impacte en el SRA (Imai et al. 2011). Aquest fet també està provat en diferents models experimentals. L'estudi de Bucci i cols. avalua les modificacions en la contractilitat vascular, la glicosúria i la poliúria, principals característiques de la diabetis en el model NOD, en resposta a la teràpia amb iECA, en concret amb zofenopril i enalapril (Bucci et al. 2008) (**Figura 9**). Els resultats mostren que en ratolins NOD diabètics, el tractament amb iECA reestableix la contractilitat vascular, disminueix el grau de poliúria i, com a tractament profilàctic, alenteix l'aparició de diabetis. En el treball també s'observen diferències en els efectes dels dos iECA estudiats degut a, probablement, la presència d'un grup

sulfhidril lipofílic en el zofenopril que n'assegura l'entrada i els efectes a llarg termini en els teixits.

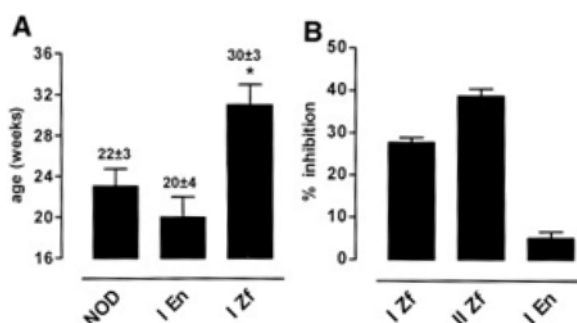


Figura 9.- Efectes de la teràpia amb iECA en la diabetis. A) Retard en l'edat d'aparició de la diabetis en el tractament amb zofenopril en comparació al grup NOD diabètic no tractat. B) Major reducció de la poliúria en els grups diabètics tractats amb zofenopril en comparació al tractat amb enalapril. Figura modificada de Bucci et al. (2008).

Més enllà de la diabetis estrictament i en referència a la ND, si bé hi ha certs estudis que detecten albuminúria en ratolins NOD (Xiao et al. 2009), poca és la informació que existeix sobre el SRA en aquesta soca per altres criteris com serien la TFG, la PA i la histopatologia. Per tant, tot i tractar-se d'un bon model de DM1 a bastament emprat en immunologia, el seu ús en nefrologia per a l'estudi de la ND no està massa estès i, en conseqüència, hi ha poca informació sobre les alteracions renals derivades de la diabetis a nivell del SRA en els ratolins NOD.

En el treball publicat per Maeda i cols. s'estudien lesions renals en la soca NOD i, tot i que no caracteritza en profunditat el SRA, analitza els nivells de renina en la progressió de la fase aguda de la diabetis (Maeda et al. 2003). Mitjançant immunohistoquímica determinen tinció positiva per renina en les cèl·lules juxtaglomerulars de l'arteriola aferent. Els resultats a 0, 10, 20, 30 i 40 dies de malaltia sense l'administració d'insulina, no mostren alteracions en l'expressió de renina, ni en intensitat ni en localització (**Figura 10**).

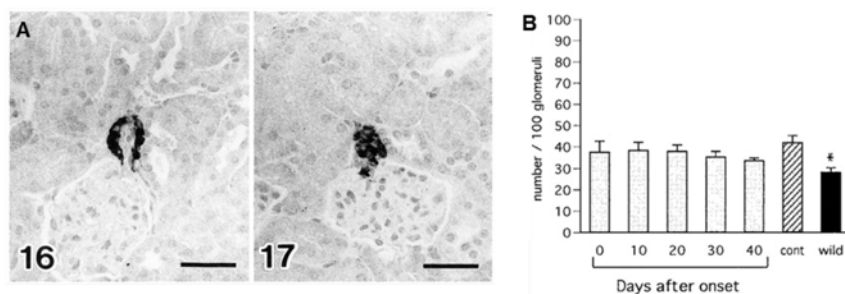


Figura 10.- Valoració de l'expressió de renina a nivell renal en la progressió de la fase aguda de la diabetis. A) Imatge representativa de la detecció de renina renal per immunohistoquímica en animals NOD després de 40 dies de diabetis (esquerra) i als 6 mesos d'edat (dreta) sense glicosúria (dreta). B) No s'observen diferències en l'anàlisi del nombre d'àrees positives per renina entre animals diabètics (a 0, 10, 20, 30 i 40 dies, barres blanques) en comparació a animals NOD no diabètics de 6 mesos d'edat (barra ratllada) i animals de la soca ICR aparellats per edat (barra negra). Figura modificada de Maeda et al. (2003).

El grup de Segev i cols. també estudia la ND en el model NOD en femelles a partir de les 12 setmanes d'edat però centrant-se, no tant en la caracterització del SRA, si no en la teràpia i, concretament, en els efectes d'anàlegs de la somatostatina en comparació als iECA, tractament estàndard de la ND (Segev et al. 2004). En aquest sentit, els resultats principals de l'estudi mostren una disminució en la hipertròfia i fibrosi renal, en la hiperfiltració i en l'albuminúria d'animals tractats. Així, com en humans, el tractament amb iECA en el model NOD aconsegueix revertir el fenotip dels criteris de ND estudiats després d'un seguiment de 4 setmanes (**Figura 11**).

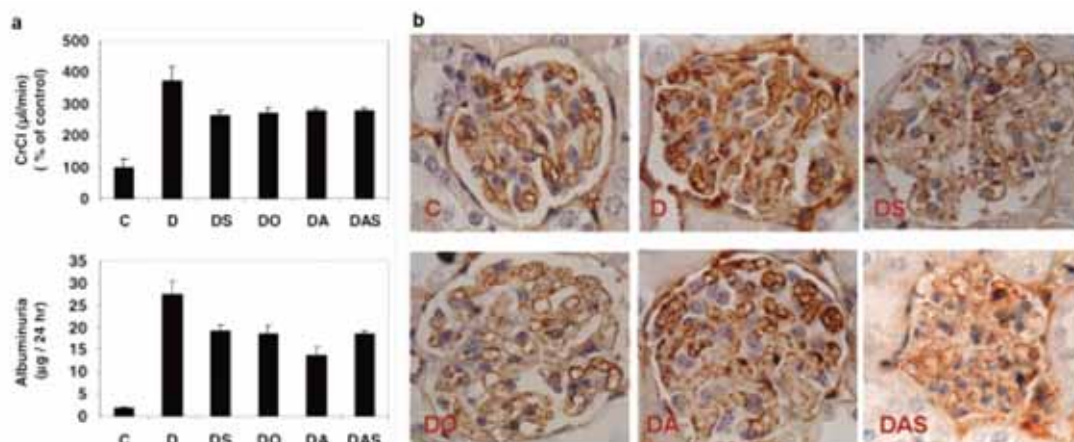


Figura 11.- Efectes del tractament amb iECA i anàlegs de la somatostatina sobre la ND. a) Anàlisi de l'aclariment de creatinina i de l'excreció d'albumina. Els valors es troben augmentats en el grup diabètic. Els diferents tractaments (dos anàlegs de la somatostatina (DS i DO), iECA (DA) i la combinació (DAS)) disminueixen el fenotip. b) Fotografies representatives de glomèruls a 400 augments amb tinció de col·lagen tipus IV (marcador de dipòsits de MEC) en el grup control (C), el diabètic (D) i en els diferents tractaments emprats (DS, DO, DA i DAS). Les teràpies (incloent iECA) aconseguixen disminuir la intensitat de la tinció. Figura modificada de Segev et al. (2004).

Un altre dels treballs que aprofundeix en la caracterització del SRA en el model NOD és el realitzat per el grup de Colucci i cols., on es valorava tant l'activitat com l'expressió proteica d'ECA en diferents teixits, i específicament en el ronyó, de femelles NOD (**Figura 12**). Els resultats obtinguts demostren un augment de l'activitat enzimàtica i l'expressió proteica de l'ECA renal en animals diabètics. La immunohistoquímica revela un augment de l'expressió d'ECA en el còrtex (túbuls proximals) en animals diabètics en comparació als controls no diabètics. També es descriu poc dany estructural sense presentar diferències en les concentracions d'Ang-I i Ang-II renals (**Figura 12**). En relació a l'ECA2, s'observa una disminució de l'expressió proteica en ronyó. Els investigadors conclouen el model diabètic NOD presenta un augment de l'ECA acompanyat d'una disminució de l'ECA2 en el ronyó, fet que contribuiria a una major lesió renal i a desencadenar una ND manifesta. No obstant el número de ratolins emprats per a la realització de l'estudi de l'expressió de l'ECA2 en ronyó no està especificat (Colucci et al. 2011). En altres models estudiats com el ratolí diabètic STZ (tipus 1) i el db/db (tipus 2) s'ha observat una disminució de l'ECA i un augment del ECA2 a nivell còrtex renal en comparació amb els controls no diabètics (Ye et al. 2006; Wysocki et al. 2006; Soler et al. 2007a).

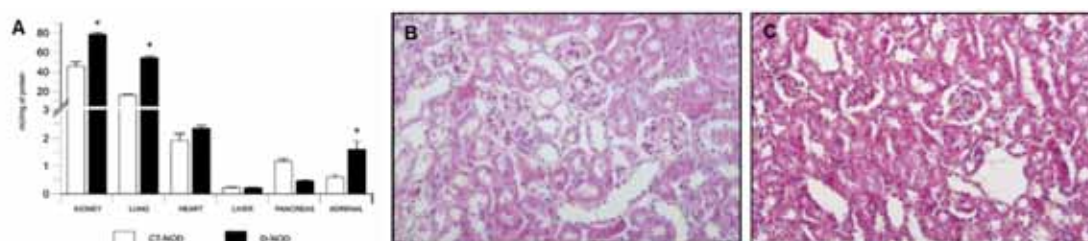


Figura 12.- Anàlisi de l'activitat ECA i de la histologia renal en animals diabètics NOD. A) Activitat enzimàtica de l'ECA entre el grup control (CT-NOD) i el grup diabètic (D-NOD) en diferents teixits. B) Histologia renal per tinció d'hematoxilina-eosina a 100 augments

en el grup CT-NOD. C) Histologia renal per tinció d'hematoxilina-eosina en el grup D-NOD. No s'observa un dany estructural evident en animals diabètics de la soca NOD. Figura modificada de Colucci et al. 2011.

L'estudi publicat recentment en el nostre grup, va més enllà i analitza detalladament l'ECA2 com a element del SRA implicat en ND tant incipient com avançada emprant el ratolí NOD (Riera et al. 2014). Donat que s'ha descrit un augment de l'activitat d'ECA2 sèrica en pacients amb DM1 i alteracions renals i cardiovasculars (Soro-Paavonen et al. 2012), en el treball s'estudia la funció renal i l'activitat de l'enzim en el sèrum i l'orina de femelles de la soca NOD així com l'efecte de l'administració d'insulina. Es van observar alteracions tant en la PA com en els indicadors de funció renal (augment en l'EUA i en la TFG) així com alteracions estructurals (disminució del nombre de podòcits, augment del mesangi i engruiximent de la MBG) en el grup diabètic. L'activitat ECA2 es va trobar augmentada en sèrum i orina així com en el còrtex renal, on l'expressió proteica també era elevada en comparació als controls. El tractament amb insulina va aconseguir revertir les alteracions secundàries a ND incipient (**Figura 13**). L'estudi conclou que el model NOD de diabetis presenta característiques corresponents a la ND incipient en humans i alteracions de l'ECA2 en sèrum i orina que es poden prevenir mitjançant l'administració d'insulina.

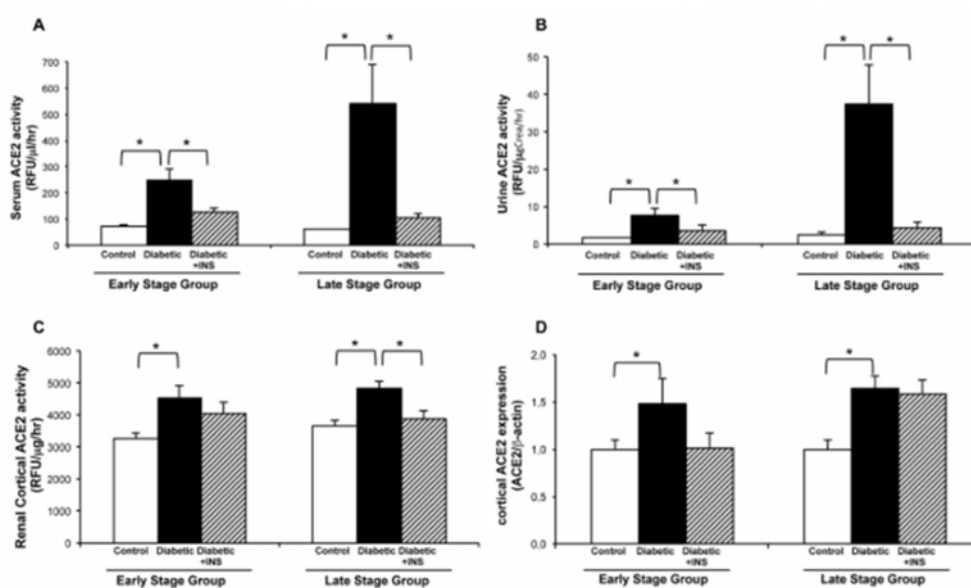


Figura 13.- Activitat enzimàtica d'ECA2 en el sèrum, orina i còrtex renal i expressió proteica en el còrtex renal de ratolins NOR, NOD i NOD tractats amb insulina als 21 i 40

dies de diabetis. S'observa un augment en l'activitat enzimàtica ECA2 en (A) sèrum, (B) orina i (C) còrtex renal i també augment de l'expressió proteica ECA2 en còrtex renal (D) en la soca NOD diabètica (barres negres) en comparació a la soca NOR control (barres blanques), tant en l'estadi de diabetis incipient com de diabetis avançada. Els efectes de la teràpia amb insulina es representen amb les barres ratllades. Figura de Riera et al. (2014).

També s'ha estudiat la implicació del SRA en altres complicacions relacionades amb la diabetis com seria la retinopatia diabètica (RD) en el model NOD. La RD és la primera causa de ceguesa en els països occidentals (Rossing 2005). Es tracta d'una complicació microvascular de la diabetis que comporta l'alteració de la circulació retinal a través de mecanismes vasoconstrictors. Donat que s'ha descrit la presència del SRA en l'ull, i que en concret l'Ang-II té accions vasoconstrictores entre d'altres, l'estudi realitzat per Lee i Harris hipotetitzava la implicació de l'Ang-II i el tromboxà en la constricció arteriolar i en la disminució del flux sanguini vascular a nivell ocular en el model NOD (**Figura 14**). Els investigadors, mitjançant l'administració de losartan (un ARB) i ozagrel (un inhibidor de la sintasa del tromboxà), conclouen, que l'acció vasoconstrictora tant de l'Ang-II com el tromboxà contribueix a les complicacions retinals en diabetis, confirmant la implicació del SRA en els mecanismes d'acció (Lee & Harris 2008).

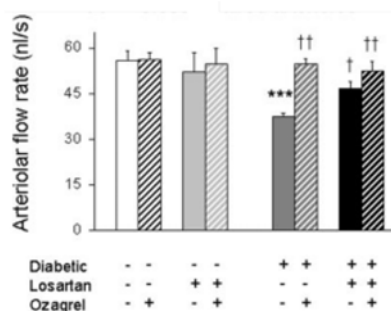


Figura 14.- Anàlisi de la taxa del flux arteriolar en la retina. En els animals diabètics hi ha una disminució significativa del flux (barra gris fosc) en comparació als controls no tractats (barra blanca). El tractament amb ozagrel (barra ratllada gris fosc), losartan (barra negra) o el combinat (barra negra ratllada) en animals diabètics reverteix amb èxit la disminució del flux arteriolar en comparació al grup diabètic (barra gris fosc). Figura modificada de Lee & Harris (2008).

E. ESTUDI DE L'ECA2 EN MODELS EXPERIMENTALS

Des de la seva identificació l'any 2000 com a un regulador negatiu del SRA (Donoghue et al. 2000), l'ECA2 s'ha proposat com una possible diana terapèutica obrint tot un nou ventall de possibilitats en el tractament tant de malalties renals com cardiovasculars. Per aquest motiu, tant la inhibició a través de fàrmacs com l'ablació genètica, han constituït una eina clau en l'estudi de l'impacte de l'ECA2 en la fisiopatologia cardiovascular i renal en models experimentals.

E.1. EFECTES DE LA DELECCIÓ DEL GEN *eca2* EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Es coneix que el SRA és un dels reguladors principals de la PA. Ja que l'ECA2 es va descriure per primera vegada en ronyó i en cor, s'ha especulat en un possible paper rellevant d'ECA2 a nivell cardiovascular.

L'any 2002, el grup de Crackower i cols. presenta el primer estudi en ratolins (en un fons mixt derivat de les soques 129/SvEV i C57BL/6) amb delecció del gen de l'*eca2* en la regió del centre actiu (Crackower et al. 2002). En l'estudi, els investigadors demostren que els mascles de la soca C57BL/6 ECA2 *knockout* als 6 mesos d'edat presenten una disminució en la funció contràctil cardíaca i en la PA acompanyada d'un lleuger aprimament de les parets i un augment en les dimensions de la cambra ventricular. Malgrat aquestes observacions, no es reporten signes d'hipertròfia i/o fibrosi cardíaca (**Figura 15**).

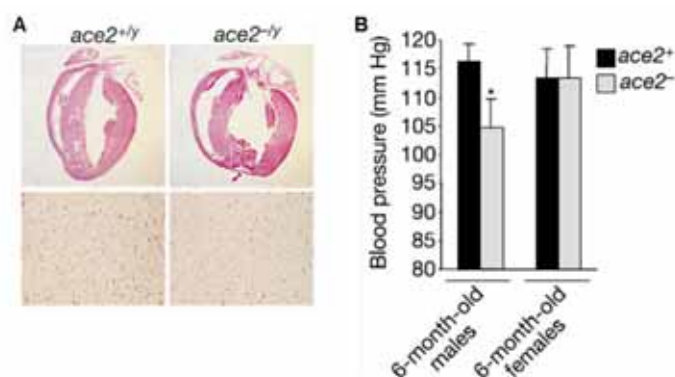


Figura 15.- L'absència d'ECA2 en ratolins provoca defectes en la contractilitat cardíaca en mascles als 6 mesos d'edat. A) Panells superiors: seccions de cor tenyides amb hematoxilina/eosina mostren un engruiximent de la paret ventricular en animals ECA2ko.

Panells inferiors: absència de fibrosi intersticial en els animals *ECA2ko*. B) Els múscles *ECA2ko* als 6 mesos d'edat presenten disminució significativa de la PA. Figura modificada de Crackower et al. (2002).

Posteriorment, el grup de Yamamoto i cols. genera un nou model *knockout* per *ECA2* a través de la deleció de l'exó 3 en ratolins derivats de les soques 129/SvEV i C57BL/6. Els investigadors observen un fenotip cardíac diferent al descrit pel grup de Crackower i cols., sense observar diferències en la funció contràctil ni en la morfologia cardíaca entre les 12 i les 14 setmanes d'edat. L'estudi va més enllà i, a través de la tècnica de la constricció transversal de l'aorta (TAC) valora l'efecte de la deleció de l'*ECA2* en resposta a una sobrecàrrega de pressió com a model d'insuficiència cardíaca. En absència d'*ECA2*, els ratolins presenten un augment de la hipertròfia cardíaca i una major mortalitat per congestió pulmonar en comparació als animals controls (**Figura 16**). Per tant, segons els investigadors, l'absència d'*ECA2* no mostra un paper rellevant en la regulació normal de la funció cardíaca, però sí que influeix en el desenvolupament d'hipertròfia cardíaca i en la reducció de la contractilitat cardíaca en resposta a una sobrecàrrega de la pressió (Yamamoto et al. 2006).

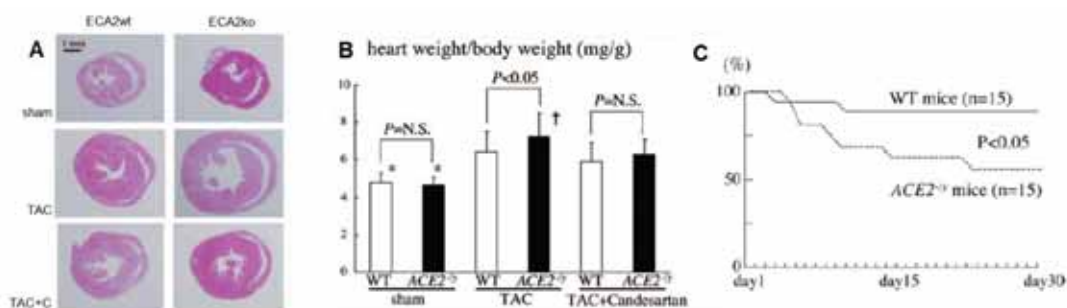


Figura 16.- Efecte de la deleció de l'*ECA2* en un model de sobrecàrrega de la pressió cardíaca. A) Seccions de cor tenyides amb hematoxilina/eosina. Després de la TAC els animals *knockout* presenten un engruïment de la paret i dilatació de la cambra ventricular, no observable en condicions normals (panells superiors). El tractament amb l'ARB candesartan (TAC+C) atenua el fenotip post-TAC (panells inferiors). B) Quocient pes cor/pes corporal com a índex d'hipertròfia cardíaca. Els animals *knockout* presenten major hipertròfia després de la TAC. C) Anàlisi de la mort cardíaca a través de la corba Kaplan-Meyer. Els animals *knockout* presenten més mort per fallada cardíaca. Figura modificada de Yamamoto et al. 2006.

Paral·lelament, el grup de Gurley i cols. generà una tercera línia de ratolins *knockout* per ECA2 també a partir de la deleció de la seqüència del centre actiu tant en les soques congèniques 129/SvEV i C57BL/6 com en diferents cohorts en un fons mixt entre 129/SvEV i C57BL/6. Els resultats a les 24 setmanes d'edat mostren que, contràriament a les dades recollides per Crackower i cols., no s'observen signes rellevants d'hipertròfia ni alteracions en la funció cardíaca en cap de les tres línies estudiades. En l'estudi de la PA, s'observa un augment significatiu en la pressió arterial en els animals *knockout* per ECA2 en la cohort d'animals amb un fons mixt i en la soca C57BL/6 (**Figura 17**). És interessant mencionar que amb la infusió d'Ang-II s'observà un increment significatiu de la PA en els ratolins *knockout* per ECA2 independent de la soca estudiada. L'anàlisi conjunta dels resultats suggereix que el paper d'ECA2 a nivell cardiovascular és el de regulador de la PA a través del metabolisme de l'Ang-II (Gurley et al. 2006).

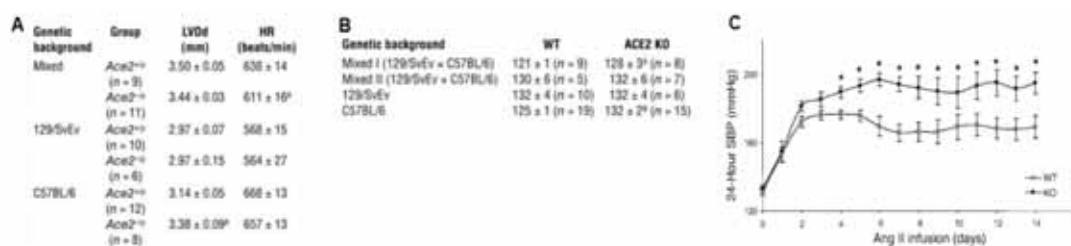


Figura 17.- Troballes ecocardiogràfiques i de PA en animals ECA2 knockout. A) Valors ecocardiogràfics obtinguts en ratolins conscients. S'observen diferències significatives en els animals *knockout* pel que fa al diàmetre diastòlic del ventricle esquerre (LVDd) en el fons mixt i en la freqüència cardíaca (HR) en el fons C57BL/6. Altres paràmetres que es van avaluar sense obtenir diferències entre els grups estudiats són: el diàmetre sistòlic del ventricle esquerre, la paret intraventricular, la paret posterior, el temps d'ejecció, la fracció d'escurçament, la massa del ventricle esquerre i la velocitat mitjana de l'escurçament de la circumferència de la fibra. **B)** Valors de PA obtinguts entre els grups estudiats. S'observa un augment significatiu en els animals *knockout* en la cohort d'animals de fons mixt i en el fons C57BL/6. **C)** Mesures continuades de la PA en animals *knockout* (cerques negres) en comparació als *wild-type* (cerques blancs). Abans de la infusió d'Ang-II els valors de PA eren similars en ambdós grups. Durant la infusió d'Ang-II la PA augmenta significativament en el grup *knockout* en comparació al *wild-type*. * $p < 0,05$. Figura modificada de Gurley et al. (2006).

E.2. EFECTES DE LA INHIBICIÓ I LA DELECIÓ DEL GEN *eca2* EN LA NEFROPATIA DIABÈTICA

Els estudis d'inhibició s'han realitzat principalment mitjançant l'administració de MLN-4760, un inhibidor específic de l'ECA2 no reversible. S'ha demostrat que la inhibició farmacològica de l'enzim comporta una major proteïnúria i dany glomerular i tubular en ratolins diabètics (Ye et al. 2006; Soler et al. 2007).

L'estudi realitzat per Soler i cols. en un model de DM tipus 1 per estreptozotocina en la soca C57BL/6J mostra com la inhibició de l'ECA2 amb MLN-4760 condueix a un augment de l'albuminúria i a lesions estructurals com ara expansió de la matriu mesangial glomerular (Soler et al. 2007). La diabetes induïx un augment de l'expressió d'ECA al glomèrul i als vasos renals que s'amplifica amb la inhibició d'ECA2 fent pensar que les alteracions estructurals i funcionals en animals diabètics amb inhibició d'ECA2 es deuen a un possible augment de l'expressió d'ECA i la conseqüent acumulació d'Ang-II (**Figura 18**).

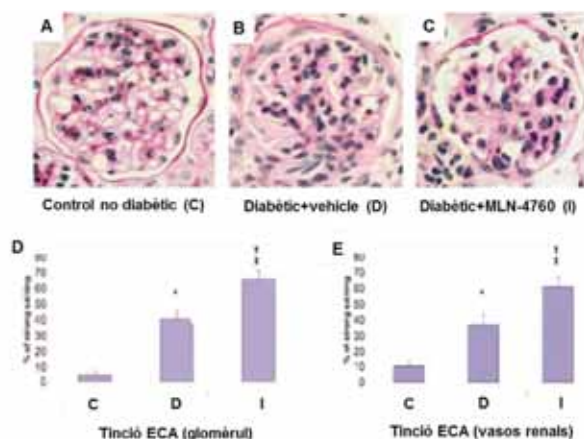


Figura 18.- Anàlisi histològica renal de la inhibició farmacològica de l'ECA2. A,B,C) Anàlisi de seccions renals amb tinció amb periodic acid-Schiff (PAS). Els animals diabètics mostren lesions renals en comparació als controls. Aquestes lesions s'accentuen per l'administració de l'inhibidor selectiu d'ECA2 (MLN-4760). D,E) Augment del percentatge de tinció ECA al glomèrul i als vasos renals respectivament en diabètics i en diabètics tractats amb MLN-4760. Figura modificada de Soler et al. (2007).

Així mateix, també s'ha estudiat l'efecte de la inhibició del ECA2 en el ratolí db/db, un model de DM tipus 2 (Ye et al. 2006). Els animals tractats amb MLN-4760 mostren

un augment de l'albuminúria i un augment en marcadors de fibrosi, tant en controls com en animals diabètics (**Figura 19**).

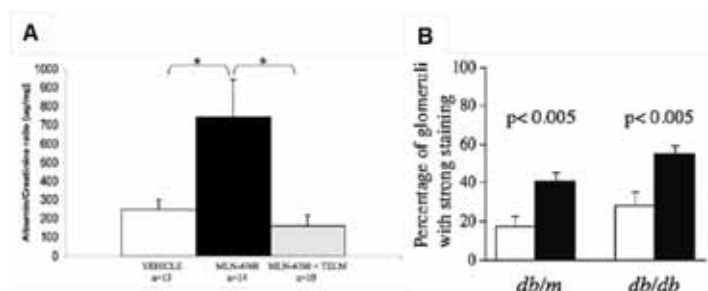


Figura 19.- Valoració de l'EUA i el grau de fibrosi en animals db/db tractats amb l'inhibidor de l'ECA2 MLN-4760. A) S'observa un augment del quocient albúmina/creatinina en animals diabètics tractats amb MLN-4760 (barra negra) en comparació als diabètics no tractats (barra blanca). El tractament amb telmisartan, un ARB, reverteix l'augment en el grup amb MLN-4760 (barra gris). B) Percentatge de glomeruli tenyits amb fibronectina (un marcador de dipòsits de MEC) en animals tractats amb vehicle (barra blanca) i tractats amb MLN-4760 (barra negra) en el grup control i el grup diabètic. El tractament amb MLN-4760 contribueix a un augment de la fibronectina en animals controls (db/m) i diabètics (db/db). Figura modificada de Ye et al. (2006).

Més enllà de la inhibició farmacològica, altres grups han abordat l'estudi mitjançant la deleció gènica de l'ECA2. Com ja s'ha explicat, s'han generat diverses línies de ratolins *knockout* per ECA2 amb la finalitat d'estudiar les implicacions biològiques de la pèrdua d'ECA2 a nivell cardiovascular *in vivo*. No obstant, donada la rellevància del SRA a nivell renal, l'impacte de la deleció del gen també s'ha estudiat a nivell renal. El grup d'Oudit i cols. va demostrar que en animals sans, la disrupció del gen de l'*eca2* (Crackower et al. 2002) comporta *per se* el desenvolupament de glomeruloesclerosi i augment de l'acumulació de col·lagen mesangial (**Figura 20**) que, de manera progressiva contribueix a un augment de l'EUA i al dany renal clarament present a les 12 mesos de vida (Oudit et al. 2006).

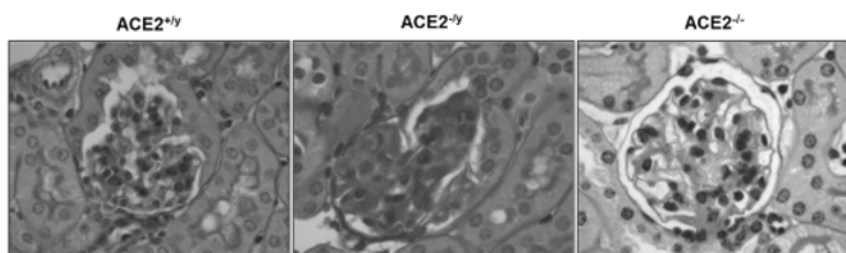


Figura 20.- Estudi renal per tinció PAS. Comparativa a l'any de vida en mascles amb ECA2 ($ACE2^{+/y}$), en mascles sense expressió d'ECA2 ($ACE2^{-/y}$) i en femelles sense ECA2 ($ACE2^{-/-}$) en imatges augmentades 600 vegades. Els mascles knockout presenten glomeruloesclerosi, cicatrització segmental i hialinosi. Figura modificada d'Oudit et al. (2006).

Partint de les bases establertes pel treball d'Oudit i cols. i donada la implicació del SRA també en el dany renal per diabetis (Brenner et al. 2001), aquestes línies s'han emprat per caracteritzar la influència d'ECA2 en la patologia i la funció renal en models murins de ND.

Un dels primers estudis va ser el del grup de Wong i cols. A través d'un model sorgit de creuar animals de la soca Insulin-2 Akita (model espontani de DM tipus 1) i de la soca C57BL/6 *knockout* per ECA2 van estudiar animals mascle diabètics de 3 mesos d'edat. Els resultats obtinguts mostraven una hipertròfia renal acompanyada d'un augment en els valors d'albuminúria i, en relació a la histopatologia, un augment de la matriu mesangial i un engruiximent de la MBG (**Figura 21**). No es van observar canvis en la PA. Tanmateix, els investigadors van concloure que l'ECA2 és un enzim important per prevenir el dany renal en diabetis, donada la seva capacitat de degradar Ang-II (Wong et al. 2007).

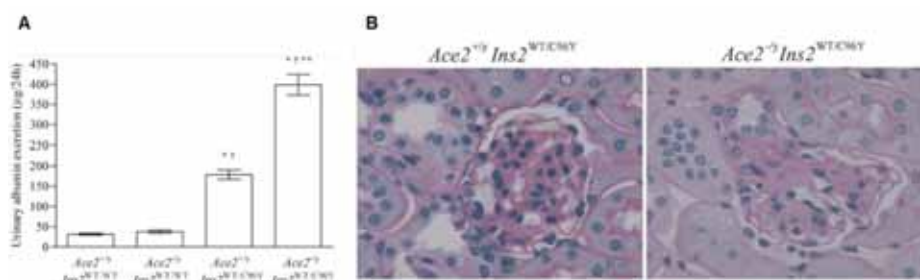


Figura 21.- Valoració de l'EUA i les lesions estructurals en el model Ins-2 Akita amb deleció en el gen de l'eca2. A) Anàlisi de l'EUA en orina de 24h en animals control i diabètics. L'EUA es troba significativament augmentada en els animals diabètics. L'absència d'ECA2 accentua aquest augment fins a 2 vegades més. B) Fotografies representatives a 600 augments de la tinció PAS en glomèruls d'animals diabètics amb presència (esquerra) i en absència (dreta) d'ECA2. El grup $ACE2^{-/y}Ins2^{WT/C96Y}$ presenta lesions estructurals a nivell renal. Figura modificada de Wong et al. (2007).

D'altra banda, el treball realitzat per Tikellis i cols. mostra resultats diferents en un estudi on utilitza ratolins mascles ECA2 *knockout* (generat pel grup de Crackower i cols.) diabètics per STZ en fons C57BL/6 (**Figura 22**). A les 10 setmanes de vida, aquests animals presenten valors d'albuminúria elevats i augment de la PA sense modificacions en la hipertròfia i fibrogènesi renal. Inesperadament varen observar una atenuació dels valors d'hiperfiltració glomerular (Tikellis et al. 2008).

	PES CORPORAL (g)	GLUCOSA (mmol/l)	PRESSIÓ ARTERIAL SISTÒLICA (mmHg)	EXCRECIÓ D'ALBÚMINA ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	ACLARIMENT DE CREATININA (ml/min)
c57 (wild-type)	33 \pm 1	11,1 \pm 1,6	121 \pm 1	47 \times/\pm 1,1	0,26 \pm 0,02
c57+diabetis	26 \pm 1*	30 \pm 1,3*	119 \pm 2	218 \times/\pm 1,1*	0,66 \pm 0,01*
ECA2ko	31 \pm 1*	9,1 \pm 1,1*	122 \pm 2	35 \times/\pm 1,1*	0,33 \pm 0,02
ECA2ko+diabetis	24 \pm 1*‡	29,1 \pm 1*‡	126 \pm 2*‡	193 \times/\pm 1,1*‡	0,45 \pm 0,03*‡

Taula 22.- Resum de diferents paràmetres representatius. Comparativa en animals no diabètics (amb iECA, iECA2 i la combinació), diabètics (amb inhibidors d'ECA, d'ECA2 i la combinació), ECA2ko, ECA2ko amb iECA, ECA2ko diabètics i ECA2ko diabètics tractats amb iECA. Els animals diabètics i ECA2ko diabètics presenten menor pes, major glicèmia, major excreció d'albumina i major aclariment de creatinina en comparació al grup control. El grup ECA2ko presenta una disminució de la glicèmia i de l'excreció d'albumina. Les dades s'expressen com a mitja \pm desviació estàndard de la mitja excepte per l'EUA, que s'expressa com a mitja geomètrica \times/\pm 1,1 factor de tolerància. * $p < 0,05$ en comparació a c57, † $p < 0,05$ en comparació a c57+diabetis, ‡ $p < 0,05$ en comparació a ECA2ko. Figura modificada de Tikellis et al. (2008).

Per tant, donat que els resultats obtinguts pels grups de Wong i cols. i Tikellis i cols. respectivament, apunten en sentits diferents, la funció d'ECA2 en el desenvolupament de la ND roman poc clara. Una possible explicació sobre les diferències trobades entre ambdós treballs pot ser deguda a la variació de la duració i severitat de la diabetis. Amb la finalitat d'esbrinar-ho, el grup de Shiota i cols. indueix diabetis amb STZ a mascles de la soca C57BL/6N *knockout* per ECA2 (generada per Yamamoto i cols.) i n'estudia els canvis fisiopatològics a les 4 i a les 18 setmanes de diabetis (corresponents a un estat inicial i avançat de la malaltia respectivament). En resum, els resultats obtinguts en ratolins diabètics deficients per ECA2, mostren major albuminúria i augment del dany glomerular i tubulointersticial (Shiota et al. 2010) en consistència amb el treball de Wong i cols. Segons els propis investigadors, aquestes troballes, que es mantenen en els dos punts de l'estudi, indiquen que l'ECA2 podria

exercir de forma sostinguda una funció protectora durant el desenvolupament de la ND (Figura 23).

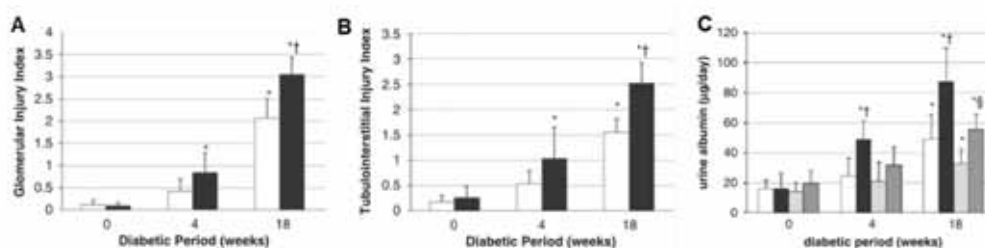


Figura 23.- Índex de dany glomerular i EUA en animals diabètics induïts amb estreptozotocina amb i sense presència d'ECA2. Augment de l'índex de dany glomerular (A) i tubulointerstitial (B) en animals diabètics amb presència (barres blanques) i en absència (barres negres) d'ECA2 a l'inici, 4 i 18 setmanes de diabetis. L'anàlisi va en concordança amb la presència d'albumina en orina (C). El tractament amb ARB en ambdós grups (barres grises) reverteix el fenotip. Figura modificada de Shiota et al. (2010).

E.3. EFECTES DE LA DELECIÓ DEL GEN *eca2* EN L'HOMEOSTASI DE LA GLUCOSA I LA INSULINA

En concordança amb l'existència de SRA a nivell tissular, s'ha descrit la presència d'ECA i d'ECA2 en el pàncrees tant endocrí com exocrí en un model de rates amb DM tipus 2 per obesitat (Tikellis et al. 2004). Més enllà, el mateix estudi revela la millora en l'estructura i la funció pancreàtica en animals diabètics tractats amb bloquejants del SRA (iECA i ARB). En coherència amb aquest fet, en un model de ratolins amb DM tipus 2, el bloqueig del SRA amb ARB també ha demostrat millorar la funció de les cèl·lules β pancreàtiques i la tolerància a la glucosa (Chu et al. 2006). S'ha comprovat que la sobreexpressió d'ECA2 humana mitjançant teràpia gènica emprant vectors adenovirals en el model de ratolí de DM tipus 2 *db/db* s'associa a: una disminució de la glicèmia, una millora en la tolerància al bolus de glucosa, un augment en la secreció d'insulina i proliferació de les cèl·lules β pancreàtiques i una disminució de l'apoptosi a través de l'Ang-(1-7) (Bindom et al. 2010). En conjunt, els diferents treballs suggereixen la implicació de l'activació del SRA pancreàtic a través de l'eix ECA/Ang-II com un possible mecanisme en el desenvolupament de la diabetis i proposen l'eix ECA2/Ang-(1-7) com a diana terapèutica.

Per tal d'avaluar el paper de l'ECA2 sobre el metabolisme de la glucosa en absència de diabetis es van realitzar tests de tolerància a la glucosa, mesures de la secreció de la insulina i tests de tolerància a la insulina en mascles de la soca C57BL/6 *knockout* ECA2 a les 12, 24 i 48 setmanes d'edat (Niu et al. 2008). Els resultats mostren que amb l'edat els animals són menys tolerants al bolus de glucosa i secreten menys insulina en una fase inicial post-injecció. Els animals continuen presentant la mateixa sensibilitat a la insulina. El treball conclou que l'absència d'ECA2 condueix a un empitjorament de l'homeòstasi de la glucosa en animals sans (**Figura 24**).

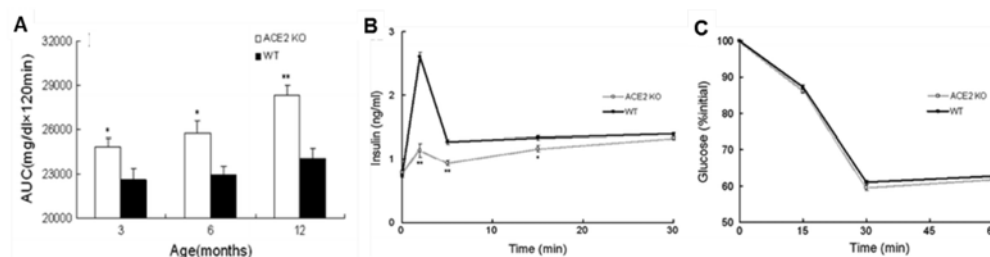


Figura 24.- Estudi de l'homeòstasi de la glucosa i la insulina en animals knockout per ECA2 en comparació als wild-type. A) Augment de l'àrea sota la corba (AUC) en tests de tolerància a la glucosa realitzats 12, 24 i 48 setmanes d'edat en el grup knockout per ECA2. B) Disminució de la secreció d'insulina mesurada en sèrum (ng/mL) en animals knockout per ECA2 a les 24 setmanes d'edat. C) No s'observen diferències en la sensibilitat a la insulina en presència o absència d'ECA2 en animals als 6 mesos (24 setmanes) d'edat. Figura modificada de Niu et al. (2008).

Aquest estudi però, no va en la línia dels obtinguts posteriorment pel grup de Yuan i cols., que, en animals sans, no reporta diferències en la tolerància a la glucosa, ni en la primera fase de la secreció d'insulina ni en la sensibilitat a la insulina en ratolins de 23 setmanes d'edat (**Figura 25**). Els resultats doncs, indiquen que la deleció de l'ECA2 no sembla ser suficient per a conduir a l'alteració del metabolisme de la glucosa en una dieta estàndard (SD). Addicionalment quan l'estudi trasllada la deficiència d'ECA2 a un model de DM tipus 2 induït amb una dieta rica en greixos (HFD) durant 16 setmanes, els resultats mostren variacions degudes a ECA2 en el metabolisme de la glucosa en animals diabètics: el grup *knockout* per ECA2 presenta pitjor tolerància a la glucosa i mala secreció d'insulina en l'estudi de la primera fase de la secreció, sense observar-se diferències en la sensibilitat a la insulina (Yuan et al. 2013).

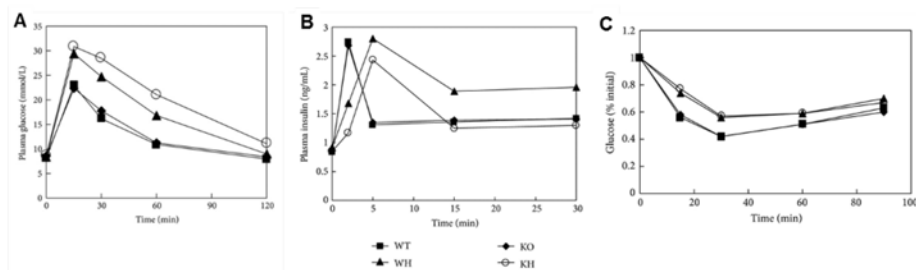


Figura 25.- Estudi de l'homeòstasi de la glucosa i la insulina en animals diabètics induïts per HFD knockout per ECA2 en comparació als wild-type. A) Pitjor tolerància a la glucosa en el grup knockout (KH) en comparació al wild-type (WH) amb HFD. B) Disminució de la primera fase de la secreció d'insulina en el grup knockout (KH) en comparació al wild-type (WH) amb HFD. C) Sensibilitat a la insulina sense modificacions entre els grups estudiats. Figura modificada de Yuan et al. (2013).

D'altra banda, un tercer treball centrat en l'impacte d'ECA2 en el metabolisme de la glucosa mostra com els animals alimentats amb dieta SD o HFD durant 12 setmanes, no presenten diferències significatives en presència o absència d'ECA2 pel que fa a la tolerància a la glucosa i a la sensibilitat a la insulina a les 20 setmanes d'edat (Bernardi et al. 2015). No obstant i en concordança amb el grup de Yuan i cols., en la primera fase de la secreció de la insulina s'observa una disminució significativa dels valors d'insulina en els animals *knockout* per ECA2 (**Figura 26**). Per tant, en aquest treball, l'absència d'ECA2 modifica la secreció de la insulina però no la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina, tant en animals sans com diabètics.

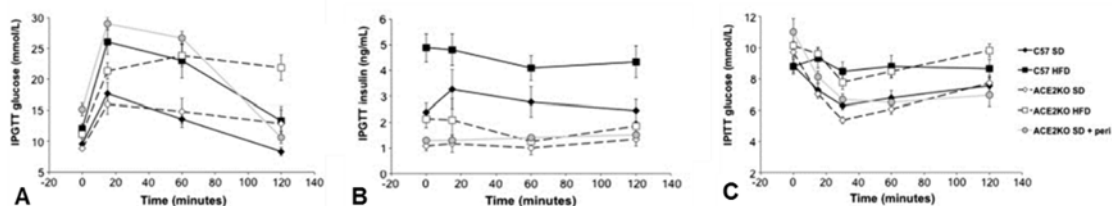


Figura 26.- Estudi de l'homeòstasi de la glucosa i la insulina en animals diabètics induïts per HFD. A) En el test de tolerància oral a la glucosa, no s'observaren diferències entre presència i absència d'ECA2 en el grup no diabètic-SD (cercles) i en el grup diabètic-HFD (quadrats). B) Disminució en la secreció d'insulina en els grups SD i HFD, en absència d'ECA2 (quadrats blancs i cercles blancs) en comparació als animals amb ECA2 (quadrats negres i cercles negres).

cercles negres, respectivament).C) No hi ha diferències en la sensibilitat la insulina en presència d'ECA2 en SD (cercles negres) i HFD (quadrats negres) en comparació a l'absència d'ECA2 (cercles blancs i quadrats blancs, respectivament). Figura modificada de Bernardi et al. (2015).

II. HIPÒTESI

II. HIPÒTESI

El SRA té importants efectes en l'homeòstasi renal i cardiovascular ja que està implicat en la regulació del sodi i l'aigua corporals i en el control de la pressió arterial. L'activació del SRA condueix a una acumulació d'Ang-II que exerceix efectes deleteris a través de processos inflamatoris, proliferatius, fibròtics i de vasoconstricció (Peach 1977). A nivell renal, la hiperglicèmia i la hipertensió actuen com activadors del SRA provocant modificacions estructurals com ara expansió mesangial i engruiximent de la MBG en el glomèrul i fibrosi tubulointersticial. Aquestes, al seu torn, comporten un seguit d'alteracions funcionals provocant hiperfiltració i albuminúria que, juntament amb un disfunció endotelial, desencadenen en última instància la ND (Chawla et al. 2010). L'eix ECA2/Ang-(1-7) suposa una via alternativa en l'activació del SRA: a través d'un efecte dual, ECA2 degrada Ang-II prevenint-ne les seves accions i, al mateix temps, afavoreix la síntesi d'Ang-(1-7) que té efectes anti-inflamatoris, anti-proliferatius, anti-fibròtics i vasodilatadors, oposats als descrits per l'Ang-II (Eriksson et al. 2002). Degut a la funció de l'ECA2 a l'hora de contrarestar l'acumulació d'Ang-II en el sí de l'activació del SRA, l'eix ECA2/Ang-(1-7) actua com a regulador negatiu de l'eix ECA/Ang-II. En pacients amb nefropatia diabètica, la teràpia amb fàrmacs bloquejants del SRA, ja siguin iECA o ARB, ha demostrat tenir accions renoprotectores a través d'una disminució dels nivells de proteïnúria i d'un alentiment de la progressió cap a la MRC (Hoogwerf 2010). No obstant, el SRA no restringeix les seves accions a nivell renal i cardiovascular i la presència del SRA s'ha demostrat en diferents teixits (Gembardt et al. 2005), donant suport a l'existència d'un sistema amb accions locals que interactua amb un sistema circulant amb accions sistèmiques (Paul et al. 2006). En aquest sentit, s'ha detectat la presència d'elements del SRA en el pàncrees tant endocrí com excocrí (Chappell et al. 1992; Leung et al. 1999; Niu et al. 2008) i diversos estudis en models experimentals i en pacients indiquen que el bloqueig del SRA també té efectes en el desenvolupament de la diabetis (Tikellis et al. 2004; Lewis et al. 1993).

Donada la implicació del SRA en l'aparició de la diabetis i la progressió de la ND i el paper de l'ECA2 com a regulador negatiu del sistema, la hipòtesi de la present tesi és que la deleció del gen de l'*eca2* contribuirà, d'una banda, a un augment de l'aparició de la DM *de novo* i, d'altra, a una major progressió de la nefropatia diabètica en el model experimental NOD de DM tipus 1.

III. OBJECTIUS

III. OBJECTIUS

L'objectiu principal de la present tesi consisteix en estudiar *in vivo* en un model experimental de DM tipus 1 l'efecte de la deleció gènica de l'ECA2.

Els objectius plantejats desglossats són els següents:

1. Obtenció de les noves línies de ratolins: NOD.ACE2^{-/-}, model experimental de DM tipus 1 que presenta una deleció en l'ECA2 i NOR.ACE2^{-/-}, model experimental resistent a la diabetis que presenta una deleció en l'ECA2.
2. Estudiar l'efecte en l'aparició de la diabetis en la nova línia de ratolins NOD.ACE2^{-/-}.
3. Estudiar la progressió de la nefropatia diabètica en la nova línia de ratolins NOD.ACE2^{-/-}.

IV.MATERIALS I MÈTODES

IV. MATERIALS I MÈTODES

A. DISSENY EXPERIMENTAL

Per tal d'assolir els objectius establerts es va procedir en tres blocs que es resumeixen a continuació. Les tècniques emprades en cada un dels blocs s'expliquen detalladament al llarg de l'apartat.

- a) **Obtenció de les noves línies de ratolins NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-} a través d'un canvi de fons genètic.** Amb l'objectiu d'obtenir un nou model experimental que desenvolupés una diabetis autoimmune de manera espontània i que no presentés l'enzim ECA2, els animals que portaven la deleció del gen de l'eca2 (generats sota un fons C57BL/6) es van creuar amb animals de la línia no obesa diabètica (NOD/ShiLtJ) i amb la no obesa resistent (NOR/LtJ) per a generar les noves línies NOD.ACE2^{-/-} i els controls no diabètics NOR.ACE2^{-/-}.
- b) **Estudi de l'homeòstasi de la glucosa i de la insulina.** Es va estudiar en un grup d'animals a través de tests de sobrecàrrega intraperitoneal de glucosa o insulina i de l'estudi de la primera fase de la secreció d'insulina en el sèrum a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat.
- c) **Estudi de la nefropatia diabètica.** En un segon grup d'animals seguits des de les 12 setmanes d'edat, es van realitzar glicèmies capil·lars basals cada dues setmanes. Els ratolins amb dues mesures de glucosa en sang ≥ 250 mg/dL en dos dies consecutius es van incloure a l'estudi. Paral·lelament, per a la inclusió de cada animal diabètic es va incloure un animal no diabètic de la soca NOR, coincident en genotip i edat. Els animals es van seguir durant 30 dies, mesurant-ne el pes, la glicèmia setmanal i la pressió arterial (PA) final. Finalment es va mesurar la taxa de filtració glomerular (TFG) mitjançant l'anàlisi de l'aclariment d'un bolus d'inulina-FITC i es van recollir teixits per a l'anàlisi posterior (orina, sang i teixits renal i pancreàtic per a histologia i extracció proteica).

B. OBTENCIÓ DE LES NOVES LÍNIES DE RATOLINS NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-}

B.1. ANIMALS

Per generar les noves línies es van emprar les següents soques de ratolins:

- Ratolins no obesos diabètics (NOD/ShiLtJ) (Jackson Laboratoy, Bar Harbor ME, USA). La línia NOD/ShiLtJ es caracteritza per desenvolupar una diabetis mellitus (DM) de tipus autoimmunitari a través de cèl·lules T (CD4⁺ i CD8⁺) i que cursa amb la presència d'auto-anticossos específics contra les cèl·lules β pancreàtiques provocant insulinitis (Wicker et al. 1995). Aquest fenotip ja és observable a les poques setmanes de vida. A més, el model presenta alteracions en el complex major d'histocompatibilitat similars a les que s'observen en la DM depenent d'insulina en humans, fent-lo susceptible a ser un bon model experimental per a l'estudi de la DM tipus 1 (Leiter 2001; Segev et al. 2004). A les 30 setmanes d'edat, la soca de ratolins NOD mostra una taxa d'aparició de DM d'un 80% en les femelles i d'un 20% en el mascles (Makino et al. 1980), amb alta variabilitat en funció de les condicions ambientals i de manipulació a la que estan sotmesos (Adorini et al. 2002). Per tal d'estandarditzar l'aparició de la diabetis en la nostra colònia es van estabular els animals en una zona lliure de patògens específics (LPE) i es van seleccionar els ratolins femelles per a l'estudi.

- Ratolins no obesos resistents a la diabetis (NOR/ShiLtJ) (Jackson Laboratoy, Bar Harbor ME, USA). Com a control es va escollir la línia NOR, una soca congènica recombinant derivada de la línia NOD. Els ratolins NOR, tot i presentar la mateixa acumulació de limfòcits T a nivell perifèric i la mateixa resposta defectuosa dels macròfags peritoneals que presenten els ratolins NOD, es caracteritzen per ser resistents a la insulinitis i no desenvolupar diabetis (Serreze & Leiter 1994).

- Ratolins *knockout* pel gen *eca2*. Els ratolins que presentaven la deleció del gen l'ECA2 es van obtenir en el fons genètic mixt C57BL/6-129SvEv al laboratori de la Dra. Gurley (Gurley et al. 2006). Els animals eren viables i fèrtils sense presentar cap anomalia estructural major. Igualment, a nivell cardíac no es van observar signes d'hipertrofia. Aquest soca presenta un increment de la pressió arterial a les 24 setmanes d'edat, en absència d'ECA2 tant en el fons mixt com en la línia consanguínia C57BL/6.

Així, amb els models comentats amb anterioritat, es van generar els següents models experimentals en el nostre laboratori a través d'un procés que es detalla més endavant:

- Ratolins NOD.ACE2^{-/-}: mitjançant creuaments successius fins a la desena generació, la deleció de l'ECA2 en ratolins C57BL/6 es va transferir a un fons NOD/ShiLtJ i es va obtenir la nova línia NOD.ACE2^{-/-} (**Figura 27**). Per assolir un 99,9% de neteja del fons original mantenint el *knockout*, es van realitzar creuaments fins a assolir la desena generació (Wong 2002).
- Ratolins NOR.ACE2^{-/-}: paral·lelament, la deleció de l'ECA2 també es va transferir a un fons NOR/LtJ per a l'obtenció de la línia NOR.ACE2^{-/-}.
- Ratolins NOD.ACE2^{+/+} i NOR.ACE2^{+/+}: a més de les línies NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-} va ser necessària la generació de les respectives línies *wild-type* (NOD.ACE2^{+/+} i NOR.ACE2^{+/+}).

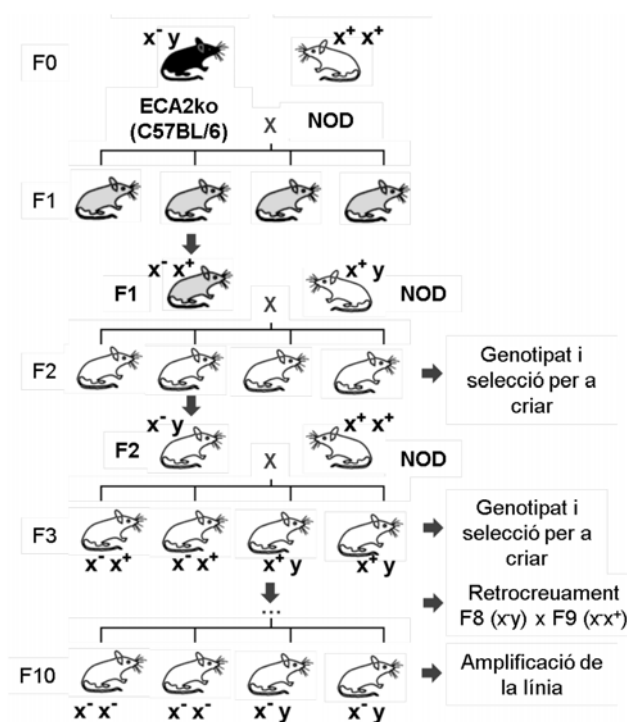


Figura 27.- Esquema de creació de la nova línia NOD.ACE2^{-/-}: l'esquema mostra el procés de creació de la soca amb la neteja del fons realitzada entre les línies ECA2ko sota fons C57BL/6 i NOD per a generar la línia NOD.ACE2^{-/-} a la F10.

Les colònies es van establir en microaïlladors ventilats en condicions LPE, seguint un cicle de 12 hores de llum-fosc amb lliure accés a pinso i aigua. Tots els procediments es van aprovar pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (CEEA-PRBB) i es van portar a terme d'acord amb l'acreditació del Servei de Biodiversitat i Protecció dels Animals de la Generalitat de Catalunya.

B.2. DELECCIÓ DEL GEN *eca2*

Els animals que contenen la deleció del gen de l'*eca2* (animals *knockout* o KO) es van obtenir en el grup de la Dra. Gurley seguint els passos que s'expliquen a continuació. Es va generar un constructe que contenia el casset de gens NEO/URA3 flanquejat per la seqüència genòmica circumdant a la zona del centre actiu d'ECA2 (seqüència HEMGH) en una soca de llevat. Es va obtenir el vector linealitzat d'aquest constructe que es va electroporar a cèl·lules mare embrionàries de ratolins de la línia 129/SvEvfBRTac. Per recombinació homòloga, el vector que contenia la regió del centre actiu d'ECA2 *knockejada* es va inserir al locus d'ECA2 del genoma de les cèl·lules mare (ES). Les cèl·lules modificades es van injectar en blastocists de ratolins de la soca C57BL/6H per a la generació de quimeres (identificables pel pelatge de color *agouti*). Les quimeres mascles es van creuar amb femelles de la soca C57BL/6J per obtenir femelles heterozigotes que, al seu torn, es van creuar amb animals també C57BL/6J per obtenir mascles *knockout* per ECA2 (Gurley et al. 2006).

B.3. OBTENCIÓ DE LES LÍNIES I COMPROVACIÓ DEL GENOTIP

B.3.1. PROCÉS DE CRIA

Per a l'obtenció de les noves soques NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-} va ésser necessari creuar animals de la soca C57BL/6 ECA2 *knockout* amb els de la soca NOD/ShiLtJ (NOD) i NOR/LtJ (NOR), respectivament.

Ja que les colònies NOD i NOR han d'estar establides en una zona LPE per tal d'assegurar l'aparició del fenotip diabètic i la línia ECA2 *knockout* es trobava en una zona convencional de l'estabulari, va ser necessari rederivar embrions de la línia ECA2 *knockout* cap a una femella pseudogestant establida en la zona LPE. Aquest procediment el va realitzar el personal de l'estabulari. La femella receptora va dur a terme la gestació, part i alletament de les cries, sense aportació de material genètic.

Una vegada els animals C57BL/6 ECA2 *knockout* es van trobar en condicions LPE, l'objectiu va consistir en la generació de les noves línies congèniques NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-}. Es van creuar de manera successiva animals ECA2 *knockout* obtinguts a cada generació amb animals de les soques NOD o NOR, respectivament. Els creuaments es van anar succeint fins a la desena generació, quan es calcula que s'ha aconseguit transferir aproximadament el 99,9% del genoma de la soca receptora (Wakeland et al. 1997).

Paral·lelament, també es van anar creuant de manera successiva fins la desena generació els animals que presentaven expressió d'ECA2 amb els de les soques NOD i NOR respectivament per a l'obtenció de les línies *wild-type*.

B.3.2. PROCÉS DE GENOTIPAT

B.3.2.1. DISSENY DE PRIMERS

En primer lloc es va localitzar en el cromosoma X la seqüència nucleotídica que codifica pel centre actiu d'ECA2 (motiu HEMGH d'unió a zinc).

Com mostra la **Figura 28**, el fragment CACGAGATGGGACAC inclòs en la zona delecionada de llargada de 230pb i que inclou la regió del centre actiu (ressaltat en color groc) es va identificar i situar en una regió exònica del genoma de ratolí (seqüència en vermell). Per al disseny dels *primers* emprats per discernir animals *knockout* i *wild-type*, es va incloure un regió més àmplia. Usant el programa *Primer3*, es va escollir un *primer* sentit i un *primer* antisentit (seqüències en color verd) que es localitzaren en les regions intròniques que flanquegen l'exó (seqüències en negre); a una distància entre ells de 890pb, assegurant així que s'englobava el fragment d'interès.

```

...
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATACCCTCCTTGCACCTGGAGAGGTGGTTCAAGTGGTTAAGAGCACCGGCTGCTCTTTGAGAG
GACAAAAGAATGTTTATTTAATCACACTTTTATTAGCTCATCTTTGGCCTAATACATTGAAATTAGTCTGGCAGATCAGGAAAACGGCTCGA
TTCTCTGTCTGGGCATTTGCATCCATGTTCCCTTTCCATGCAAATTTGATGGTGTGACATTCTAAAGCCGACCACTGATGAGAGGTACTTTTC
AGTGTCTATGTGCAGCAGGGCCAGAGTATCTGCCAGTTCAAGTCATTTTCATGGTAGACATCATCTTAAGAATTTAGCTTTTCGTCTCTTGTTC
ACTTACACACTACTCATCTCAGAATTATGTAGCATAGAGCTCTATGTATCATTTTTCTGTTAGTGAAGAGCACAAGAATGGAACCTTAGTCCCTT
TATATTGAGTAAATGGTTCATAAGGGGCAAATAGTAAACCTCAGTGATGAATAGATCTTCATGTCTCCGACCCCAAAAACCTCTACTCTA
GCAATGAAAGGAAATTAAGTAAGATTCACCTTAATCTTGTCCGTTTTTATGCAGAAATCAAGATGTGTACAAAGGTCACAAATGGACAACCTCTT
GACAGCCCATCACGAGATGGGACACATCCAATATGACATGGCATATGCCAGGCAACCTTTCCCTGCTAAGAAAACGGAGCCAAATGAAGGGTTCCA
TGAAGCTGTTGGAGAAATCATGTCACTTTCTGCAGCTACCCCAAGCATCTGAAATCCATTGGTCTTCTGCCATCCGATTTTCAAGAAGATAG
CGGTAATTTTTCTTTGGCTTGTGGGGGCTAATCTGATATAGGGAAATGATTTAACAGCATCTTATAGGAAAATACTTGTTTTACTTTTAT
GCTACTTGGGGGAAATGTTTATGGGACTTGCTACTGATATAAAGCTTCTCTTTTGTAAAGTGGATCCGAGCATGCAAACCTGTGGTTTTAA
ACAAGGAATTAAGTGAATAAAGTGAAGGAAATGATGCTACTAGAAAGCTGGATGGGATTTGGGAAGATGATAAAGTGGGACAGAA
CTTAAGTGGTTTGTGAAGCCATGGAGCTGCTCAGTGTCTGGATTTTAAATAGTTGGCTGTCAATTTTAGGTTAAAAACAAAGG
...

```

Figura 28.- Seqüència de l'ADN genòmic del gen *eca2* en el cromosoma X de ratolí: selecció de primers per PCR. Les regions en negre corresponen a les regions intròniques i la vermella a l'exònica. La seqüència ressaltada en groc correspon a la seqüència codificant pel centre actiu. En verd, les seqüències dels primers escollits per a identificar la deleció de l'*eca2*.

Per a l'obtenció de la línia *wild-type* va ser necessari discernir entre el genotip de les femelles heterozigotes (+/-) i les *wild-type* (wt) pel gen de l'ECA2 mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa (Wishart et al. 2007). Amb aquest objectiu, es va seleccionar una regió útil per diferenciar el nombre de còpies del gen entre els animals. Amb el programa *Pimer3*, es va dissenyar la parella de primers (en color blau) que amplificava aquesta regió i que englobava la zona de la deleció. Com a control positiu intern es va escollir una altra parella de primers que amplificava fora de la regió delecionada (en color taronja) (**Figura 29**).

```

ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATACCCTCCTTGCACCTGGAGAGGTGGTTTCAGTGGTTAAGAGCACCGGCTGCTCTTTGAGAG
GACAAAAGAATGTTTATTTTAAATCACACTTTTATTAGCTCATCTTTGGCCTAATACATTGAAATTAGTCCCTGGCAGATCAGGAAACGCCCTCGA
TTCTCTTGTCTGGGCATTTCGCATCCATGTTCCCTTTCCATGCAAATTTGATGGTGTGACATTCTAAAGCCGACCCTGATGAGAGGTTACTTTTC
AGTGTCTATGTGCAGCAGGCCAGAGTATCTGCCAGTTCAGTCAATTCATGGTAGACATCATCTTAAGAATTAGCTTTTCGTCTCTGTGTC
ACTTACACACTACTCATCTCAGAATTATGTAGCATAGAGCTCTATGTATCATTTTCTGTTAGTGAAGAGCACAAAGAATGGAACCTTAGTCCCTT
TATATTGAGTAAATGGTTCATAAGGGGCAAATAGTAAACCTCAGTGATGAATAGATCTTCATGTCATCCGACCCCCACAAAACCTCTACTCTA
GCAATGAAAGGAAATTAAGTAAGATTCACCTTAATCTTGTCCGTTTTTATGCAGAAATCAAAGTGTGTACAAAAGGTCACAATGGACAACCTCTT
GACAGCCCATCACGAGATGGGACACATCCAATATGACATGGCATATGCCAGGCAACCTTTCCCTGCTAAGAAAACGGAGCCAATGAAGGGTTCCA
TGAAGCTGTTGGAGAAATCATGTCACCTTTCTGCAGCTACCCCAAGCATCTGAAATCCATTGGTCTTCTGCCATCCGATTTTCAAGAAGATAG
CGGTAATTTTTCTTTTGGCTTGTGGGGGCTAATCTGATATAGGGAAATGTATTTAACAGCATCTTATAGGAAAATACTTGTTTTACTTTTAT
GCTACTTGGGGGAAAATGTTTATGGGACTTGCTACTGATATAAAGCTTCTCTTTGTAAAGTGTGGATCCGAGCATGCAAACCTGTGGTTTAA
ACAAGGAATTAAGTGAATAACTGAGGAATGGCCCTGCAAATGATCTACTAGAAGCTGGATGGGATTTGGGAAGATGATAACTAGCCACAGAA
CTTAACTGGTTTTGTTGAAGCCATGGAGCTGCTCAGTGTCTGGATTTTAAATAGTTGGCTGTCATTTTTAGGTTAAAAACAAAGG

```

Figura 29.- Seqüència de l'ADN genòmic del gen *eca2* en el cromosoma X de ratolí: selecció de primers per qPCR. Localització dels primers dissenyats per discernir entre femelles heterozigotes i *wild-type* (en blau) i per a l'amplificació de la seqüència control (en taronja) en la regió circumdant a la seqüència del centre actiu (ressaltada en groc).

B.3.2.2. EXTRACIÓ D'ADN

L'extracció d'ADN es va fer a partir d'un petit fragment de teixit (2-4mm aproximadament) de l'extrem apical de la cua dels ratolins mitjançant el tall i la cauterització. L'extracció i aïllament de l'ADN genòmic es va realitzar amb el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguint les instruccions proporcionades per la casa comercial. Breument, cada fragment tissular es va lisar per

digestió enzimàtica amb 500µL de solució de lisi de nuclis, 120µL d'àcid etildiamintetraacètic (EDTA) 0,5M pH 8,5 i 17,5µL de proteïnasa K (20mg/mL) i es va incubar a 55°C durant 12 hores. Per descartar el contingut proteic, es van incubar les mostres amb 200µL de solució de precipitació de proteïnes durant 5 minuts en gel. Després d'una centrifugació de 4 minuts a 14000g, els àcids nucleics presents al sobrenedant es van transferir a un nou tub. Per a precipitar l'ADN es van afegir 600µL d'isopropanol en cada tub i es va realitzar una segona centrifugació d'1 minut a 14000g. El precipitat es va rentar amb 600µL d'etanol al 70% i després d'una centrifugació d'1 minut a 14000g es va obtenir un *pellet* d'ADN. L'excés d'etanol es va extreure i la mostra es va deixar assecar a temperatura ambient per, finalment, resuspendre-la en 100µL de solució de rehidratació i incubar-la a 65°C durant 60 minuts. L'ADN extret es va quantificar per espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000).

B.3.2.3. GENOTIPAT

Durant la neteja de fons, els animals *knockout* es van identificar per genotipat mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). D'altra banda, per obtenir la línia *wild-type*, va ser necessària la distinció entre animals amb una còpia (heterozigots) o amb les dues còpies d'ECA2 (*wild-type*). La càrrega gènica es va identificar mitjançant la tècnica de PCR quantitativa (qPCR).

B.3.2.3.1. MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El genotipat dels animals *knockout* es va realitzar per mitjà de PCR clàssica. La tècnica consisteix en l'amplificació de les cadenes d'ADN a través de l'ús de l'enzim Taq polimerasa combinant cicles de baixes i altes temperatures, en els que els *primers* s'uneixen a les cadenes i es generen còpies de la zona d'interès.

Per a la reacció de PCR es van utilitzar entre 15-60ng d'ADN en un volum final de 25µL. Els components de la reacció eren els següents:

REACTIU	VOLUM (µL/mostra)	CONCENTRACIÓ FINAL
Tampó de PCR 10x (Sigma)	2,5	1x
dNTPs 10mM (Sigma)	0,5	0,2mM
Primer sense 100mM (Sigma)	0,05	0,2mM
Primer antisense 100mM (Sigma)	0,05	0,2mM
H ₂ O miliQ	QSP 25µL	-
DNA polimerasa (TaqDNA Pol, Sigma)	0,125	-
Mostra	15-60ng	

Taula 6.- Reactius emprats per la realització de la PCR.

Les seqüències dels primers usats per a la identificació ECA2 i del gen control *gapdh* van ser les següents:

GEN A AMPLIFICAR	SEQÜÈNCIA (5'-3')	
ECA2	<i>sense</i>	GCCTCGATTCTCTTGCTGG
	<i>antisense</i>	AGATCATTTCAGGCCATTC
GAPDH	<i>sense</i>	AACTTGGCATTGTGGAAGG
	<i>antisense</i>	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG

Taula 7.- Primers emprats per a l'amplificació d'ECA2 i GAPDH.

Es van amplificar els fragments durant 25 cicles de PCR en les següents condicions:

PAS	TEMPERATURA	TEMPS (minuts:segons)
DES NATURALITZACIÓ	94°C	1:00
ALINEAMENT	55°C	0:45
ELONGACIÓ	72°C	1:20

Taula 8.- Programa de PCR emprat per a l'amplificació d'ECA2 i GAPDH. La desnaturalització, aliniament i elongació de la seqüència es va realitzar 25 cicles. Es van amplificar les dues seqüències (*eca2* i *gapdh*) en la mateixa tanda de PCR però en tubs diferents.

Una vegada finalitzada la PCR, el producte d'amplificació es va carregar en un gel d'agarosa (Promega) preparat a l'1% en tampó TBE 1X (Tris 220mM; Borat 180mM; EDTA 5mM; pH8,3). Els productes de l'amplificació es van separar en funció del pes molecular, fet que permetia visualitzar ràpidament la presència o absència del gen de l'*eca2* en les mostres estudiades. Com a marcador de pes molecular es va emprar el 1kb DNA Ladder (Sigma).

B.3.2.3.2. MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA (qPCR)

La característica essencial de la tècnica de qPCR és la capacitat de combinar la PCR amb una detecció i monitorització de la reacció a temps real a través de l'ús d'un agent intercalant amb un fluorocrom no específic (SYBRGreen). Aquest fluorocrom emet una fluorescència basal que es veu incrementada en unir-se a les dobles cadenes recent sintetitzades a partir d'una molècula d'ADN motlle en una reacció de PCR. Per tant, a cada cicle de PCR, amb la progressiva generació de les còpies de doble cadena d'ADN, hi ha una acumulació de la senyal fluorescent. Quan aquesta senyal supera el llindar del valor basal (o paràmetre C_T , és a dir el cicle en el que se supera el llindar de fluorescència basal), s'inicia la fase exponencial de la reacció, on la intensitat de la fluorescència emesa es correlaciona proporcionalment amb el nou producte format.

La tècnica de qPCR es va realitzar emprant SYBRGreen Master Mix 2x (excitació a 465nm i emissió a 510nm) amb l'equip LightCycler® 480 i es va analitzar amb el software Light Cycler® 480 SW1.5 (Roche) amb una quantitat de 6ng d'ADN i un volum final de reacció de 10µL que contenia els següents reactius:

REACTIU	VOLUM (µL/mostra)	CONCENTRACIÓ FINAL
SYBR Green Master Mix 2x (Roche)	5	1x
<i>Primer sense</i> 100µM (Sigma)	0,025	0,25nM
<i>Primer antisense</i> 100µM (Sigma)	0,025	0,25nM
H ₂ O milliQ	2,95	-
Mostra	2	

Taula 9.- Reactius emprats per a la realització de la qPCR.

Les seqüències dels *primers* per a identificar ECA2 entre animals homozigots i heterozigots van ser les següents:

REGIÓ D'AMPLIFICACIÓ	SEQÜÈNCIA (5'-3')	
DELECIÓ D'ECA2	<i>sense</i>	GCCTCGATTCTCTTGCTGG
	<i>antisense</i>	CCATTGTGACCTTTGTACACATC
CONTROL POSITIU (regió fora de la seqüència delecionada)	<i>sense</i>	TGCTACTGATATAAAGCTTCTCTTTTG
	<i>antisense</i>	AGATCATTTCAGGCCATTC

Taula 10.- Primers emprats per a l'amplificació de l'ECA2 i la regió control per qPCR.

Es van amplificar els gens al llarg de 35 cicles de qPCR. Les condicions de cada cicle es detallen a continuació:

PAS	TEMPERATURA	TEMPS (minuts:segons)
DESNATURALITZACIÓ	95°C	0:10
ALINEAMENT	58°C	0:25
ELONGACIÓ	72°C	0:25

Taula 11.- Programa de qPCR emprat per a la distinció entre femelles heterozigotes i wild-type per ECA2.

A partir de la diferència en el paràmetre C_T entre el control intern i la regió d'interès (ΔC_T) en cada una de les mostres, es va determinar la càrrega gènica dels animals (heterozigots o *wild-type*).

C. ESTUDI DE L'HOMESÒSTASI DE LA GLUCOSA I DE LA INSULINA

En aquesta part del treball de tesi es va estudiar la homeòstasi de la glucosa i la insulina en animals no diabètics de les soques de l'estudi. Un grup d'animals femelles es van començar a estudiar a les 12 setmanes d'edat i el seguiment es realitzà mensualment al llarg de 12 setmanes més, fins assolir les 24 setmanes d'edat. Els animals es mantenien fins a les 25, moment en el què se'ls mesurava a punt final la glicèmia basal abans de l'eutanàsia.

Es realitzà un registre de cada animal diabètic que es detectava en el sí de la colònia de seguiment, incloent la informació de l'edat d'aparició de la malaltia i el grup al que pertanyien. Aquesta base de dades es va emprar per a fer el càlcul de la incidència de la diabetis sobre el total d'animals estudiats.

C.1. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL

El test de tolerància a la glucosa intraperitoneal es va realitzar a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat d'acord amb el protocol publicat per Bindom i cols (Bindom et al. 2010). Els animals es van sotmetre a un dejú de 12 hores i després d'aquest període, es van pesar i se'ls va mesurar la glicèmia capil·lar basal obtinguda per massatge caudal. Els valors de glucosa es van obtenir amb el glucòmetre Accu-Chek Compact® (Roche). L'aparell detecta la glucosa present en una mostra de sang capil·lar fresca (5µL) emprant tires reactives d'un sol ús emmagatzemades en cartutxos de 17 unitats. Les concentracions de glucosa en sang apareixen en la pantalla de l'aparell passats 5 segons de determinació i s'expressen en mg/dL. Quan un animal supera el límit de 600mg/dL l'aparell dona un missatge de valor massa elevat (high).

Posteriorment, es procedia a punxar un bolus de D-glucosa via intraperitoneal (i.p.) a una dosi de 2g/Kg amb una agulla de 26G. Per a la seva preparació, la D-glucosa (Sigma) es pesava el dia anterior i es dissolia en solució aquosa per obtenir una concentració de 0,25mg/mL. La glucosa sòlida es troba principalment en forma α malgrat que la forma β de la glucosa es transporta més ràpidament en l'organisme. La solució es deixava a temperatura ambient tota la nit amb l'objectiu d'aconseguir un equilibri entre la forma α (present en un 30-40%) i la predominant β (present en un 60-70%). Com que s'ha d'injectar estèril en els animals, la solució estoc es filtrava emprant filtres de 0,22µm de porus (Millex) i s'aliquotava, treballant sempre sota campana estèril de flux laminar. En cada animal es van realitzar les la monitorització dels nivells de glucosa sanguínia en els minuts 0, 15, 30, 60 i 120.

C.2. RECOLLIDA DE SÈRUM PER A LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA

El mateix dia de la realització del test de glucosa, s'extreia sang al minut 0 (basal) i posteriorment a l'administració del bolus de glucosa, en els minuts 2, 5, 10 i 15 mitjançant la tècnica del massatge caudal amb l'objectiu d'obtenir sèrum per determinar el contingut d'insulina en sang. Els detalls del processat i la determinació de la concentració d'insulina s'expliquen en el punt 3.4.

C.3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL

A les 24 hores de la realització del test de la sobrecàrrega de glucosa, els mateixos animals es posaven en dejú durant 5 hores i posteriorment es pesaven. S'injectava una dosi d'insulina i.p. de 0,75U/Kg amb una agulla de 26G. La insulina es preparava fresca sota campana estèril de flux laminar a partir d'una solució d'Humulina R (Eli Lilly) a una concentració estoc de 100U/mL diluïda en sèrum fisiològic per obtenir una concentració de treball de 0,25U/mL.

Els nivells de glucosa en sang provinent de la vena caudal es van mesurar amb glucòmetre als 0 i als 15, 30, 60 i 120 minuts després de l'administració del bolus d'insulina per tal de monitoritzar els nivells de glicèmia en resposta a la insulina injectada. Els resultats es van expressar com al percentatge de disminució de la glicèmia respecte el basal al minut 0 (Bindom et al. 2010).

C.4. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'INSULINA EN SÈRUM

Les mostres de sang de la vena caudal obtingudes com es detalla en el punt 3.3, es van recollir en un tub tipus eppendorf als 0, 2, 5, 10 i 15 minuts després d'una punció i.p. de 2g/Kg de D-glucosa. Posteriorment es van centrifugar durant 20 minuts a 2000g a una temperatura de 4°C i el sèrum obtingut es va transferir en un segon tub per al seu emmagatzematge a -20°C.

Per a la determinació de la concentració d'insulina es va usar el kit Ultra Sensitive Mouse Insulin (Crystal Chem Inc.). Es tracta d'una tècnica d'assaig per immunoabsorció lligat a enzims (ELISA) que es basa en la detecció dels nivells d'insulina en la mostra mitjançant la detecció indirecta de la formació d'immunocomplexes. La insulina present a la mostra, s'uneix a l'anticòs anti-insulina conjugat a la peroxidasa POD i en presència del substrat tetrametilbenzidina (TMB) produeix una reacció colorimètrica que es mesura per espectrofotometria.

Treballant amb duplicats, 5µL de sèrum per cada mostra es van diluir en 95µL de solució de dilució en una placa recoberta d'anticòs anti-insulina. Es va procedir igual amb la respectiva corba patró amb concentracions conegudes creixents d'insulina. Després d'una incubació de 2 hores a 4°C, la placa es va rentar 5 vegades amb tampó de rentat i es van afegir 100µL d'anticòs anti-insulina POD-conjugat per pou. Després de 30 minuts, es van realitzar 7 rentats més i es van afegir 100µL de substrat TMB. Les mostres es van incubar de nou durant 40 minuts en la foscor per dur a terme la

reacció colorimètrica, que es va parar mitjançant l'addició de 100µL d'àcid sulfúric 1N. Les lectures d'absorbància es van realitzar a 450 i 630nm i els valors es van extrapolar a la recta patró obtinguda en la mateixa tècnica (expressada en ng/mL).

C.5. CIRURGIA A PUNT FINAL D'ESTUDI

Tant als animals en què se'ls va detectar hiperglicèmia durant el seguiment com en els que van arribar a final d'estudi sense desenvolupar diabetis (a una edat de 25 setmanes) es van eutanasiar per poder obtenir mostres de sang, teixit renal i teixit pancreàtic.

En els ratolins NOD.ACE2^{+/+} (n=22) i els i NOD.ACE2^{-/-} (n=23) cada animal es posava individualment a la càmera de CO₂ i es procedia a realitzar una punxada intracardíaca per a l'obtenció de mostres de sang. A continuació, es feia una incisió a la zona abdominal i els ronyons s'extreien i pesaven. Una meitat d'un ronyó es conservava en una solució de formalina (Sigma) per a la posterior inclusió en parafina. La resta del teixit renal es congelava en nitrogen líquid i guardava a -80°C. El pàncrees també es recollia i conservava en la seva totalitat en solució de formalina (Sigma) per a la inclusió en parafina i pel posterior estudi histològic. La sang extreta es processava per centrifugació durant 10minuts a 8000g a 10°C de temperatura i el sèrum obtingut, transferit i guardat a -20°C.

C.6. IMMUNOTINCIÓ D'INSULINA EN ELS ILLOTS PANCREÀTICS

Es van tallar en micròtom seccions de 3µm de gruix de teixit pancreàtic inclòs en parafina. Per al marcatge de la insulina de les cèl·lules β pancreàtiques i l'estudi del grau d'insulinitis, es va realitzar la tècnica d'immunohistoquímica. El protocol emprat va ser el següent: els talls prèviament desparafinats, es van bullir 10 minuts en citrat sòdic 0,01M pH6.0 per a assegurar-ne l'exposició antigènica. Per a inhibir la peroxidasa endògena es van incubar les mostres amb H₂O₂ diluïda al 3% en tampó Tris salí tamponat 1x (TBS1x) durant 10 minuts protegits de la llum. El bloqueig de les unions inespecífiques es va realitzar amb una solució que contenia 1% d'albumina de sèrum boví (BSA, AppliChem) i 1% de sèrum fetal boví inactivat (FBS Premium South America Origin, Biowest) en TBS1x durant 60 minuts a temperatura ambient. L'anticòs primari contra insulina (monoclonal de conill, C27C9 CellSignaling Technology) diluït 1/800 en solució de bloqueig, es va incubar durant 90 minuts a temperatura ambient.

L'anticòs secundari, que es va incubar durant 45 minuts a temperatura ambient, és de tipus monoclonal anti-conill (EnVision, Dako) i consisteix en un polímer marcat amb la peroxidasa HRP i conjugat a immunoglobulines generades en cabra contra anticossos de conill. El revelat es va realitzar amb un substrat cromogènic de l'HRP, la 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durant 3 minuts i el contratenyit dels nuclis amb hematoxilina al 30% durant 30 segons. Les mostres es van deshidratar i muntar amb el medi de muntatge DPX (una mescla de distirè, tricresyl fosfat (un plastificant) i xilol).

C.7. ESTUDI D'APOPTOSI DE LES CÈL·LULES β DELS ILLOTS PANCREÀTICS

L'estudi de la mort cel·lular programada en els illots β pancreàtics es va realitzar mitjançant la tècnica TUNEL (*deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling*). Breument, la fluoresceïna-dUTP s'uneix a l'extrem 3'OH de les cadenes trencades d'ADN (o *nicks*) per mitjà de l'enzim TdT. Al seu torn l'anticòs anti-fluoresceïna conjugat a la peroxidasa POD s'uneix a la fluoresceïna-dUTP. En afegir el substrat cromogènic DAB es duu a terme una reacció colorimètrica sobre les molècules de fluoresceïna que la transferasa ha unit als extrems trencats 3'OH de l'ADN, una de les característiques de les cèl·lules apoptòtiques. L'anàlisi es va realitzar mitjançant el comptatge de les cèl·lules positives per tinció d'apoptosi a través del microscopi òptic Olympus BX61.

D. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA

D.1. DETERMINACIÓ DE LA GLICÈMIA CAPIL·LAR

Per a l'estudi de l'evolució de la nefropatia en animals diabètics, un segon grup d'animals independent de l'estudi de l'homeòstasi de la glucosa i de la insulina es va començar a controlar a les 12 setmanes d'edat per determinar-ne l'aparició de diabetis. Quinzenalment (a les 12, 14, 16, 18, 20, 22 i 24 setmanes d'edat) s'obtenien mostres de sang de la vena caudal dels animals que s'analitzaven mitjançant el glucòmetre Accu-Chek (Roche). Els animals diabètics (considerats així quan apareixen dues mesures de glicèmia capil·lar ≥ 250 mg/mL en dos dies consecutius) van formar part del grup d'estudi de l'evolució de la ND en la nova línia al llarg de 30 dies de seguiment.

D.2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL I LA FREQUÈNCIA CARDÍACA

Durant la darrera setmana dels 30 dies de seguiment de la diabetis es va mesurar la PA tant sistòlica com diastòlica i la freqüència cardíaca mitjançant el mètode no invasiu del manegot a la cua de l'animal (*tail-cuff method*; CODA, Kent Scientific Corporation) (**Figura 30**). Els animals en estat conscient es van immobilitzar en un receptacle cilíndric deixant la cua lliure i es van col·locar sobre un placa tèrmica a 37°C. El sistema funciona amb una bomba que infla i desinfla el manegot col·locat a la cua dels animals produint l'oclusió del flux sanguini i, en el moment de l'obertura, els sensors detecten la PA i el ritme cardíac, expressats en mmHg i en batecs per minut (bpm), respectivament. Es van realitzar un total de 30 mesures per dia per animal. Per a la correcta obtenció de mesures, va ser necessari habituar i entrenar els ratolins (Krege et al. 1995).

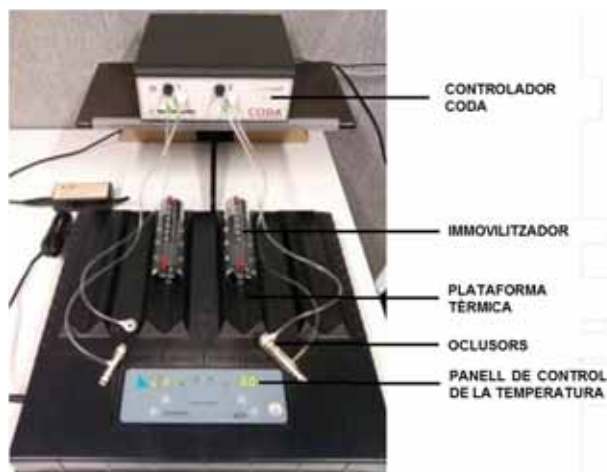


Figura 30.- *Aparell emprat per a la mesura de la PA mitjançant el mètode no invasiu del manegot a la cua de l'animal.*

D.3. CÀLCUL DE LA TAXA DE FILTRACIÓ GLOMERULAR PER BOLUS D'INULINA

Una vegada passats els 30 dies de seguiment i prèviament a la cirurgia final, es va analitzar el filtrat glomerular dels animals mitjançant l'aclariment plasmàtic d'un bolus d'inulina marcada amb el fluorocrom FITC (inulina-FITC, Sigma).

Per a la seva preparació, la inulina-FITC es dissolia en sèrum fisiològic al 5% escalfant la solució al bany maria en aigua en ebullició. Per eliminar la FITC residual

no unida a inulina, es dialitzava la preparació en una membrana Spectra/Por® 6 amb un diàmetre del porus d'1KDa (Spectrum Labs) amb sèrum fisiològic durant 24 hores a temperatura ambient. Posteriorment s'esterilitzava la solució emprant un filtre de 0,22µm de porus (Millex) en campana estèril de flux laminar. Un cop preparada i degudament aliquidada, es realitzava una valoració de la fluorescència basal en fresc. Treballant en placa, es pipetejaven rèpliques de 0,25 i 0,5µL d'inulina-FITC fresca i fins a 5µL del sèrum d'un animal que no havia rebut el bolus d'inulina-FITC. Donat que el pH afecta el valor de fluorescència de la molècula de FITC, s'afegien 45µL de tampó HEPES 0,5M pH 7,4 i es mesurava el senyal per espectroscòpia de fluorescència a 485nm d'excitació i 538nm d'emissió (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments).

En els animals pesats prèviament, immobilitzats i conscients, es va injectar una dosi d'inulina-FITC de 3,74 µL/gr de pes corporal via vena caudal mitjançant una agulla de 30G. Es van extreure 20µL de sang per massatge caudal als minuts 3, 7, 10, 15, 35, 55 i 75 després de la injecció del bolus, que es van recollir en tubs amb heparina de liti (Microvette® 100, Starstedt). Les mostres es van centrifugar durant 10 minuts a 8000g a una temperatura de 4°C per a l'obtenció de plasma. La fluorescència es va detectar directament en placa amb 5µL dels plasmes obtinguts i 45µL de tampó HEPES 0,5M pH 7,4. Paral·lelament també es va mesurar la fluorescència basal abans de la injecció del bolus (control). Per l'obtenció del valor de fluorescència continguda en 1µL de la solució d'inulina-FITC, es van utilitzar rèpliques de 0,25 i 0,5µL d'inulina-FITC sobrant de l'emprada per injectar els animals diluïdes en 5µL del sèrum d'un animal al que no se li havia injectat el bolus i 45µL de tampó HEPES 0,5M pH 7,4. Es va mesurar la senyal tant de les mostres com del control per espectroscòpia de fluorescència a 485nm d'excitació i 538nm d'emissió (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments)

Els valors de fluorescència obtinguts es van analitzar amb un model matemàtic d'aclariment de dos compartiments. Segons aquest model, la fase de caiguda ràpida es correspon a la distribució inicial del compost inulina-FITC del compartiment vascular cap als teixits. En aquesta fase, l'aclariment a nivell sistèmic constitueix una fracció irrellevant. En la segona fase de caiguda lenta, en canvi, l'aclariment sistèmic del compost inulina-FITC és el procés predominant. A partir d'aquest model i amb el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.), es va obtenir una corba de descens exponencial de dues fases mitjançant una regressió no lineal, representada segons l'equació: $Y = Ae^{-atx} + Be^{-\beta tx} + \text{Plateau}$. En l'equació, Y correspon a la concentració plasmàtica de la inulina-FITC, A i B als valors d'intersecció de l'eix y de

les dues taxes de decaïment (ràpida i lenta) i α i β les constants de decaïment de les fases de distribució i eliminació respectivament, sent t_x qualsevol punt de temps. Per tant, mitjançant el pendent obtingut per cada una de les corbes de descens es van obtenir els valors de l'aclariment de la inulina-FITC. A partir dels valors dels pendents de cadascuna de les corbes de descens, el volum d'inulina injectat per animal i el valor de la fluorescència en 1 μ L d'inulina-FITC es van calcular els valors de TFG per animal. Els resultats es van expressar en μ L/minut (<https://www.diacomp.org/>, Sturgeon et al. 1998).

D.4. CIRURGIA I EXTRACCIÓ DE MOSTRES AL FINAL D'ESTUDI

Passats els 30 dies de seguiment es va procedir a l'eutanàsia dels animals a punt final d'estudi. Prèviament a la injecció del bolus d'inulina-FITC, es van obtenir les mostres d'orina per massatge abdominal i de sang per massatge caudal. Passats els 75 minuts d'estudi del TFG, els animals es van anestesiar via i.p. amb una solució de pentobarbital (200mg/mL) diluïda 1/10 en sèrum salí a una dosi de 45mg/Kg. Havent comprovat que els animals no presentaven reflex plantar, es va recollir sang per punció cardíaca. Finalment es va provocar un pneumotòrax i es va practicar una incisió a l'aurícula dreta. Mitjançant una punció transcardíaca es van reperfondre els òrgans amb tampó fosfat-salí (PBS) fred per eliminar el contingut corporal sanguini. Es varen extreure i pesar els ronyons per a la posterior valoració del quocient pes renal/pes corporal. La meitat del ronyó dret es va destinar a la conservació en formalina (Sigma) per a la inclusió en parafina i la posterior anàlisi histològica. La resta del teixit renal es va congelar en nitrogen líquid i guardar a -80°C. Així mateix es va procedir a l'extracció del pàncrees. La meitat del teixit es va destinar a la conservació en formalina mentre que l'altra meitat era congelada a -80°C tal i com es procedia amb el teixit renal. També es va extreure i congelar a -80°C el cor, prèviament pesat per a la valoració del quocient del pes cardíac/pes corporal. Les mostres sanguínies van ser processades per centrifugació durant 10minuts a 8000g a 10°C de temperatura i el sèrum obtingut, transferit i guardat a -20°C. Les mostres d'orina van ser netejades d'impureses mitjançant un centrifugat ràpid i es van guardar a -20°C.

D.5. MESURA DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA D'ALBÚMINA

L'orina obtinguda al final de l'estudi es va utilitzar per a determinar els nivells d'albuminúria. Al ser orina provinent d'una recollida puntual (*spot* urinari), es va calcular la concentració d'albúmina i es va dividir per la concentració de creatinina, un metabòlit de degradació muscular d'eliminació renal. Les determinacions es van fer mitjançant kits comercials (Albuwell M i Creatinine Companion, ambdós d'Exocell).

De manera general, la detecció de l'albúmina es basa en una tècnica d'ELISA en la qual la mostra (fase fluïda) i l'anticòs anti-albúmina murina generat en conill s'afegeixen en els pous recoberts amb albúmina (fase estacionària). En funció de la quantitat d'albúmina present en la mostra, l'anticòs s'uneix de manera preferencial a la fase fluïda o a l'estacionària. Amb els rentats es descarta l'excés tant d'anticòs com les unions antigen-anticòs de la fase fluïda. Les unions restants en la fase estacionària es marquen amb un anticòs conjugat a la peroxidasa HRP i es revelen en presència del substrat TMB a través d'una reacció cromogènica. Es tracta, doncs, d'una ELISA competitiva indirecta on la quantitat d'albúmina present a la mostra és inversament proporcional a la intensitat del color detectat. Entrant en detall, per a la tècnica es van incubar durant 30 minuts a temperatura ambient 50µL de mostra diluïda 1/13 i 50µL d'anticòs anti-albúmina en placa, juntament amb la recta patró. Passat aquest temps, es van rentar 10 vegades els pous amb un tampó i, acte seguit, es varen afegir 100µL de l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa HRP per a tornar a incubar durant 30 minuts en les mateixes condicions. Després de 10 rentats més, es van afegir 100µL de la solució de revelat TMB i, passats 5 minuts, la reacció de viratge de color es va parar amb l'addició de 100µL d'àcid sulfúric 2N. L'absorbància de la reacció generada es va mesurar per espectrofotometria a 450nm (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments). Les mesures es realitzaren per duplicat. Els resultats obtinguts es van extrapol·lar a la recta patró expressada en escala semi-logarítmica, on l'absorbància en l'eix y es va representar en funció de la concentració d'albúmina de la recta patró en l'eix x, seguint l'equació: $\log_{10}[MSA]=mA_{450}+b$, on MSA és la concentració d'albúmina murina. La concentració d'albúmina en la mostra es va calcular a través del logaritme invers de la concentració extrapolada. Els resultats obtinguts es van expressar en µg d'albúmina/mL.

La detecció de creatinina en les mateixes mostres d'*spot* urinari es va realitzar segons la tècnica clàssica descrita per Jaffé (Husdan & Rapoport 1968). Així, la creatinina present a la mostra interacciona amb l'àcid pícric en una solució alcalina generant la formació del complex àcid pícric-creatinina i una reacció colorimètrica

proporcional a la quantitat de creatinina present a la mostra. En concret, 20 μL de mostra d'orina diluïda 1/20 en H_2O miliQ i 20 μL de la recta patró es mesclaven amb 100 μL de picrat alcalí en plaques de 96 pous. Es va deixar incubar durant 10 minuts a temperatura ambient i es mesuraven les mostres per espectrofotometria a 500nm (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments). A continuació, s'afegia la solució àcida i després d'una incubació de 5 minuts a temperatura ambient, es tornaven a llegir les mostres per espectrofotometria en les mateixes condicions anteriorment especificades. Les mostres es mesuraven en duplicat i els resultats obtinguts es van expressar en mg de creatinina/dL.

Finalment els valors d'EUA es van calcular amb el quocient albúmina/creatinina que es van expressar en μg d'albúmina/mg de creatinina.

D.6. ANÀLISI DE L'ÀREA GLOMERULAR I L'ÍNDEX MESANGIAL

A partir dels ronyons inclosos en blocs de parafina, es van obtenir, per micròtom, seccions de 3 μm de gruix que es van desparafinar en una bateria de xilols i rehidratar en una bateria d'alcohols de concentracions decreixents. Amb la finalitat d'analitzar lesions renals derivades de la diabetis, les seccions dels ronyons es van tenyir amb PAS (*periodic acid Schiff*) en el què la leucofucsina oxida els carbohidrats de la mostra donant lloc a grups aldehid i resultant en una reacció colorimètrica. La tècnica es va realitzar a través d'un procés automatitzat al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar. A partir de la tinció obtinguda es van analitzar l'àrea glomerular i l'índex mesangial.

Es van seleccionar a l'atzar 20 glomèruls per animal estudiat, assegurant la presència del pol vascular per reduir la probabilitat d'incloure glomèruls tallats tangencialment, i es van prendre fotografies amb el microscopi òptic Olympus BX61 a 400 augments. L'àrea glomerular es va calcular mesurant la mida del cabdell glomerular amb el software ImageJ (NIH), tal i com s'ha descrit prèviament (Soler et al. 2007a).

La detecció de l'acumulació de matriu mesangial es va mesurar a partir dels mateixos glomèruls. Mitjançant ImageJ, es va identificar la matriu mesangial extracel·lular com a material PAS-positiu i es va obtenir l'àrea total només del material intensament tenyit. Per tant, l'obtenció de l'índex mesangial va resultar del quocient àrea mesangial/àrea glomerular.

D.7. ANÀLISI PODOCITÀRIA

Les cèl·lules podocitàries es van identificar amb la tècnica d'immunohistoquímica per mitjà d'un anticòs que reconeix la proteïna del tumor de Wilm (WT-1) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), un marcador específic de podòcits (Riera et al. 2014). El protocol emprat va ser el següent: es van tallar en micròtom seccions de 3µm de gruix de teixit renal inclòs en parafina. Els talls prèviament desparafinats i rehidratats, eren bullits 5 minuts en citrat sòdic 0,01M pH6.0 per a assegurar una correcta exposició antigènica. Per a inhibir la peroxidasa endògena es van incubar les mostres amb H₂O₂ diluïda al 3% en TBS1x durant 20 minuts en fosc. El bloqueig de les unions inespecífiques es va realitzar amb una solució que contenia 3% d'albumina de sèrum boví (BSA, AppliChem) i 3% de sèrum fetal boví inactivat (FBS Premium South America Origin, Biowest) en TBS1x amb 0,05% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T0,05%) durant 45 minuts a temperatura ambient. L'anticòs primari contra la proteïna WT-1 (policlonal de conill, sc-192 de Santa Cruz) diluït 1/1000 en solució de bloqueig es va incubar durant tota la nit a 4°C. Els dia següent, l'anticòs secundari (monoclonal anti-conill conjugat amb HRP, EnVision, Dako) es va incubar durant 45 minuts a temperatura ambient. El revelat es va realitzar amb el substrat DAB durant 30 segons i el contratenyit dels nuclis amb hematoxilina al 30% durant 30 segons. Les mostres es van deshidratar i muntar amb el medi de muntatge DPX.

Per tal de realitzar el comptatge de podòcits presents en el glomèrul, es va realitzar una anàlisi quantitativa seguint la descripció feta per Wiggins et al. 2005. Amb el microscopi òptic Olympus BX61 es van realitzar fotos de 20 glomèruls per cada animal a 40 augments, assegurant la identificació del pol vascular. En el glomèrul, les cèl·lules positives per WT-1 es van identificar com a podocitàries. Les dades obtingudes es van expressar en nombre de cèl·lules/glomèrul.

D.9. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS DE TEIXIT

Fragments de les porcions congelades a -80°C de còrtex renal i teixit pancreàtic es van homogeneïtzar en gel amb un tampó que contenia 50mM HEPES a pH 7,4; 150mM NaCl, 0,025mM ZnCl₂, 0,5% de Tritó X-100 i 0,1M Pefabloc® SC Plus (Roche) i 0,01M solució protectora del Pefabloc® SC Plus i una barreja d'inhibidors de proteases lliures d'EDTA (Roche). Les mostres es van centrifugar durant 10 minuts a 14000g a una temperatura de 4°C i els sobrenedants obtinguts es van transferir a un nou tub.

La concentració de proteïna es va determinar per la tècnica de l'àcid bicinconínic o BCA (Micro BCA, Thermo Scientific) basada en la reacció de biuret. Aquesta consisteix en la reducció en un medi alcalí dels ions coure ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) degut la proteïna present en la mostra. La posterior detecció del catió Cu^{1+} es realitza per colorimetria a través de l'addició de BCA. Els resultats es van quantificar per espectroscòpia d'absorbància a 562nm (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments) i es van extrapolar a una recta estàndard. La quantificació de la proteïna present en la mostra es va expressar en μg de proteïna/ μL d'extracte.

D.10. EXPRESSIÓ PROTEICA D'ECA I ECA2 EN TEIXIT

L'anàlisi de l'expressió proteica en teixit renal i pancreàtic es va realitzar per electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE). El gel SDS-PAGE d'una dimensió està compost per la barreja d'acrilamida/bisacrilamida, Tris-clorhídric i el detergent dodecil sulfat de sodi (SDS). La polimerització de l'acrilamida/bisacrilamida conforma una matriu sòlida que permet a les proteïnes migrar a través d'una xarxa reticular en funció del pes molecular. L' SDS és un detergent que desnatura les proteïnes desestabilitzant-ne l'estructura terciària i, addicionalment, els confereix una càrrega neta negativa, òptima per a permetre que migrin en sotmetre's a un camp elèctric. Per a la correcta separació proteica, s'usen dues concentracions diferents de la barreja acrilamida/bisacrilamida: en primer lloc, una de baixa per permetre que les proteïnes es concentrin i s'apilin (en aquest cas s'ha emprant 4% d'acrilamida/bisacrilamida). En segon lloc, una d'elevada per permetre que se separin correctament (en aquest cas del 7%). Una vegada les proteïnes s'han separat en el gel SDS-PAGE, cal transferir-les a una membrana de polifluorur de vinilidè (PVDF), que té la propietat de presentar afinitat per aminoàcids permetent que les proteïnes puguin ser accessibles als anticossos. La transferència es realitza en presència d'un camp elèctric i un tampó que permeten que les proteïnes presents en el gel SDS-PAGE migrin cap a la membrana PDVF. Un cop transferides, i amb l'objectiu d'evitar unions inespecífiques dels anticossos, s'incuba la membrana amb una solució proteica, en aquest cas llet desnatada. Finalment, es procedeix a detectar la presència de les proteïnes d'interès a través de la incubació amb anticossos específics.

La separació, detecció i quantificació de les proteïnes d'interès es va realitzar amb $20\mu\text{g}$ de proteïna tant pels extractes renals com pancreàtics. Es van diluir en un tampó de càrrega 4x que contenia 0,21M de TrisHCl pH6,8; 6% d' SDS; 34% de glicerol; 19%

de beta-mercaptoetanol i blau de bromofenol i es van desnaturalitzar durant 5 minuts a 100°C de temperatura. Les mostres es van carregar en el gel SDS-PAGE i es va realitzar l'electroforesi en presència d'un tampó que contenia 25mM de Tris, 192mM de Glicina i 0,1%. D'SDS. Es va utilitzar Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) com a marcador de pes molecular. Una vegada les proteïnes estaven separades en funció del seu pes molecular, es van transferir a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Science) prèviament activada amb metanol 100%. La transferència es realitza mitjançant un sistema semi-sec (Trans-Blot® Turbo™, Bio-Rad) en un tampó que contenia 25mM de Tris, 192mM de Glicina a pH8,3 i metanol al 10%. La membrana amb les proteïnes transferides es va incubar durant 30 minuts a temperatura ambient en agitació amb una solució de bloqueig de les unions inespecífiques que contenia 5% de llet desnatada en tampó TBS amb 0,1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T0,1%). La incubació amb els anticossos pertinents es va realitzar en les condicions que es detallen a continuació:

ANTICÒS PRIMARI	ORIGEN	REFERÈNCIA	DILUCIÓ	ANTICÒS SECUNDARI
ECA2	Rata (monoclonal)	MAB3437, R&D Systems	1:4000	A5795, rata IgG (conill)-HRP, Sigma (1:7000)
ECA	Conill (policlonal)	F940, Bioworld (Antibody BCN)	1:500	A0545, conill IgG (cabra)-HRP, Sigma (1:3000)
βactina	Ratolí (monoclonal)	A1978, Sigma	1:10000	P0447, ratolí IgG (cabra)-HRP, Dako (1:15000)

Taula 11.- Anticossos emprats per a l'anàlisi proteica.

Entre cada incubació, les membranes es van rentar amb TBST-0,1%. La detecció de les proteïnes d'interès es va realitzar mitjançant una reacció de quimioluminiscència (Clarity™ ECL Western Blotting Substrate, Bio-Rad) en pel·lícules fotosensibles (X-Ray Film, AGFA).

Per a la valoració de l'expressió proteica d'ECA en el ronyó, es van densitometrar les àrees corresponents a les bandes proteiques revelades en els films amb l'ajuda del software ImageJ i es va obtenir la quantitat relativa de la proteïna d'interès (ECA) en relació al control de càrrega representat per una proteïna expressada constitutivament (βactina). Per tant, els resultats es van expressar com a quocient ECA/βactina.

D.11. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE L'ECA

L'estudi de l'activitat de l'ECA es va realitzar mitjançant la incubació dels extractes de còrtex renal o les mostres de sèrum amb N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL, Sigma),

un substrat sintètic que al ser tallat per l'enzim present en la mostra, allibera dipèptid His-Leu. Aquest, en presència d'o-ftaldialdehid forma un adducte fluorescent quantificable per espectroscòpia a 360nm d'excitació i 485nm d'emissió (Tecan Infinite 200 reader, TECAN Instruments) (**Figura 31**). La tècnica per tant, es basa en la mesura indirecta de l'activitat de l'ECA mitjançant la detecció de la fluorescència alliberada (Schwager et al. 2006).

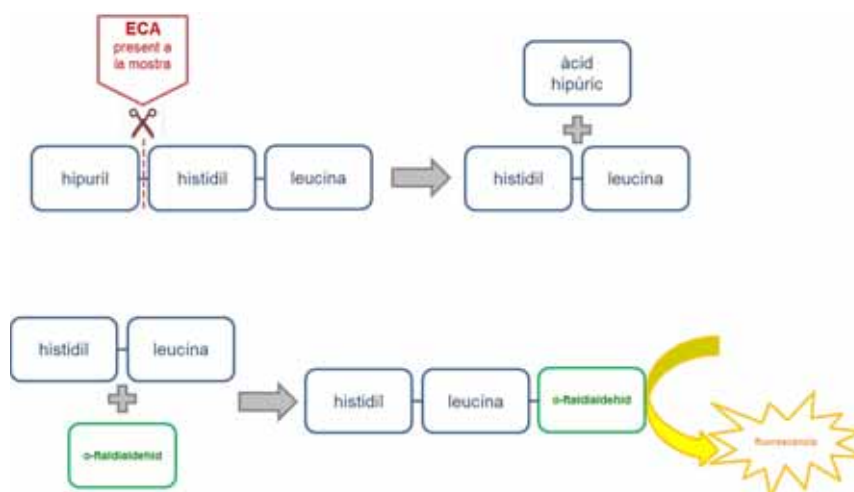


Figura 31.- Esquema de les reaccions principals en el tècnica de detecció de l'activitat enzimàtica de l'ECA. 1) L'ECA present a la mostra talla el substrat sintètic HHL per generar àcid hipúric i el dipèptid histidil-leucina. 2) El dipèptid forma un adducte fluorescent en presència de l'o-ftaldialdehid.

L'activitat enzimàtica de l'ECA mesurada en extractes renals i en el sèrum dels animals d'estudi, presenta certes diferències de procediment que es detallen a continuació.

Còrtex renal: 1µL d'extracte proteic es va incubar amb 74µL d'un tampó de treball que contenia 0,4M de borat sòdic pH 8,3 i 5,5mM del substrat sintètic HHL durant 25 minuts a 37°C. Per a aturar la reacció es van afegir 180µL d'hidròxid sòdic 0,28M i a continuació es van incubar les mostres amb 15µL d'o-ftaldialdehid (en metanol 100% a una concentració de 20 mg/mL) en fosc durant 10 minuts a temperatura ambient. La formació de l'adducte es va frenar afegint 30µL de d'àcid clorhídric 3N i es van centrifugar les mostres durant 5 minuts a 800g. El sobrenedant es transferir en placa fosca (Nunc™ F96 MicroWell™ Black Polystyrene Plate, LabClinics) i es va mesurar la

intensitat per espectroscòpia de fluorescència. Els valors obtinguts es van corregir en funció de la quantificació proteica. Les mostres es varen mesurar en duplicat. Els resultats s'expressaren en unitats de fluorescència relativa (RFU)/ μg de proteïna.

Sèrum: $2\mu\text{L}$ de la mostra diluïda 1/8 en solució salina i es van incubar amb $73\mu\text{L}$ d'un tampó de treball que contenia $0,4\text{M}$ de borat sòdic pH 8,3 i $5,5\text{mM}$ del substrat sintètic HHL durant 25 minuts a 37°C en plaques fosques per a protegir de la llum. Els següents passos de la tècnica es realitzaren com s'ha esmentat anteriorment. Les mostres es varen mesurar en duplicat. Els valors obtinguts es van corregir pel factor de dilució (1/4) i els resultats es van expressar en RFU/ μL de sèrum.

D.12. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb SPSS versió 18.0.0 per Windows. Les variables quantitatives s'expressen com la mitja i l'error estàndard de la mitja ($\pm\text{EEM}$). Les variables qualitatives s'expressen com a percentatges. L'estudi de la normalitat de les variables es va realitzar segons el test de Kolmogorov–Smirnov. S'ha emprat el test de test de Xi-quadrat per a la comparació de variables qualitatives. Per a la comparació entre mitges s'ha emprat els test de T-student i d'U Mann-Whitney, en els casos en què la variable no segueix una distribució normal. Per a la comparació entre mitjanes amb més de dues categories s'ha usat un test d'ANOVA. La significació estadística es va establir per una $p\leq 0,05$.

V. RESULTATS

V. RESULTATS

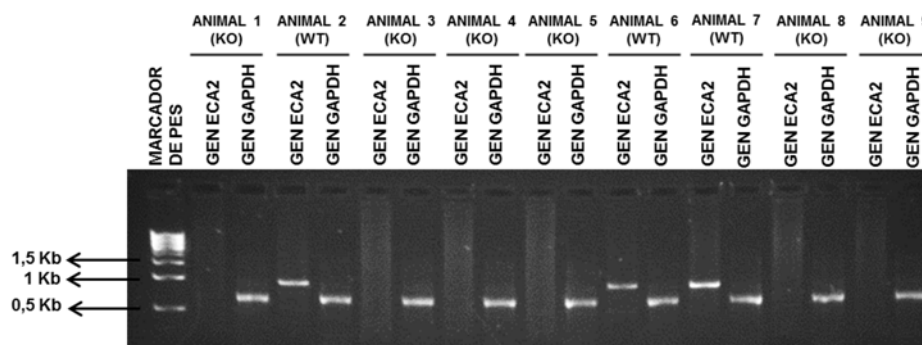
A. OBTENCIÓ DE LES NOVES LÍNIES NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-}

A.1. RESULTAT DEL GENOTIPAT

A.1.1. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Per a realitzar el canvi de fons, i com a part del procés de cria, a cada generació es va realitzar el genotipat i la selecció de progenitors per a la següent generació.

La presència d'una banda de pes aproximat d'1Kb (corresponent als 890pb de la regió d'amplificació) en el gel d'agarosa indicava que l'animal presentava el gen de l'*eca2* i corresponia així al grup *wild-type* (WT). L'absència de banda en el carril del gen de l'*eca2* indicava que l'animal era *knockout* (KO). Per a cada mostra també es va amplificar el gen control *gapdh* (**Imatge 2**).

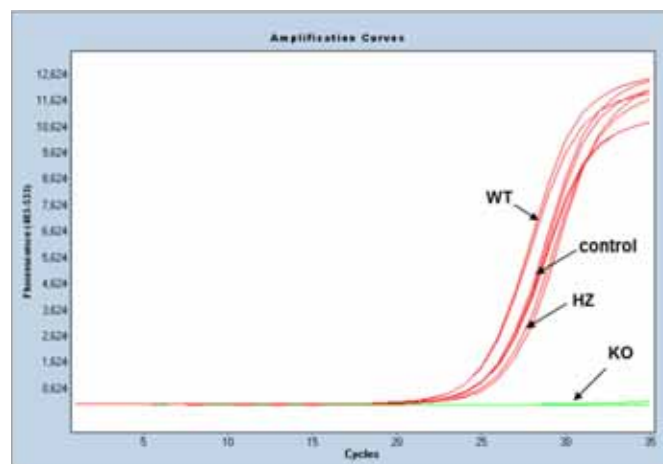


Imatge 2.- Anàlisi de la deleció del gen de l'*eca2*. En la figura es mostra el resultat d'un genotipat en un gel d'agarosa durant el procés de canvi de fons. Els animals KO no presenten banda per *eca2* (en aquest cas: animals 1, 3, 4, 5, 8 i 9). Els animals WT presenten una banda de 890pb (en aquest cas: animals 2, 6, 7). Paral·lelament, es va amplificar també el gen *gapdh* per a cada animal com a control.

A.1.2. PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Durant el procés de canvi de fons, es van obtenir animals heterozigots (+/-) i *wild-type* (wt) pel gen de l'*eca2*, no diferenciables per PCR clàssica. Per aquest motiu, es va fer un abordatge per mitjà de qPCR (**Imatge 3**). Per a la determinació de la càrrega gènica d'ECA2 en les nostres mostres es va emprar el valor C_T, definit com el número

de cicles de PCR en què se supera el nivell basal de fluorescència i s'inicia la fase exponencial d'amplificació gènica. Per tant el valor C_T és inversament proporcional a la quantitat de còpies de l'ADN d'interès. Valors baixos de C_T indicaven major càrrega gènica d'ECA2 mentre que valors elevats indicaven menor càrrega. La diferència de cicles d'amplificació (ΔC_T) entre la seqüència del control intern (zona d'amplificació que no es troba en el fragment deletionat) i la seqüència de la mostra d'interès, va conformar el criteri per a la distinció entre les femelles *wild-type* i les heterozigotes per *eca2*. Així, les femelles *wild-type* presenten les corbes d'amplificació abans del control intern ($\Delta C_T \geq 0$) mentre que les femelles heterozigotes les presenten després ($\Delta C_T < 0$).

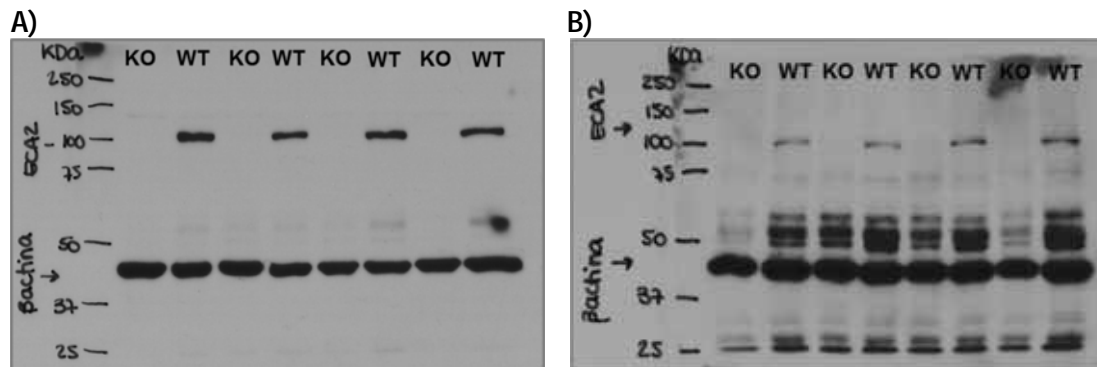


Imatge 3.- Anàlisi de la deleció de l'*eca2* per qPCR. Corbes representatives d'una femella *wild-type* (WT), una heterozigota (HZ) i una *knockout* (KO) en relació als respectives seqüències controls. La femella WT inicia la fase exponencial de la corba d'amplificació abans de la corba del control. La femella HZ inicia la corba d'amplificació després de la corba del control. La femella KO no presenta corba d'amplificació (en verd).

A.2. CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES

A.2.1. COMPROVACIÓ DE LA DELECIÓ DEL GEN *eca2*

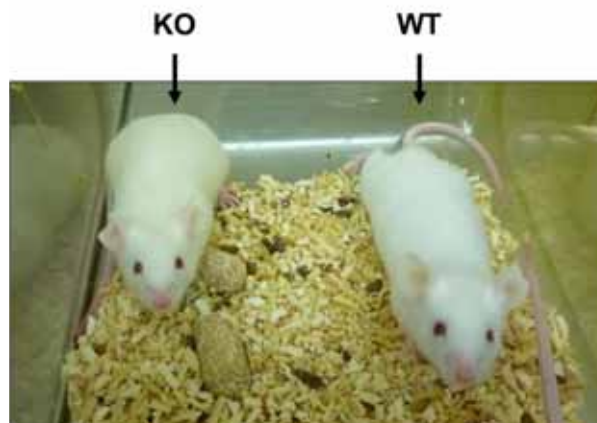
Mitjançant la tècnica de WB es va corroborar l'absència d'ECA2 a nivell proteic en teixit renal i pancreàtic d'animals KO a la desena generació. Com s'aprecia a la **Imatge 4**, els animals WT presenten una banda corresponent a ECA2 mentre que els animals *knockout* per ECA2, no s'aprecia. Aquests resultats es confirmen tant per ronyó com per pàncrees.



Imatge 4.- Expressió proteica de l'ECA2 en ronyó i pàncrees. Confirmació del genotip mitjançant l'anàlisi de l'expressió proteica per tècnica de WB en teixit renal (A) i teixit pancreàtic (B). En ambdós òrgans els animals identificats com WT mostren presència de la proteïna ECA2 (pes molecular aproximat de 100KDa) i els animals KO no mostren senyal en aquesta alçada. El control de càrrega es va fer a través de la detecció de β -actina (45KDa).

A.2.2. COLOR DEL PELATGE

Vàrem observar que els animals *knockout* per ECA2 sota el fons genètic NOD o NOR presenten un pelatge més fosc i groguenc en comparació amb els ratolins *wild-type* (Imatge 5).



Imatge 5.- Color del pelatge en ratolins WT i KO per ECA2. Comparativa del pelatge en la soca NOD, entre un animal amb deleció d'ECA2 (NOD.ACE2^{-/-} a l'esquerra de la imatge) i amb presència d'ECA2 (NOD.ACE2^{+/+} a la dreta de la imatge).

A.2.3. PES CORPORAL

A.2.3.1. LÍNIA NOD.ACE2^{-/-}

Els animals NOD.ACE2^{-/-} presenten menor pes corporal en comparació als NOD.ACE2^{+/+} abans i després d'un període de dejú, tant si aquest és curt després de 5 hores com perllongat després de 12 hores (*p≤0,05 NOD.ACE2^{+/+} vs. NOD.ACE2^{-/-}) (Figura 32).

Per comprovar si els dos grups (*knockout* i *wild-type*) presenten diferències al llarg de les 12 setmanes de seguiment (de la setmana 12 a la setmana 24), s'ha analitzat la variància dels resultats amb un test ANOVA de mesures repetides mensualment. S'observa que els animals NOD.ACE2^{-/-} presenten un menor pes corporal en comparació a NOD.ACE2^{+/+}, tant abans del dejú com després de 5 i 12 hores de dejú durant tot el període de seguiment.

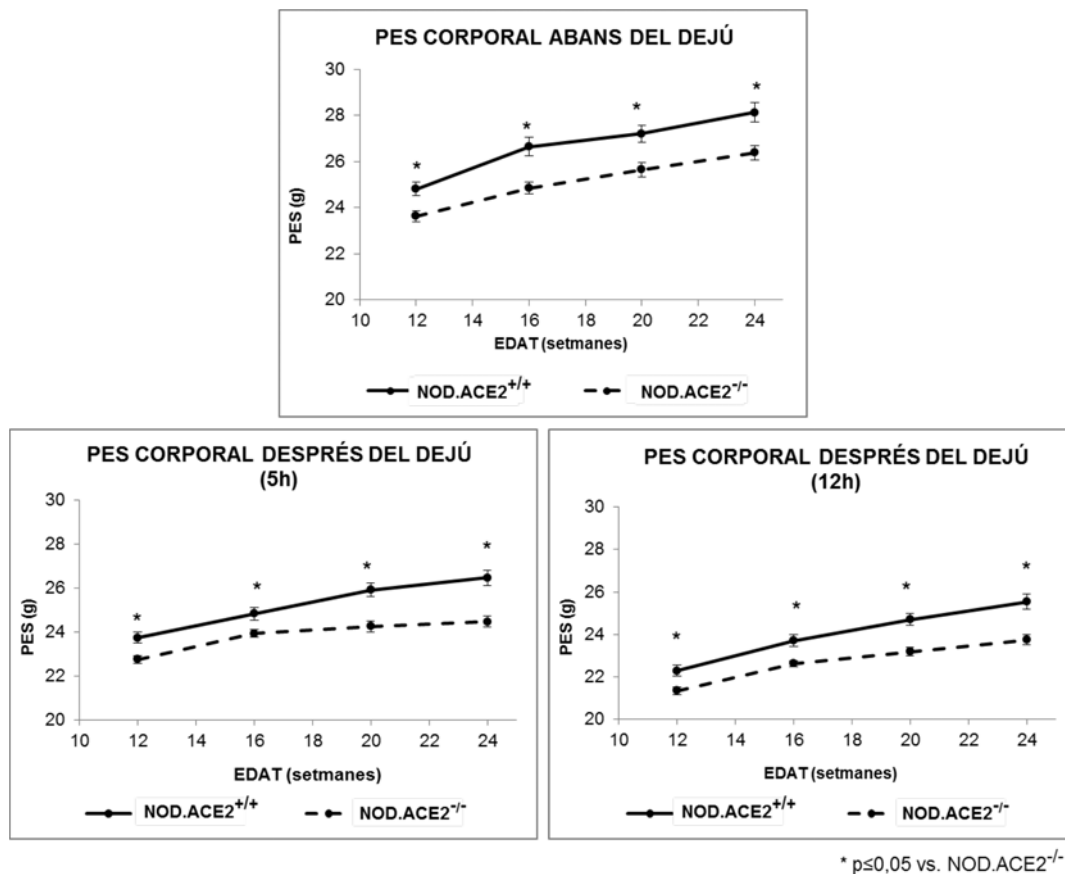


Figura 32.- Evolució del pes corporal expressat en grams a les 12, 16 20 i 24 setmanes d'edat en animals NOD.ACE2^{-/-} i NOD.ACE2^{+/+}. A) Comparativa entre els pesos

abans de l'inici del dejú. S'observa una diferència d'1,21g, d'1,80g, d'1, 56g i d'1,76g de pes entre els ratolins KO i WT a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat respectivament. B) Comparativa entre els pesos després del dejú de 5 hores. C) Comparativa dels pesos després del dejú de 12h. Les línies contínues corresponen als animals NOD.ACE2^{+/+}, les línies discontinúes corresponen als animals NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD.ACE2^{+/+} vs. NOD.ACE2^{-/-}.

A.2.3.2. LÍNIA NOR.ACE2^{-/-}

Els animals NOR.ACE2^{-/-} presenten menor pes corporal en comparació als NOR.ACE2^{+/+} (Figura 33) abans del dejú, a les 16 i 20 setmanes d'edat; passades 5 hores de dejú, a les 12, 16 i 20 setmanes i a les 12 hores de dejú, a les 12 i 16 setmanes d'edat, en comparació als animals NOR.ACE2^{+/+} (Figura 33). No s'observen diferències significatives en el pes a les 24 setmanes d'edat, ni abans ni després del dejú (p=NS). No s'observen diferències en relació al pes al final del seguiment.

Si estudiem l'evolució del pes en global, l'ANOVA de mesures repetides mostra una disminució significativa en el pes corporal al llarg del seguiment en el grup NOR.ACE2^{-/-} comparació al NOR.ACE2^{+/+} només després de 12 hores de dejú.

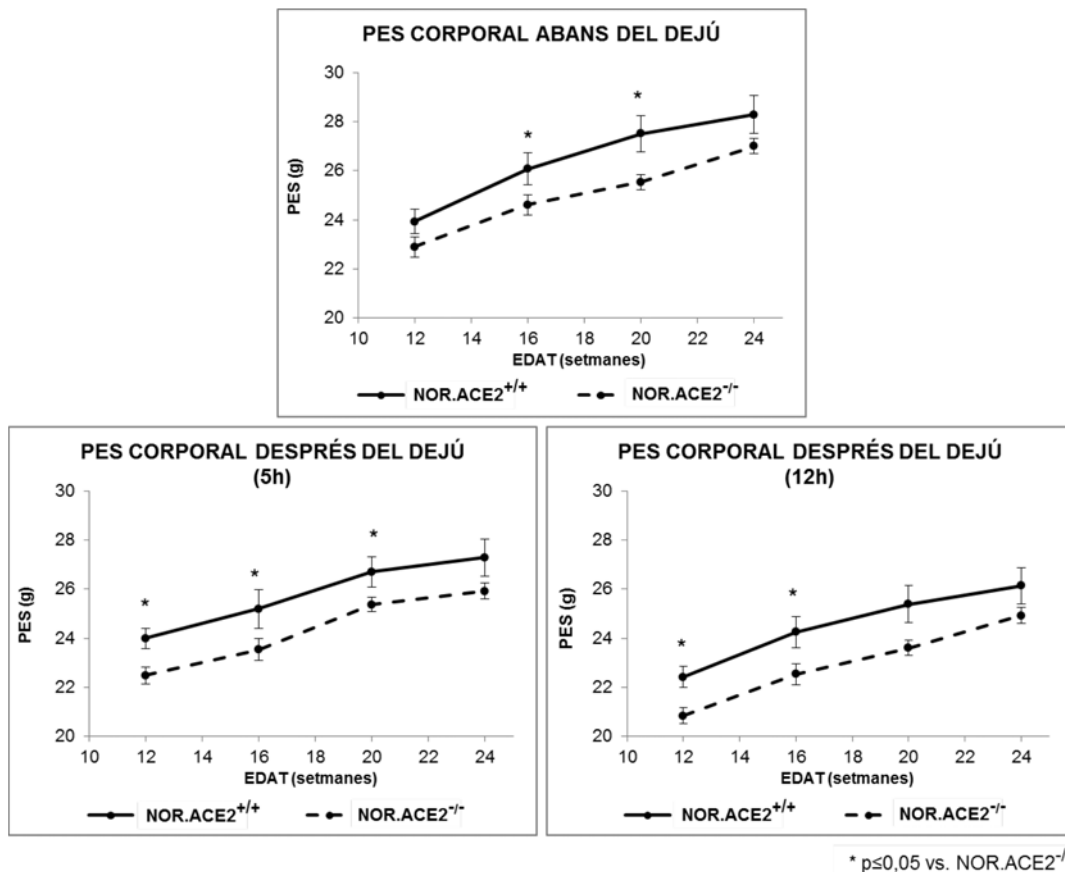


Figura 33.- Evolució del pes corporal expressat en grams a les 12, 16 20 i 24 setmanes d'edat en animals NOR.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{+/+}. A) Comparativa entre els pesos abans de l'inici del dejú. B) Comparativa entre els pesos després del dejú de 5 hores. C) Comparativa dels pesos després del dejú de 12h. Les línies contínues corresponen als animals NOR.ACE2^{+/+}, les línies discontinúes corresponen als animals NOR.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOR.ACE2^{+/+} vs. NOR.ACE2^{-/-}.

B. ESTUDI DE L'HOMEOSTASI DE LA GLUCOSA I LA INSULINA EN EL MODEL NOD.ACE2^{-/-}

Per a l'estudi de la glucosa i la insulina, es van incloure el nombre d'animals especificats a la **Taula 12**. Donat a que es coneix que la soca NOD és la que desenvolupa diabetis i la soca d'interès principal en la deleció del gen de l'ECA2 es va plantejar l'estudi inicial amb una inclusió major que en la soca NOR.

GRUP	NOD.ACE2wt	NOD.ACE2ko	NOR.ACE2wt	NOR.ACE2ko
N estudiada	75	75	15	16

Taula 12.- N d'animals inclosos en l'estudi de la homeòstasi de la glucosa i de la insulina.

B.1. EVOLUCIÓ DE LA GLICÈMIA BASAL

S'han comparat els valors de les glicèmies basals entre els diferents grups d'estudi després del dejú (de 12 i 5 hores en cada cas) abans de l'administració dels bolus de glucosa i d'insulina, respectivament. Els resultats es mostren en la **Taula 13** i **Taula 14**.

La **Taula 13** mostra que els animals WT presenten diferències en la glicèmia basal després de 12 hores de dejú. Així, els ratolins NOD presenten un augment significatiu de la glicèmia després de 12 hores de dejú a les 16 en comparació amb els NOR (NOD.ACE2^{+/+}: 78,3±1,2mg/dL vs. amb NOR.ACE2^{+/+}: 72,1±1,8; \$p≤0,05) i a les 24 setmanes d'edat (75,3±1,1mg/dL en NOD.ACE2^{+/+} vs. 68,6±2, en NOR.ACE2^{+/+}; \$p≤0,05).

En els ratolins amb deleció d'ECA2 de la soca NOD en comparació als de la soca NOR, s'observa un augment significatiu de la glicèmia passades 12 hores de dejú a les 24 setmanes d'edat (78,9±1,9mg/dL en NOD.ACE2^{-/-} vs. 70,5±2,1mg/dL en NOR.ACE2^{-/-}; *p≤0,05).

D'altra banda, l'ANOVA de mesures repetides indica que en global, al llarg de les 12 setmanes de seguiment, els animals no diabètics WT de fons NOD presenten valors de glicèmia basal significativament superiors als animals de fons NOR després d'un dejú de 12 hores.

		GLICÈMIA BASAL (mg/dL) DESPRÉS DE 12 HORES DE DEJÚ			
		12 setmanes	16 setmanes	20 setmanes	24 setmanes
NOD.ACE2 ^{+/+}	Mitja	79,7	78,3 (\$)	79,7	75,3 (\$)
	N	75	71	63	55
	EEM	1,0	1,2	1,4	1,2
NOD.ACE2 ^{-/-}	Mitja	80,6	79,4	78,8	78,9 (*)
	N	74	70	62	47
	EEM	1,1	1,3	1,6	1,9
		12 setmanes	16 setmanes	20 setmanes	24 setmanes
NOR.ACE2 ^{+/+}	Mitja	79,2	72,1	76,4	68,6
	N	15	15	14	14
	EEM	2,0	1,7	2,6	2,3
NOR.ACE2 ^{-/-}	Mitja	77,9	76,2	78,8	70,5
	N	16	16	16	16
	EEM	2,4	2,7	3,1	2,1

* p≤0,05 NOD.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{-/-}
 \$ p≤0,05 NOD.ACE2^{+/+} vs. NOR.ACE2^{+/+}

Taula 13.- Glicèmies basals a les 12 hores de dejú. Mitja de les glicèmies basals obtingudes després de 12 hores de dejú en els grups NOD.ACE2^{+/+}, NOD.ACE2^{-/-}, NOR.ACE2^{+/+} i NOR.ACE2^{-/-} a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat, juntament amb el nombre d'animals estudiats (N) i l'error estàndard de la mitja (EEM). *p≤0,05 NOD.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{-/-}. \$p≤0,05 NOD.ACE2^{+/+} vs. NOR.ACE2^{+/+}.

La **Taula 14** mostra els valors de glicèmia passades 5 hores de dejú. Els ratolins els ratolins de la soca NOD KO presenten alteracions en la glicèmia en comparació als WT a les 16 (164,9±5,4mg/dL en NOD.ACE2^{+/+} vs. 150,4±4,4mg/dL en NOD.ACE2^{-/-}; *p≤0,05) i a les 20 setmanes d'edat (NOD.ACE2^{+/+}: 161,0±5,7mg/dL vs. 171,5±6,6mg/dL en NOD.ACE2^{-/-}, *p≤0,05).

GLICÈMIA BASAL (mg/dL) DESPRÉS DE 5 HORES DE DEJÚ					
		12 setmanes	16 setmanes	20 setmanes	24 setmanes
NOD.ACE2 ^{+/+}	Mitja	150,4	164,9	161,0	184,4
	N	75	71	60	55
	EEM	3,3	5,4	5,7	7,6
NOD.ACE2 ^{-/-}	Mitja	150,5	150,4 (*)	171,5 (*)	172,2
	N	74	68	62	48
	EEM	2,1	4,4	6,6	4,6
		12 setmanes	16 setmanes	20 setmanes	24 setmanes
NOR.ACE2 ^{+/+}	Mitja	154,3	157,4	163,0	164,9
	N	15	11	14	14
	EEM	3,2	3,5	3,3	4,8
NOR.ACE2 ^{-/-}	Mitja	151,7	156,7	158,7	168,8
	N	16	15	16	16
	EEM	2,9	5,0	3,3	3,4

* $p \leq 0,05$ NOD.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{-/-}

Taula 14.- Glicèmies basals a les 5 hores de dejú.- Mitja de les glicèmies basals obtingudes després de 5 hores de dejú en els grups NOD.ACE2^{+/+}, NOD.ACE2^{-/-}, NOR.ACE2^{+/+} i NOR.ACE2^{-/-} a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat, juntament amb el nombre d'animals estudiats (N) i l'error estàndard de la mitja (EEM). * $p \leq 0,05$ NOD.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{-/-}.

B.2. APARICIÓ DE LA DIABETIS

Es van registrar un total de 24 animals diabètics NOD.ACE2^{+/+} i 34 animals diabètics NOD.ACE2^{-/-} sobre un total de 75 animals seguits per cada una de les línies. A partir d'aquestes dades es va calcular el percentatge d'incidència acumulada de diabetis i la taxa d'aparició de la diabetis al llarg de les 13 setmanes de seguiment, des de les 12 setmanes d'edat fins a la fi de l'estudi, a les 25 setmanes d'edat. També es va estudiar l'edat de l'aparició de la diabetis entre els animals KO i WT.

Els resultats (**Figura 34**) mostren que la incidència acumulada de diabetis és superior en els animals NOD.ACE2^{-/-} (45,3%) en comparació als NOD.ACE2^{+/+} (32%) a punt final de l'estudi sense assolir la significació estadística ($p=0,096$).

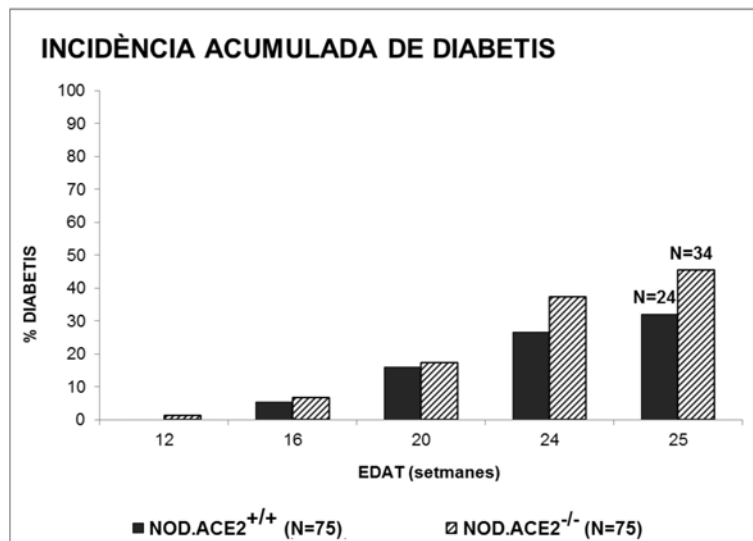


Figura 34.- Incidència acumulada de diabetis entre els grups NOD.ACE2^{+/+} (barres opaques) i NOD.ACE2^{-/-} (barres ratllades) al llarg de les 13 setmanes de seguiment.

D'altra banda, els animals NOD.ACE2^{-/-} presenten una major taxa d'aparició de diabetis pràcticament al llarg de tot l'estudi, excepte en l'interval 17-18 setmanes (Figura 35).

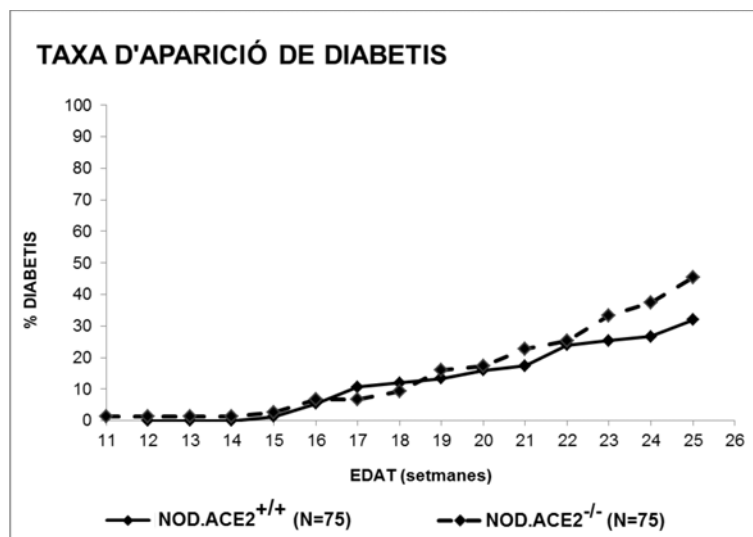


Figura 35.- Taxa d'aparició de diabetis entre els grups NOD.ACE2^{+/+} (línia contínua) i NOD.ACE2^{-/-} (línia discontinua) al llarg de les 13 setmanes de seguiment en l'estudi de l'homeòstasi de la glucosa i la insulina.

L'edat d'aparició de la diabetis no presenta diferències significatives entre els dos grups estudiats: en els animals WT la mitja d'edat és de $20,4 \pm 0,7$ setmanes i en els KO és de $20,8 \pm 0,6$ setmanes. No obstant, en la línia NOD.ACE2^{-/-} s'observen casos de diabetis en animals més joves, ja a les 11 setmanes, en comparació als NOD.ACE2^{+/+} on l'animal més jove registrat tenia 15 setmanes d'edat (**Figura 36**).

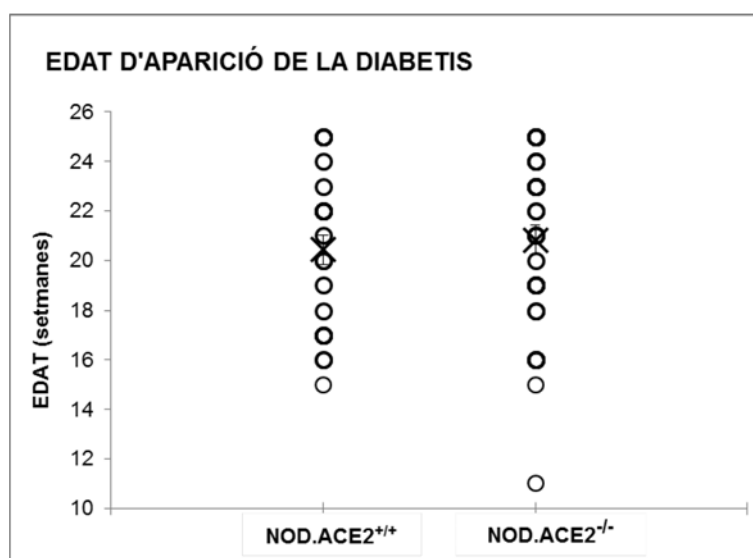


Figura 36.- Edat d'aparició de la diabetis en les línies NOD.ACE2^{+/+} i NOD.ACE2^{-/-}. Cada cercle representa un animal diabètic en funció de l'edat de l'aparició de la malaltia. Les creus indiquen la mitja de l'edat de l'aparició de la diabetis per cada grup.

B.3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL

B.3.1. LÍNIA NOD.ACE2^{-/-}

Els valors de glicèmia obtinguts al llarg dels 120 minuts després l'administració d'un bolus de glucosa a una dosi de 2g/Kg s'expressen a continuació en forma de corbes per a cada punt d'edat del seguiment (**Figura 37**).

Els animals NOD.ACE2^{-/-} en comparació als NOD.ACE2^{+/+} presenten un major augment de la glicèmia en resposta a l'administració del bolus de glucosa. S'observen diferències significatives a les 12 i 16 setmanes en els minuts 15 i 30 post-injecció i al minut 120 a les 16 setmanes d'edat (*p≤0,05).

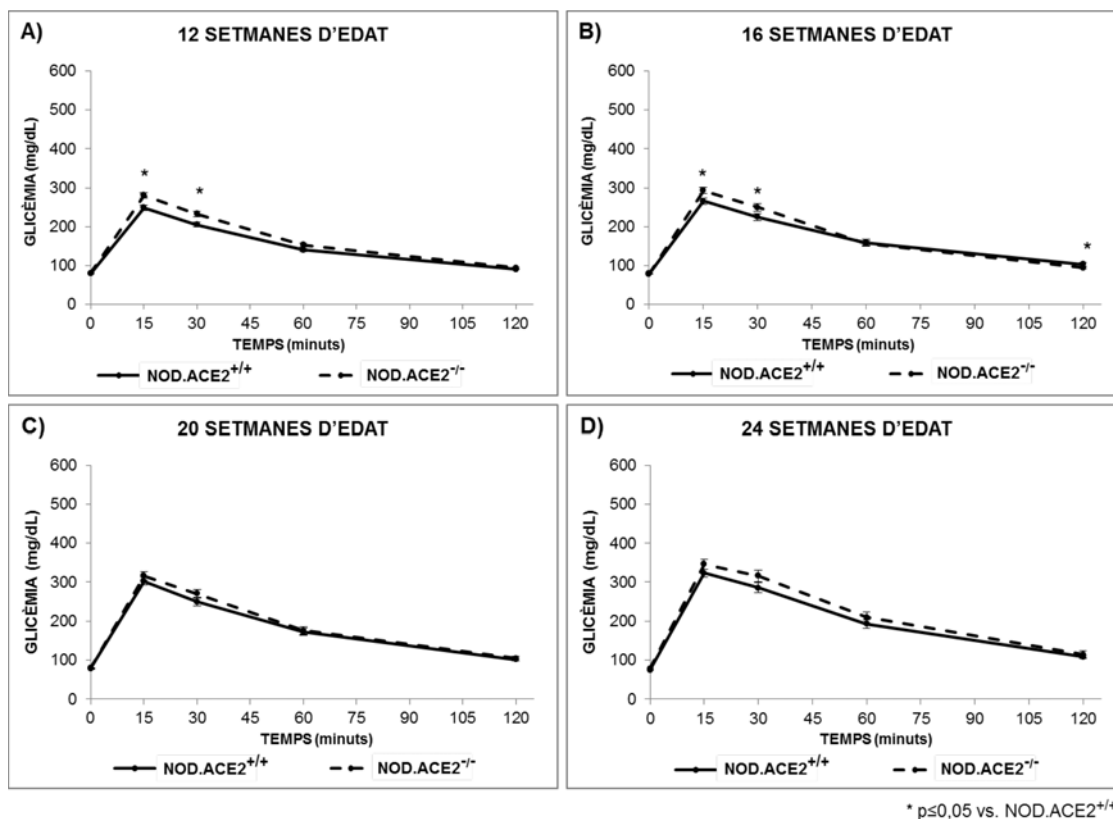
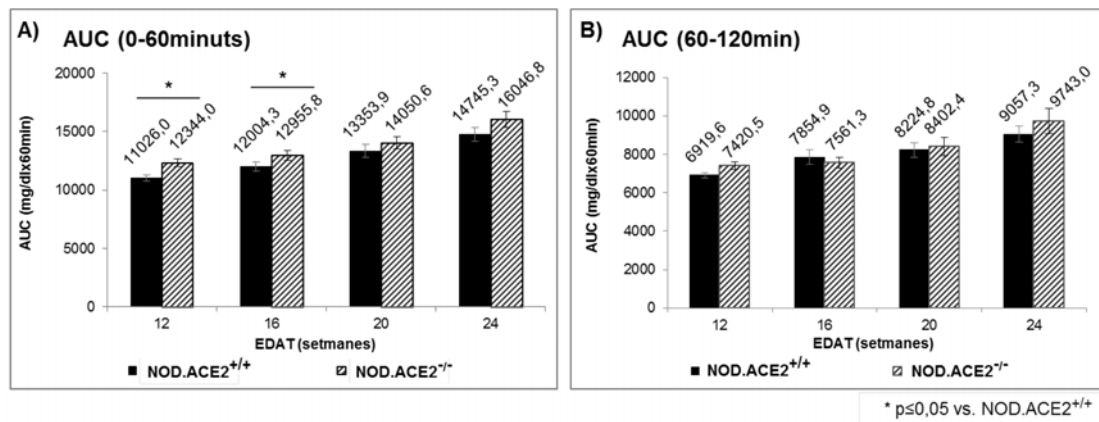


Figura 37.- Test de tolerància a la glucosa intraperitoneal en animals NOD. Corbes de glicèmia obtingudes en les línies NOD.ACE2^{+/+} i NOD.ACE2^{-/-} en resposta a l'administració d'un bolus de glucosa a una dosi de 2g/Kg durant un seguiment de dues hores. A) Corbes a les 12 setmanes d'edat. B) Corbes a les 16 setmanes d'edat. C) Corbes a les 20 setmanes d'edat. D) Corbes a les 24 setmanes d'edat. Les línies contínues corresponen al grup NOD.ACE2^{+/+}. Les línies discontinues corresponen al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p<0,05 NOD.ACE2^{-/-} vs. NOD.ACE2^{+/+}.

S'ha calculat l'àrea sota la corba (AUC) dels valors obtinguts entre els minuts 0-60 i 60-120 del test de glucosa per cada punt d'edat, comparant ambdós genotips (**Figura 38**). Els ratolins amb deleció d'ECA2 mostren una disminució en la tolerància al bolus de glucosa administrat en una primera fase (0-60minuts), presentant diferències significatives en animals joves de 12 i 16 setmanes d'edat. En concret, la mateixa dosi de glucosa indueix un increment de glicèmia major en el grup NOD.ACE2^{-/-} (a 12 setmanes d'edat: 12343,9±335,5 en NOD.ACE2^{-/-} vs. 11026,0±246,26 (mg/dL)x60minuts en NOD.ACE2^{+/+}; i a 16 setmanes d'edat: 12955,8±402,1 en NOD.ACE2^{-/-} vs. 12004,3±411,1 (mg/dL)x60minuts en NOD.ACE2^{+/+}; p<0,05). A partir de les 20 setmanes d'edat, no s'observen diferències en relació a l'AUC. Tampoc

s'observen diferències en l'AUC entre els minuts 60-120 del test en els grups



estudiats.

Figura 38.- *Valors de les AUC en animals NOD.ACE2^{-/-} en comparació als controls NOR.ACE2^{-/-} a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat. A) En una fase inicial, entre els minuts 0 i 60 del test. B) En una segona fase més tardana, entre els minuts 60 i 120 del test. Les barres opaques corresponen al grup NOD.ACE2^{+/+}. Les barres ratllades corresponen al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 NOD.ACE2^{-/-} vs. NOD.ACE2^{+/+}.*

B.3.2. LÍNIA NOR.ACE2^{-/-}

Les glicèmies durant el test de sobrecàrrega de glucosa per a cada punt d'edat també es van mesurar en animals de la soca control NOR resistent a la diabetis (Figura 39).

Contràriament al que s'ha observat en els animals amb el fons NOD, els animals NOR.ACE2^{-/-} presenten menor increment de la glicèmia en resposta a l'administració del bolus de glucosa en comparació als NOR.ACE2^{+/+}. S'observen diferències significatives en els minuts 60 i 120 a les 16 setmanes i en els minuts 15, 30, 60 i 120 a les 24 setmanes d'edat (*p≤0,05 en NOR.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{+/+}).

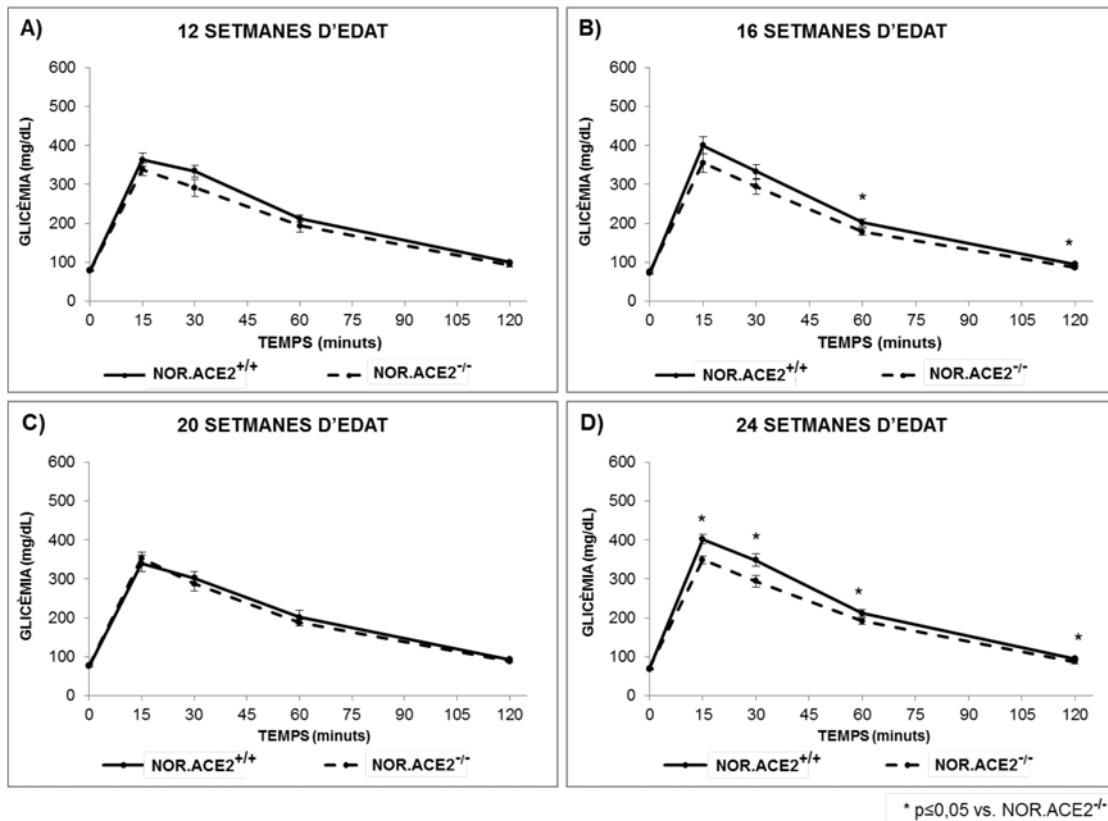


Figura 39.- Test de tolerància a la glucosa intraperitoneal en animals NOR. Corbes de glicèmia obtingudes en les línies NOR.ACE2^{+/+} i NOR.ACE2^{-/-} en resposta a l'administració d'un bolus de glucosa a una dosi de 2g/Kg durant un seguiment de dues hores. A) Corbes a les 12 setmanes d'edat. B) Corbes a les 16 setmanes d'edat. C) Corbes a les 20 setmanes d'edat. D) Corbes a les 24 setmanes d'edat. Les línies contínues corresponen al grup NOR.ACE2^{+/+}. Les línies discontinües corresponen al grup NOR.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 NOR.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{+/+}.

Els resultats de les AUC calculades entre els minuts 0 i 60 mostren com en els animals amb deleció de l'ECA2 hi ha una millor tolerància a la injecció del bolus de glucosa (**Figura 40**), assolint significació estadística a les 24 setmanes d'edat (15276,6 ± 547,9 en NOR.ACE2^{-/-} vs. 17564,5 ± 618,0 (mg/dL)x60minuts en NOR.ACE2^{+/+}; *p ≤ 0,05).

Els valors de les AUC en una fase més tardana del test (minuts 60-120) mostren una millor tolerància al bolus de glucosa en absència d'ECA2 a les 16 setmanes (7921,9 ± 342,8 en NOR.ACE2^{-/-} vs. 8894,0 ± 324,8 (mg/dL)x60minuts en NOR.ACE2^{+/+}; *p ≤ 0,05).

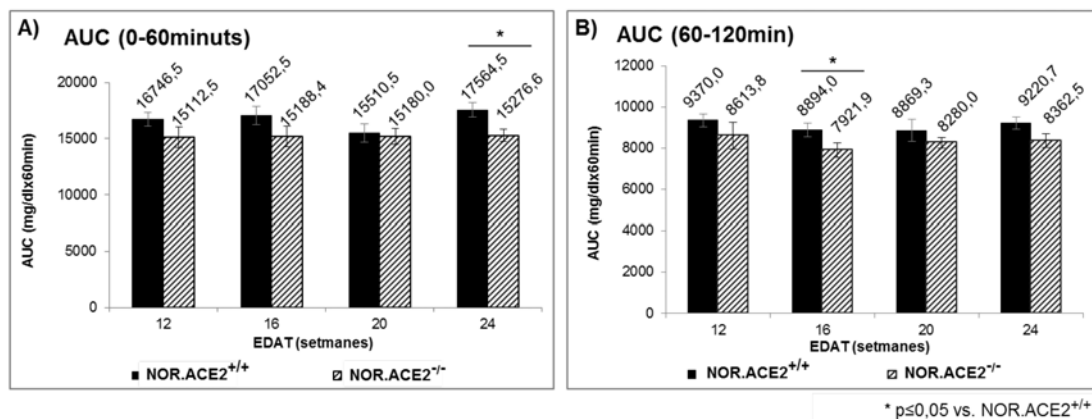


Figura 40.- Valors de les AUC en animals NOR.ACE2^{-/-} en comparació als controls NOR.ACE2^{+/+} a les 12, 16, 20 i 24 setmanes d'edat. A) En una fase inicial, entre els minuts 0 i 60 del test. B) En una segona fase més tardana, entre els minuts 60 i 120 del test. Les barres opaques corresponen al grup NOR.ACE2^{+/+}. Les barres ratllades corresponen al grup NOR.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 NOR.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{+/+}.

B.4. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA INTRAPERITONEAL

B.4.1. LÍNIA NOD.ACE2^{-/-}

Les glicèmies obtingudes al llarg dels 120 minuts després de la injecció d'una dosi de 0,75U/Kg d'insulina intraperitoneal s'expressen en les corbes per a cada punt d'edat de seguiment (**Figura 41**).

En resposta a la mateixa dosi d'insulina, els animals NOD.ACE2^{-/-} presenten una major baixada de la glicèmia i, per tant, una major sensibilitat al bolus d'insulina, en comparació als NOD.ACE2^{+/+} en els minuts 15, 30, 60 i 120 a les 12 setmanes i als minuts 30, 60 i 120 a les 16 i 20 setmanes d'edat. A les 24 setmanes d'edat s'observen diferències al minut 120 (*p≤0,05 en comparació a NOD.ACE2^{+/+}).

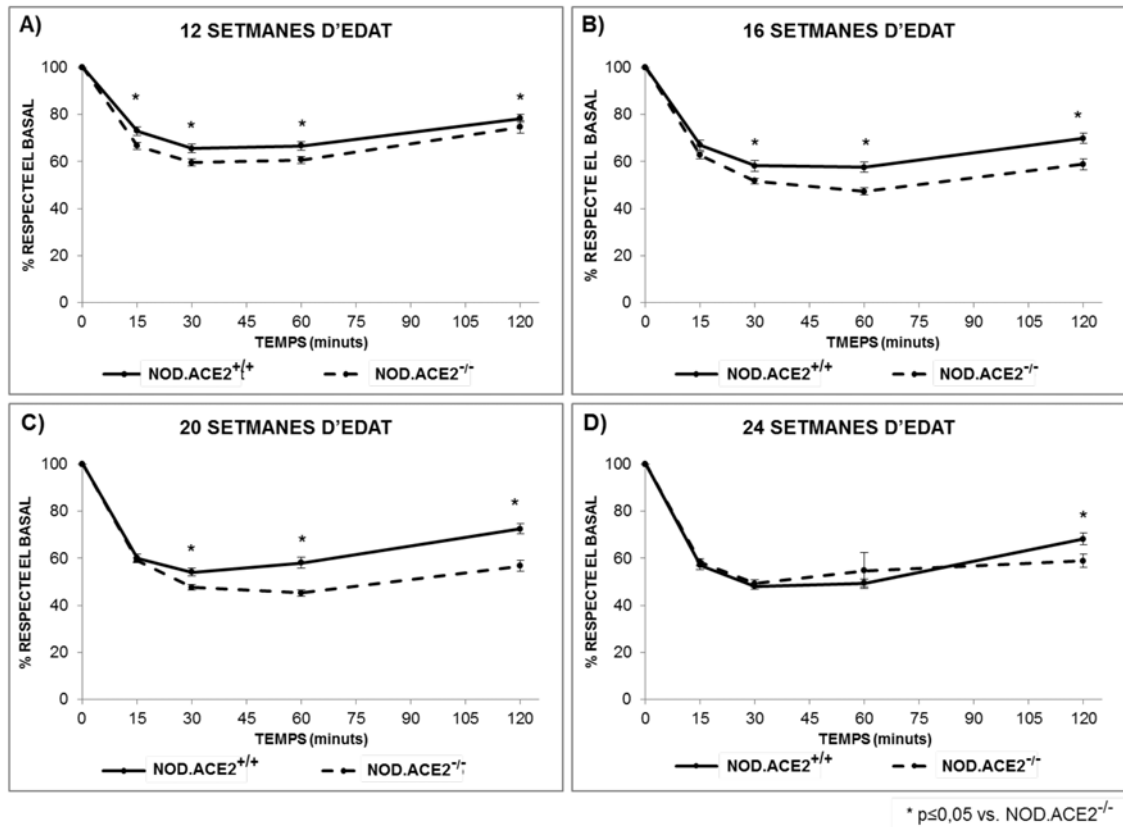


Figura 41.- Test de tolerància a la insulina intraperitoneal en animals NOD. Corbes de glicèmia (expressades com a percentatge respecte el valor basal) obtingudes en resposta a l'administració d'un bolus d'insulina de 0,75U/Kg durant un seguiment de dues hores. A) Corbes a les 12 setmanes d'edat. B) Corbes a les 16 setmanes d'edat. C) Corbes a les 20 setmanes d'edat. D) Corbes a les 24 setmanes d'edat. Les línies contínues corresponen al grup NOD.ACE2^{+/+}. Les línies discontinües corresponen al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 NOD.ACE2^{-/-} vs. NOD.ACE2^{+/+}.

B.4.2. LÍNIA NOR.ACE2^{-/-}

El test de sobrecàrrega d'insulina per a cada punt d'edat de seguiment també es va realitzar en animals de la soca NOR (**Figura 42**).

Contràriament a la soca NOD, s'ha observat que els animals de fons NOR amb deleció de l'ECA2 presenten significativament menor sensibilitat a la insulina al minut 15 a les 12 i 16 setmanes d'edat comparació a NOR.ACE2^{+/+} (*p≤0,05). No s'observen diferències de comportament en les corbes a les 20 i 24 setmanes d'edat.

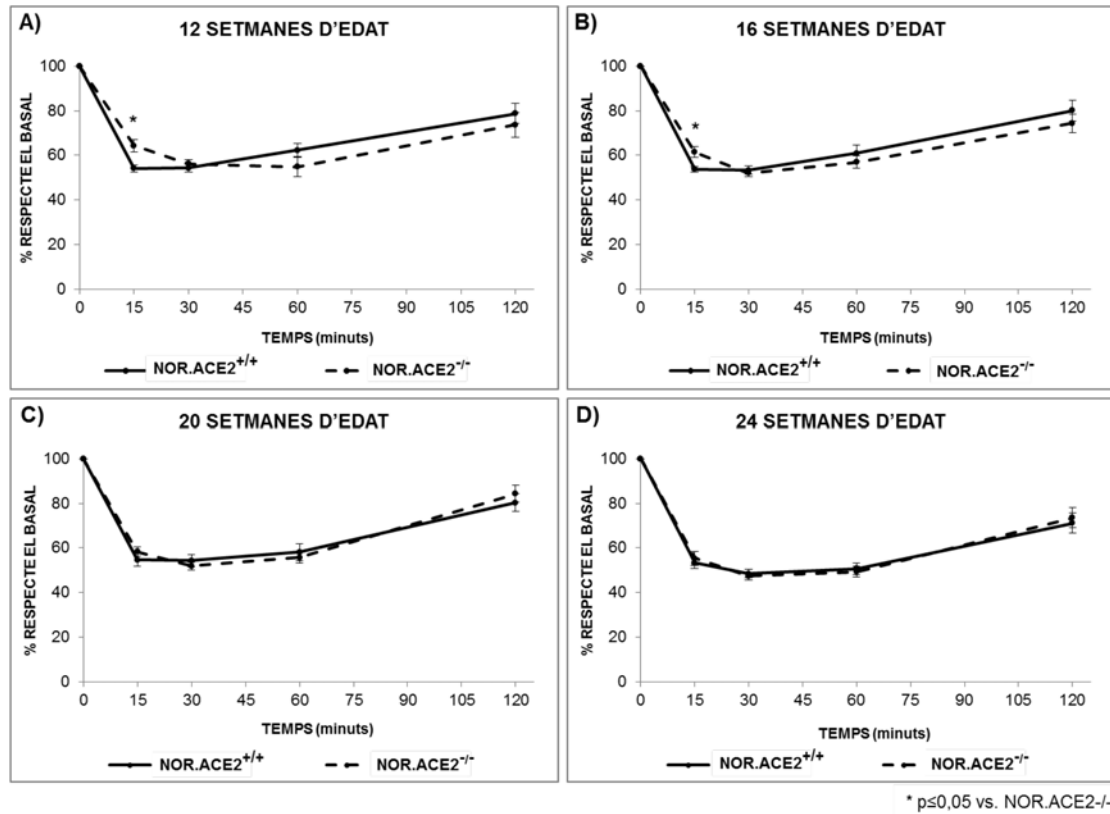


Figura 42.- Test de tolerància a la insulina intraperitoneal en animals NOR. Corbes de glicèmia expressades en relació al percentatge del valor basal, obtingudes en resposta a l'administració d'un bolus d'insulina de 0,75U/Kg durant un seguiment de dues hores. A) Corbes a les 12 setmanes d'edat. B) Corbes a les 16 setmanes d'edat. C) Corbes a les 20 setmanes d'edat. D) Corbes a les 24 setmanes d'edat. Les línies contínues corresponen al grup NOR.ACE2^{+/+}. Les línies discontinues corresponen al grup NOR.ACE2^{-/-}. *p<0,05 NOR.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{+/+}.

B.5. ESTUDI DE LA PRIMERA FASE DE LA SECRECIÓ D'INSULINA

L'estudi de la secreció de la insulina s'ha determinat mitjançant l'AUC dels nivells de secreció d'insulina entre els minuts 0 i 5 després de la injecció del bolus de glucosa. La **Figura 43** mostra que en el grup NOR.ACE2^{-/-} s'observa menor secreció d'insulina en comparació al grup NOR.ACE2^{+/+} a les 12 setmanes d'edat, sense assolir la significació estadística. Aquesta tendència s'accentua a les 16 setmanes (p=NS).

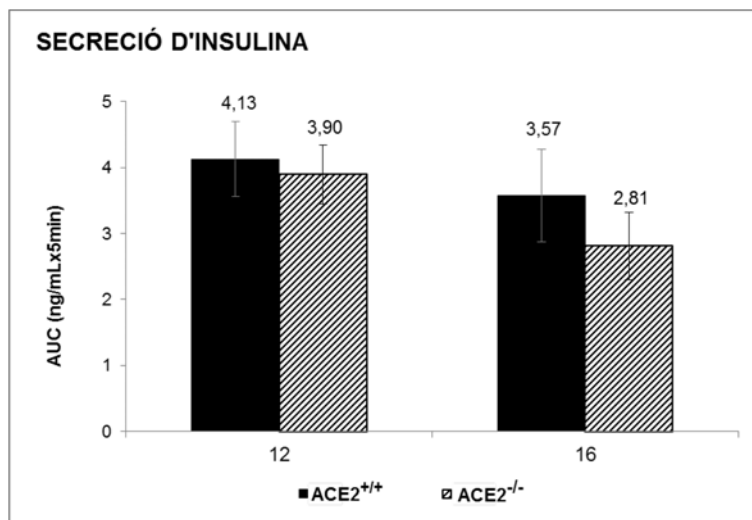


Figura 43.- *Valors de l'AUC de la secreció d'insulina. Comparativa entre animals NOD.ACE2^{-/-} i NOD.ACE2^{+/+} a les 12 i 16 setmanes d'edat. NOD.ACE2^{-/-} (n=13), NOD.ACE2^{+/+} (n =10). L'AUC està expressada com a (ng/mL)x5minuts.*

B.6. ESTUDI DE LA HISTOLOGIA PANCREÀTICA

B.6.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ D'INSULINA EN ILLOTS β PANCREÀTICS

A través de la histologia pancreàtica s'ha estudiat l'expressió d'insulina en les cèl·lules β dels illots en animals no diabètics NOD.ACE2^{+/+} (n=11) i NOD.ACE2^{-/-} (n=16) en el moment de finalitzar l'estudi, a 25 setmanes d'edat.

No s'observen diferències significatives en la mitjana del nombre d'illots en presència o absència d'ECA2 (24±5,9 illots de mitjana per animal en NOD.ACE2^{+/+} en comparació als 20±5,4 a NOD.ACE2^{-/-}; p=NS) (**Taula 16**).

El grup NOD.ACE2^{-/-} presenta una tendència a la disminució en la mitjana de l'àrea tenyida amb insulina per animal en comparació al grup NOD.ACE2^{+/+} (334860,7±109179,4µm² tenyits per insulina en NOD.ACE2^{+/+} en comparació a 218438,0±67661,1 µm² en NOD.ACE2^{-/-}; p=NS) (**Figura 43**).

GRUP	NOD.ACE2wt	NOD.ACE2ko
N animals	11	16
MITJANA N ILLOTS	24	20
EEM	5,9	5,4

Taula 16.- Resum dels animals per a l'estudi de l'expressió de la insulina. Es mostren la mitjana d'illots i l'EEM en l'anàlisi de l'expressió d'insulina en els pàncrees d'animals no diabètics $NOD.ACE2^{-/-}$ vs. $NOD.ACE2^{+/+}$ a 25 setmanes d'edat.

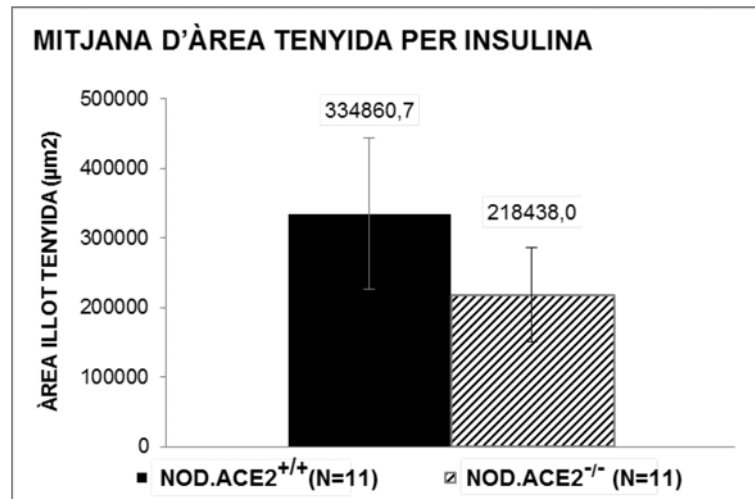
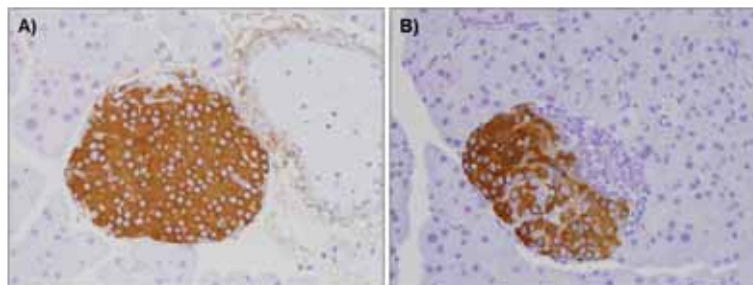


Figura 43.- Anàlisi quantitativa de l'expressió d'insulina en l'illot pancreàtic. Mitja de l'àrea d'illot tenyida positivament per insulina per animal en pàncrees del grup $NOD.ACE2^{-/-}$ vs. $NOD.ACE2^{+/+}$ no diabètics a 25 setmanes d'edat. La barra opaca correspon a animals $NOD.ACE2^{+/+}$. La barra ratllada correspon a animals $NOD.ACE2^{-/-}$.

No s'han observat diferències estadístiques en l'àrea infiltrada per animal entre animals *knockout* i *wild-type* no diabètics a 25 setmanes d'edat (dades no mostrades).



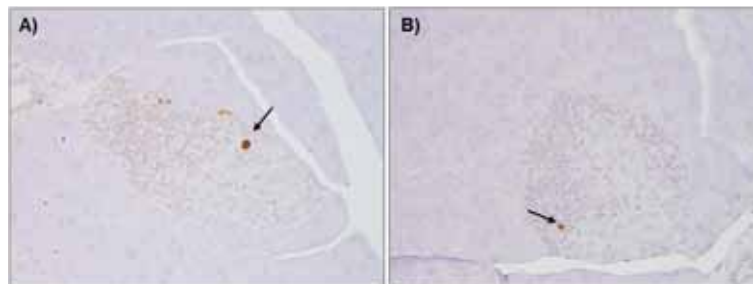
Imatge 6.- Immunohistoquímica d'insulina en l'illot pancreàtic. Fotografies representatives de la morfologia dels d'illots β pancreàtics sense i amb infiltrat. A) Illot

pancreàtic intacte tenyit positivament per insulina. La tinció marró marca la insulina continguda en les cèl·lules β B) Illot pancreàtic amb infiltrat tenyit positivament amb insulina. Les cèl·lules secretores d'insulina han quedat marcades de color marró. Una part de l'illot es troba infiltrada. La identificació de l'infiltrat es realitza per la contratinció amb hematoxilina. Fotografies a 400 augments.

B.6.2. ANÀLISI DE L'APOPTOSI DELS ILLOTS β PANCREÀTICS

En la soca NOD, s'ha estudiat el grau d'apoptosi en els illots d'animals no diabètics *knockout* en comparació a *wild-type* de 16 i 17 setmanes d'edat (**Imatge 7**).

S'ha detectat presència de cèl·lules apoptòtiques en els dos grups. No obstant, no s'han pogut establir diferències significatives entre NOD.ACE2^{-/-} en comparació a NOD.ACE2^{+/+} ($p=NS$) (dades no mostrades).



Imatge 7.- Tinció TUNEL en l'illot pancreàtic. Fotografies representatives de l'apoptosi en el pàncrees. Les fletxes indiquen presència de tinció marró que marca les cèl·lules apoptòtiques. A) Illot pancreàtic d'un animal NOD.ACE2^{+/+}. B) Illot pancreàtic d'un animal NOD.ACE2^{-/-}. Una part de l'illot es troba infiltrada. La identificació de l'infiltrat es realitza per la contratinció amb hematoxilina. Fotografies a 200 augments.

C. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA EN ELS MODELS NOD.ACE2^{-/-} I NOR.ACE2^{-/-}

Per a la inclusió dels animals a l'estudi de la ND, es realitzà un seguiment de les glicèmies basals cada quinze dies. Només els animals amb mesures de glucosa en sang >250mg/dL en dos dies consecutius eren considerats diabètics. La N final

d'animals emprats per a l'estudi de la nefropatia als de 30 dies de diabetis és la que s'especifica en la **Taula 17**.

GRUP	NOD.ACE2wt	NOD.ACE2ko	NOR.ACE2wt	NOR.ACE2ko
N estudiada	13	10	13	10

Taula 17.- N dels animals inclosos en l'estudi de la nefropatia després de 30 dies de diabetis.

C.1. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES FISIOLÒGICS

C.1.1. CARACTERÍSTIQUES DELS ANIMALS INCLOSOS

L'edat i els paràmetres dels grups estudiats a l'inici del seguiment de cada grup es mostren en la **Taula 18**.

En el moment de la inclusió no s'observen diferències entre les edats de cada grup d'estudi (NOD.ACE2^{+/+}: 19,0±1,0 setmanes; NOD.ACE2^{-/-}: 19,7±1,1 setmanes; NOR.ACE2^{+/+}: 19,0±1,0 setmanes; NOR.ACE2^{-/-}: 19,9±1,1 setmanes; p=NS).

Els animals diabètics WT presenten un menor pes corporal a l'inici del seguiment en comparació als controls (§p≤0,05). En canvi, en animals KO no s'observen diferències de pes significatives entre els animals diabètics en comparació als no diabètics. Els animals diabètics presenten hiperglicèmia ja des de l'inici de l'estudi en comparació als no diabètics (*p≤0,05).

		INICI D'ESTUDI (setmana 0)		
		EDAT (setmanes)	PES (g)	GLICÈMIA (mg/dL)
NOD.ACE2 ^{+/+}	MITJA	19,0	26,3 (§)	376,9 (§)
	EEM	1,0	0,5	29,8
NOD.ACE2 ^{-/-}	MITJA	19,7	26,4	443,5 (*)
	EEM	1,1	0,5	33,2
NOR.ACE2 ^{+/+}	MITJA	19,0	28,4	154,8
	EEM	1,0	0,4	3,3
NOR.ACE2 ^{-/-}	MITJA	19,9	26,6	165,8
	EEM	1,1	0,9	4,1

§ p≤0,05 vs NOR.ACE2^{+/+} * p≤0,05 vs NOR.ACE2^{-/-}

Taula 18.- Paràmetres d'edat (en setmanes), pes (en g) i glicèmia (en mg/dL) a l'inici de l'estudi (setmana 0 de seguiment) en els grups NOD.ACE2^{+/+}, NOD.ACE2^{-/-},

NOR.ACE2^{+/+} i **NOR.ACE2^{-/-}**. * $p \leq 0,05$ en **NOD.ACE2^{-/-}** vs. **NOR.ACE2^{-/-}**. \$ $p \leq 0,05$ en **NOD.ACE2^{+/+}** vs. **NOR.ACE2^{+/+}**.

C.1.2. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL

L'evolució del pes en els grups estudiats al llarg dels 30 dies de seguiment es mostra en la **Figura 45**.

Passats 30 dies de diabetis, els animals **NOD.ACE2^{+/+}** i **NOD.ACE2^{-/-}** presenten una pèrdua significativa de pes en comparació al seu pes inicial ($26,3 \pm 0,5$ g en el grup **NOD.ACE2^{+/+}** a inici d'estudi en comparació a $22,6 \pm 1,0$ g al final d'estudi i $26,4 \pm 0,5$ g en el grup **NOD.ACE2^{-/-}** a l'inici de l'estudi en relació als $20,8 \pm 0,9$ g del final de l'estudi; # $p \leq 0,05$).

La diabetis contribueix a un menor pes corporal en animals **NOD.ACE2^{+/+}** en comparació als animals **NOR.ACE2^{+/+}** (* $p \leq 0,05$). Així mateix també s'observa en ratolins **NOD.ACE2^{-/-}** en comparació a **NOR.ACE2^{-/-}** (\$ $p \leq 0,05$). En fons NOD s'observa una progressiva pèrdua de pes entre el moment d'inclusió en comparació amb els mateixos animals a punt final d'estudi (# $p \leq 0,05$).

L'ANOVA de mesures repetides mostra que, valorant els resultats al llarg de les 4 setmanes de seguiment, els animals **NOD.ACE2^{+/+}** presenten en general un pes corporal significativament inferior als **NOR.ACE2^{+/+}**.

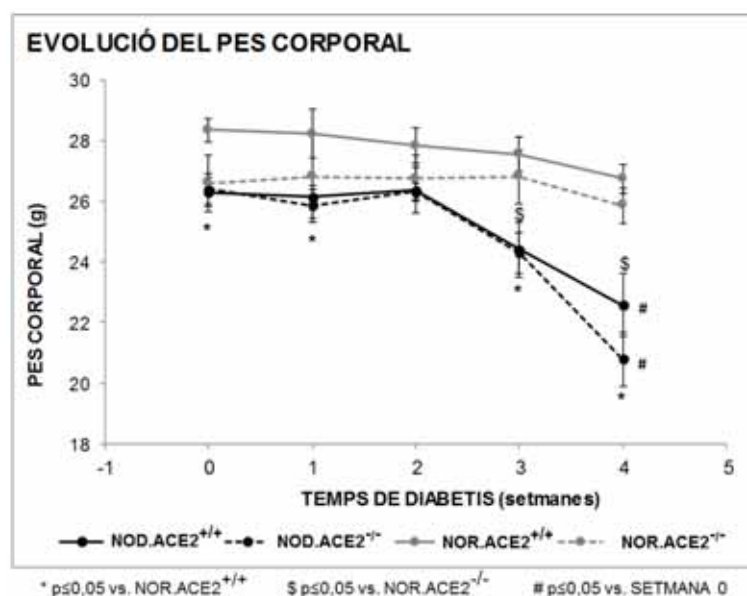


Figura 45.- Evolució del pes corporal dels animals des de l'inici de l'estudi i al llarg de les 4 setmanes de seguiment de la diabetis. La línia grisa contínua correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. La línia grisa discontinua correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. La línia negra contínua correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. La línia negra discontinua correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. \$p≤0,05 en NOD.ACE2^{-/-} vs. NOR.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD.ACE2^{+/+} vs. NOR.ACE2^{+/+}. #p≤0,05 en els valors de pes al final de l'estudi en comparació a l'inici del seguiment.

C.1.3. EVOLUCIÓ DE LA GLICÈMIA CAPIL·LAR

Les mesures i l'evolució de glicèmia en els grups estudiats al llarg dels 30 dies de seguiment es mostra en la **Figura 46**.

Al final de l'estudi, els animals NOD.ACE2^{+/+} i NOD.ACE2^{-/-} presenten un augment significatiu de la glicèmia en comparació a la glicèmia a l'inici de l'estudi (376,9±29,8mg/dL en el grup NOD.ACE2^{+/+} a inici d'estudi vs. a 596,5±3,5mg/dL al final d'estudi i 443,5±33,2mg/dL en el grup NOD.ACE2^{-/-} a l'inici de vs. 600,0±0,0mg/dL del final de l'estudi; #p≤0,05).

No es detecten diferències en els valors observats entre animals WT i KO en la soca NOD. Tampoc s'aprecien diferències entre WT i KO en la soca NOR. No obstant, s'observen diferències entre animals NOD (*p≤0,05) i NOR (¥ p≤0,05). En aquest sentit l'ANOVA de mesures repetides mostra diferències significatives globals al llarg de les 4 setmanes de seguiment en la glicèmia dels animals de fons NOD en comparació als valors en el fons NOR. No s'observen diferències entre els ratolins KO i WT pel gen de l'ECA2.

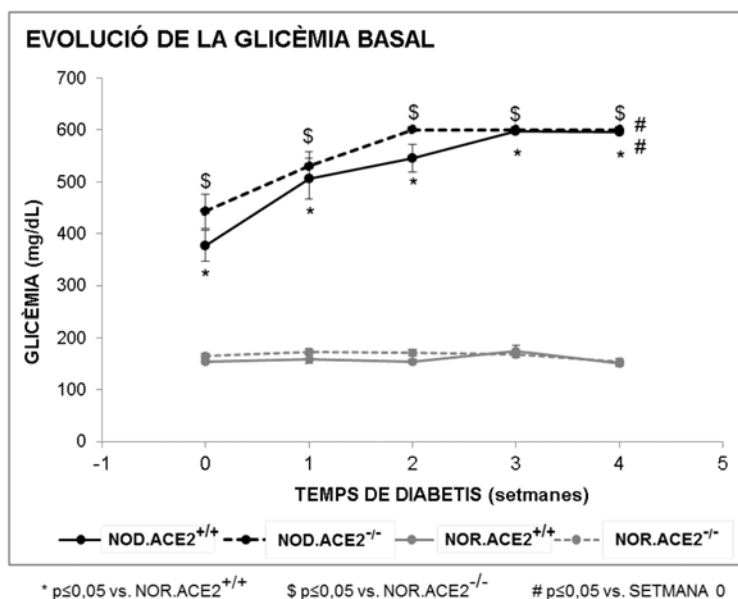


Figura 46.- Evolució de la glicèmia basal des de l'inici de l'estudi i al llarg de les 4 setmanes de seguiment de la diabetis. La línia gris contínua correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. La línia gris discontinua correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. La línia negra contínua correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. La línia negra discontinua correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. \$p≤0,05 en NOR.ACE2^{-/-} vs. NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOR.ACE2^{+/+} vs. NOD.ACE2^{+/+}. #p≤0,05 en valors de pes al final de l'estudi vs. l'inici del seguiment.

C.2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL

C.2.1. PRESSIÓ ARTERIAL SISTÒLICA

La pressió arterial sistòlica (PAS) en els diferents grups d'estudi, expressada en mil·límetres de mercuri (mmHg), es mostra a la **Figura 47**.

Els resultats mostren que la diabetis comporta un augment de la PAS tant en el grup *knockout* com en el *wild-type* (PAS WT: 117,4±2,5 mmHg en NOD vs. 109,4±2,7 mmHg NOR; PAS KO: 117,1±3,3 mmHg en NOD vs. 104,2±2,4 mmHg en NOR; *p≤0,05).

No s'observen diferències en els valors de la PAS entre els animals *knockout* i *wild-type* per ECA2 (p=NS).

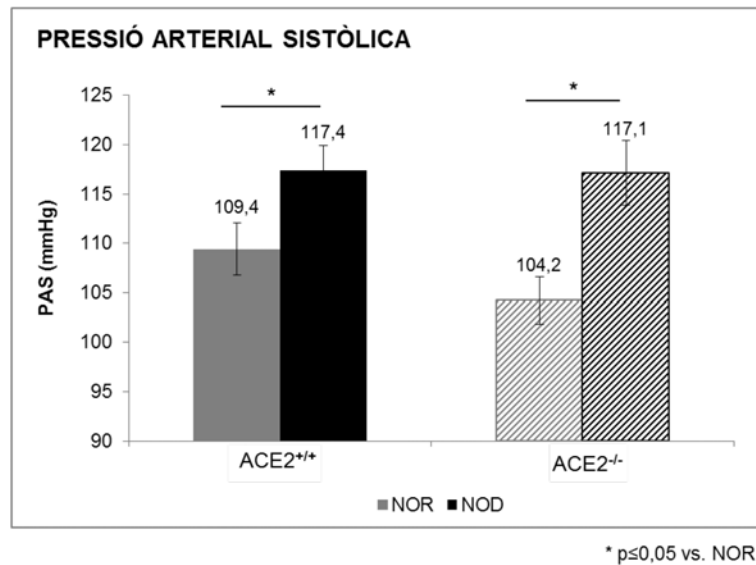


Figura 47.- PAS entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD vs. NOR.

C.2.2. PRESSIÓ ARTERIAL DIASTÒLICA

Els valors obtinguts de pressió arterial diastòlica (PAD), expressats en mil·límetres de mercuri (mmHg), entre els diferents grups estudiats es mostren en la **Figura 48**.

No s'observen diferències en la PAD entre els grups d'estudi (NOR.ACE2^{+/+}: 84,2±2,5 mmHg, NOR.ACE2^{-/-}: 77,4±4,1mmHg, NOD.ACE2^{+/+}: 87,1±2,4 mmHg; NOD.ACE2^{-/-}: 86,4±3,3 mmHg; p=NS).

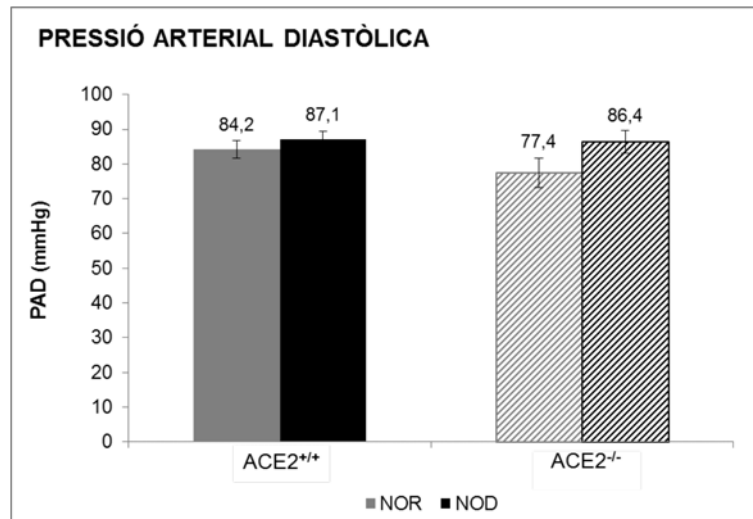


Figura 48.- PAD entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}.

C.2.3. FREQUÈNCIA CARDÍACA

La valoració del freqüència cardíaca, expressada en batecs per minut (bpm) en els diferents grups d'estudi es representa en la **Figura 49**.

Els animals NOD.ACE2^{-/-} presenten una disminució estadísticament significativa de la freqüència cardíaca en comparació als NOR.ACE2^{-/-} (591,8±13,2 bpm en NOD vs. a 700,2±9,6 bmp en NOR; *p≤0,05).

En el grup no diabètic KO per ECA2 s'observa un augment significatiu de la freqüència cardíaca en comparació amb el grup WT (700,2±9,6 bpm vs. 657,6±17,5 bpm; \$p≤0,05).

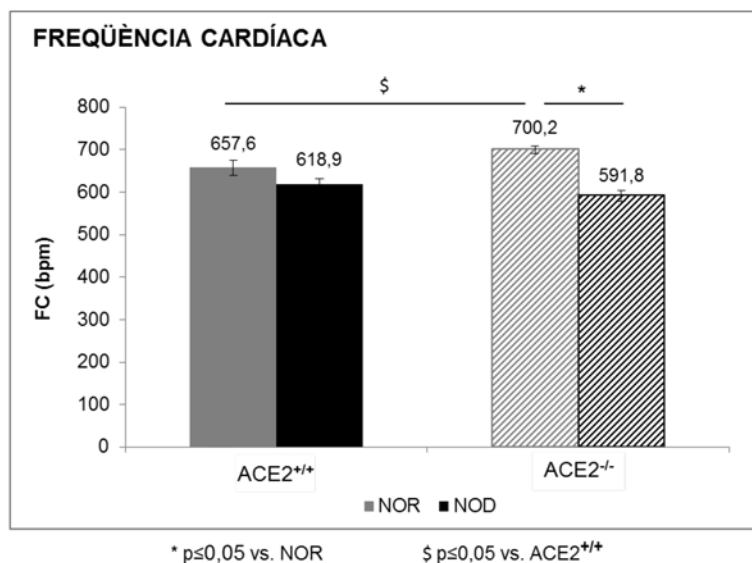


Figura 49.- *Freqüència cardíaca entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra gris opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra gris ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 en NOD vs. NOR. §p ≤ 0,05 en NOR.ACE2^{+/+} vs. a NOR.ACE2^{-/-}.*

C.2.4. PRESSIÓ ARTERIAL MITJA

A partir dels valors de PAS i PAD obtingudes, s'ha calculat la pressió arterial mitja (PAM). La PAM es defineix com la mitja de la pressió en un cicle cardíac i s'estima a partir de la fórmula:
$$PAM \cong PAD + \frac{1}{3(PAS - PAD)}$$
. La PAM és un indicador de la pressió de perfusió cap als òrgans i s'utilitza com a mesura del risc cardiovascular (Sesso et al. 2000).

No s'observen diferències en la PAM en els diferents grups estudiats (NOR.ACE2^{+/+}: 92,6 ± 2,5 mmHg, NOR.ACE2^{-/-}: 97,2 ± 2,3 mmHg, NOD.ACE2^{+/+}: 86,3 ± 3,5 mmHg; NOD.ACE2^{-/-}: 96,7 ± 3,2 mmHg; p=NS) (**Figura 50**).

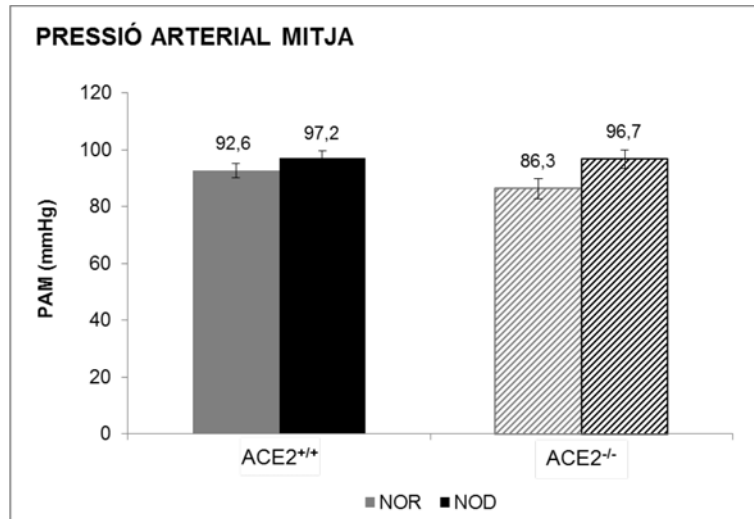


Figura 50.- PAM entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra gris opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra gris ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}.

C.2.5. PRESSIÓ ARTERIAL DEL POLS

La pressió arterial del pols (PAP) s'obté de la resta entre la PAS i la PAD. La PAP, com la PAM, és un marcador del risc cardiovascular (Kodama et al. 2014).

En els ratolins WT diabètics en comparació amb els controls s'observa un augment significatiu de la PAM (NOD.ACE2^{+/+}: 30,3±1,2mmHg vs. NOR.ACE2^{+/+}: 25,2±1,1mmHg; *p≤0,05) (**Figura 51**).

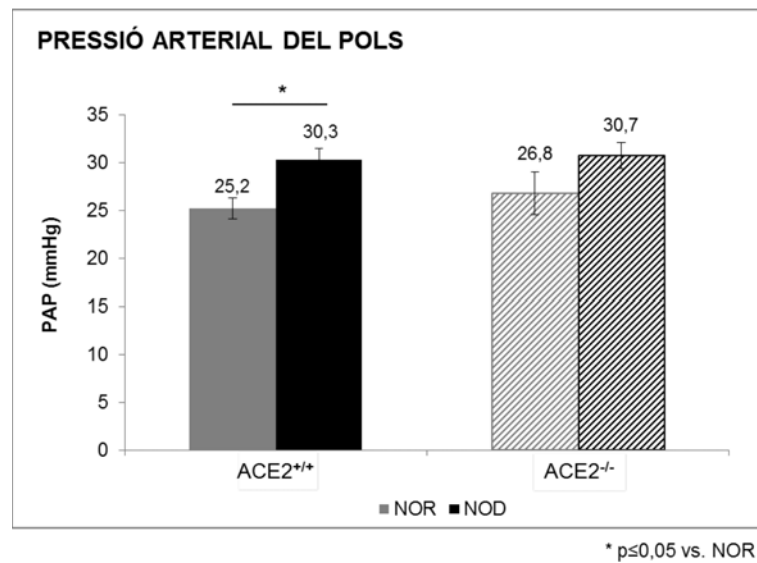


Figura 51.- PAP entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD vs. NOR.

C.3. PES RENAL

Com mostra la **Figura 52**, al final de l'estudi s'observa un augment significatiu del pes renal en els animals diabètics en comparació als no diabètics (en NOD.ACE2^{+/+}: 0,34±0,17mg/dL vs. NOR.ACE2^{+/+}: 0,28±0,07mg/dL, \$p≤0,05 i en NOD.ACE2^{-/-}: 0,32±0,16mg/dL vs. NOR.ACE2^{-/-}: 0,24±0,08mg/dL, *p≤0,05).

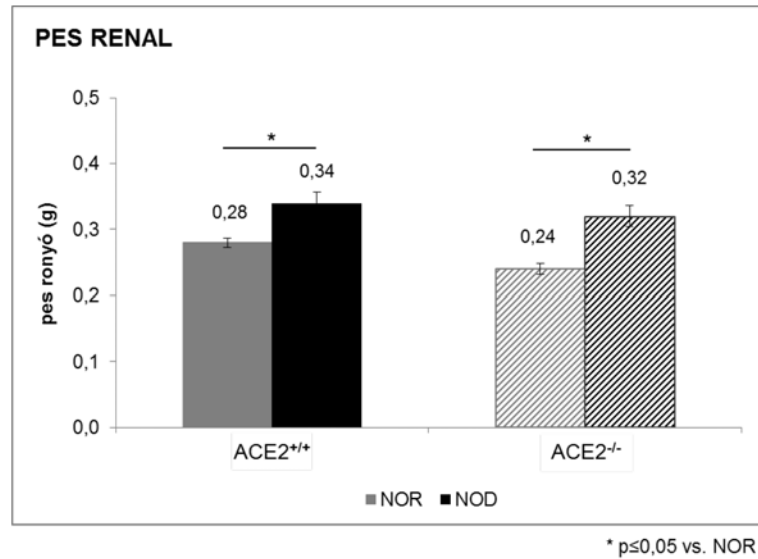


Figura 52.- Pes renal entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD vs. NOR.

C.3. QUOCIENT PES RENAL/PES CORPORAL

El quocient pes renal/pes corporal expressat en percentatge es mostra en la **Figura 53**. En els ratolins diabètics NOD s'observa un augment significatiu del quocient pes renal/ pes corporal en comparació amb els ratolins no diabètics, tant en el grup WT com en el KO pel gen de l'eca2 (en NOD.ACE2^{+/+}: 1,5±0,04% vs. NOR.ACE2^{+/+}: 0,9±0,03% i en NOD.ACE2^{-/-}: 1,5±0,05% vs. NOR.ACE2^{-/-}: 0,9±0,04%; *p≤0,05).

D'altra banda, no s'observen diferències entre animals *knockout* i *wild-type* per ECA2 en les soques NOD i NOR (p=NS).

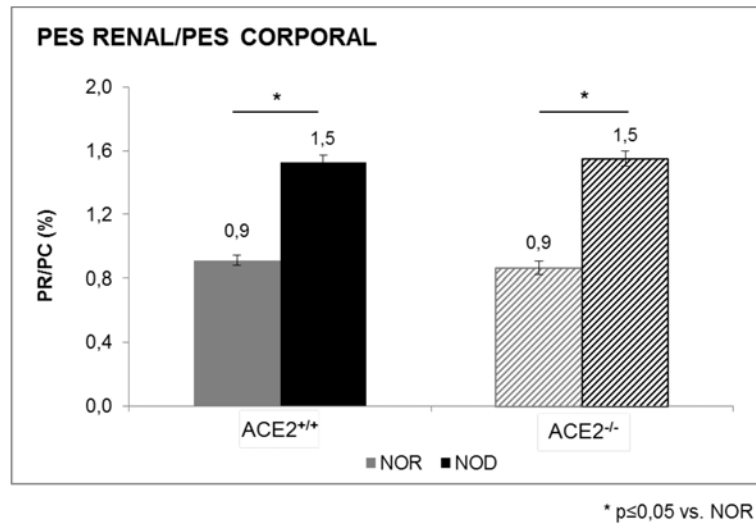


Figura 53.- Quocient del pes renal/pes corporal entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra gris opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra gris ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 en NOD vs. NOR.

C.4. QUOCIENT PES CARDÍAC/PES CORPORAL

El quocient pes del cor/pes corporal expressat en percentatge es mostra en la **Figura 54**. En els ratolins NOD diabètics s'observa una disminució significativa del quocient pes cardíac/per corporal en comparació amb els ratolins controls no diabètics, tant en el grup WT com en el KO pel gen de l'eca2 (NOD.ACE2^{+/+}: 0,4±0,02% en comparació a NOR.ACE2^{+/+}: 0,5±0,03% i NOD.ACE2^{-/-}: 0,3±0,01% vs. NOR.ACE2^{-/-}: 0,4±0,02%; *p ≤ 0,05).

No s'observen diferències entre animals *knockout* i *wild-type* per ECA2 en les soques NOD i NOR (p=NS).

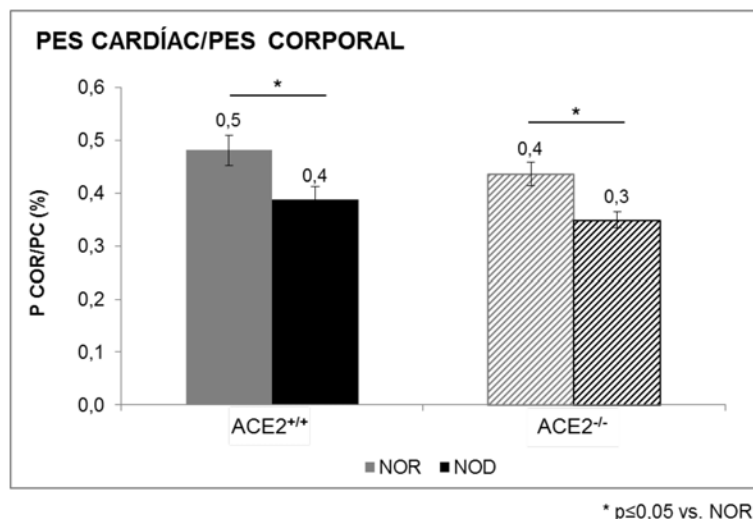


Figura 54.- Quocient del pes cardíac/pes corporal entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 en NOD vs. NOR.

C.5. ESTUDI DE LA FUNCIÓ RENAL

C.5.1. ANÀLISI DE L'EXCRECIÓ URINÀRIA D'ALBÚMINA (EUA)

La **Figura 55** mostra un augment significatiu de l'EUA en els ratolins NOD diabètics (NOD.ACE2^{+/+}: 770,1 ± 270,2 µg Alb/mg Crea vs. NOR.ACE2^{+/+}: 17,6 ± 4,0 µg Alb/mg Crea i NOD.ACE2^{-/-}: 512,0 ± 288,3 µg Alb/mg Crea vs. NOR.ACE2^{-/-}: 19,9 ± 3,7 µg Alb/mg Crea; *p ≤ 0,05).

No s'observen diferències a causa de la deleció de l'ECA2 entre les soques NOD i NOR (p = NS).

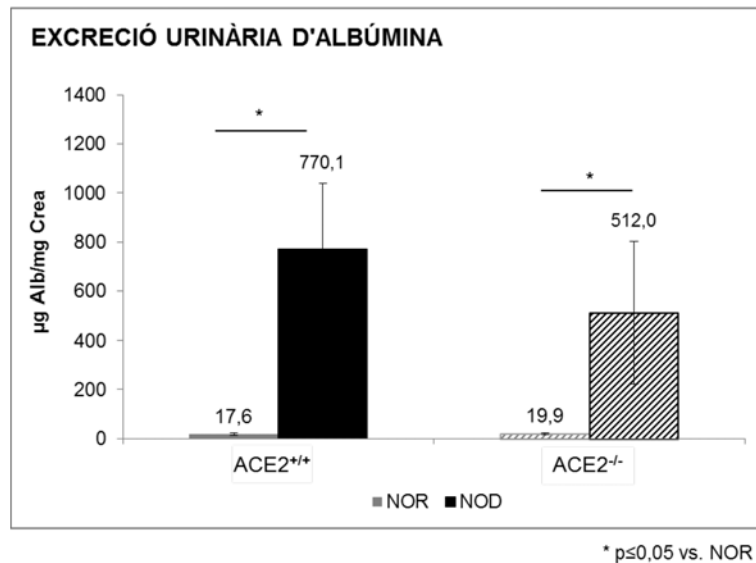


Figura 55.- Estudi d'albuminúria entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra gris opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra gris ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 en NOD vs. NOR.

C.5.2. ANÀLISI DE LA TAXA DE FILTRACIÓ GLOMERULAR (TFG)

La TFG calculada mitjançant bolus d'inulina-FITC es mostra augmentada significativament en els ratolins diabètics NOD.ACE2^{+/+} en comparació als ratolins no diabètics NOR.ACE2^{+/+} (NOD.ACE2^{+/+}: 54,2 ± 8,3 µL/min vs. NOR.ACE2^{+/+}: 29,4 ± 4,1 µL/min; *p ≤ 0,05) (**Figura 56**).

De manera interessant, aquest augment de la TFG en animals diabètics en WT no s'observa en KO (NOD.ACE2^{-/-}: 36,3 ± 6,4 µL/min vs. NOR.ACE2^{-/-}: 29,3 ± 5,1 µL/min; p = NS). Així, els ratolins diabètics NOD amb deleció del gen de l'eca2 presenten una TFG similar als ratolins no diabètics NOR.

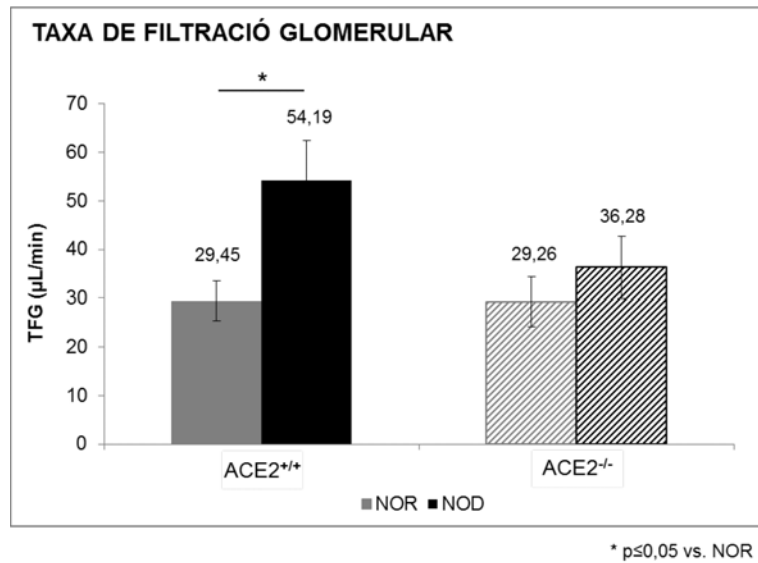


Figura 56.- Valors de la TFG entre els animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 en NOD vs. NOR.

C.6. ESTUDI DE LA HISTOLOGIA RENAL

C.6.1. ANÀLISI DE L'ÀREA GLOMERULAR I L'ÀREA MESANGIAL

La valoració de l'àrea glomerular (**Figura 57**) mostra un augment en els animals diabètics sense arribar a la significació estadística en el grup WT ($3713,1 \pm 107,3 \mu\text{m}^2$ en NOD en comparació a $3213,6 \pm 222,6 \mu\text{m}^2$ en NOR; p=NS).

Pel que fa al grup *knockout*, s'observa un augment significatiu de l'àrea (KO: $3637,2 \pm 164,6 \mu\text{m}^2$ en NOD en comparació a $3095,5 \pm 92,1 \mu\text{m}^2$ en NOR; *p≤0,05).

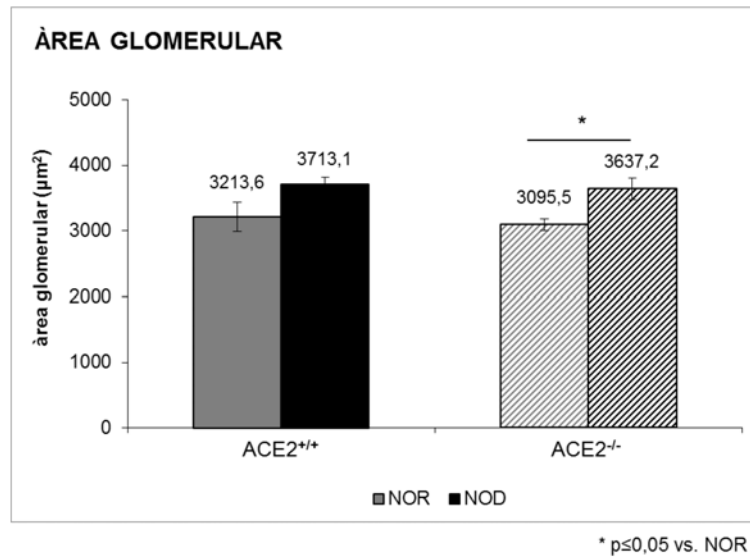


Figura 57.- Àrea glomerular en animals knockout i wild-type de la soca NOR i NOD. Les valoracions de l'àrea del glomèrul s'expressen en μm^2 . Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 vs. NOR.

D'altra banda, l'àrea mesangial (**Figura 58**) es troba significativament augmentada en els animals diabètics en comparació als no diabètics (en el grup WT: $1171,8 \pm 43,5 \mu\text{m}^2$ en NOD en comparació a $975,3 \pm 78,2 \mu\text{m}^2$ en NOR; i en el grup KO: $1178,0 \pm 48,8 \mu\text{m}^2$ en NOD en comparació a $865,0 \pm 55,7 \mu\text{m}^2$ en NOR; *p ≤ 0,05).

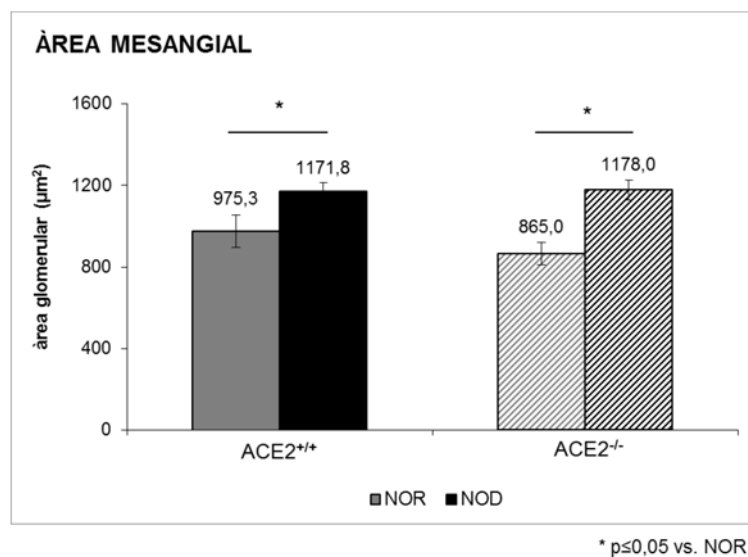
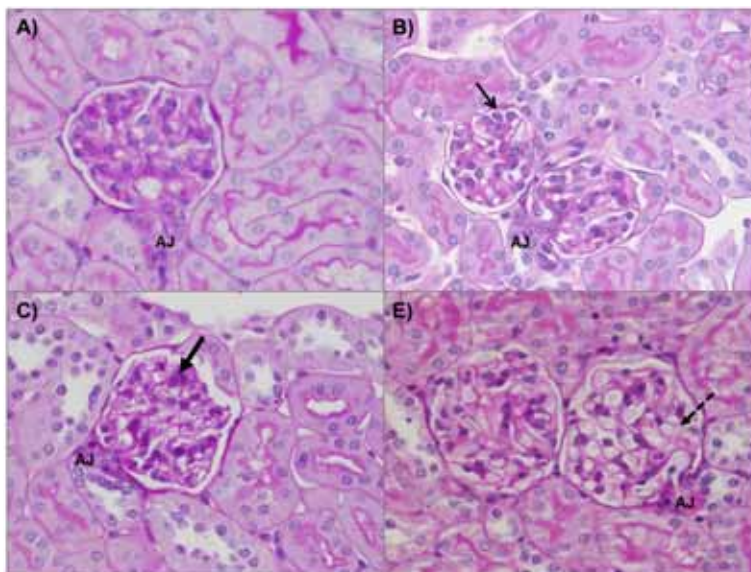


Figura 58.- Índex mesangial en animals knockout i wild-type de la soca NOR i NOD.

Les valoracions de l'índex mesangial estan expressades com el quocient entre l'àrea mesangial/àrea glomerular. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 vs. NOR.

Les imatges de microscòpia òptica de glomèruls dels diferents grups d'estudi mostren evidències de diverses alteracions estructurals (**Imatge 8**). En la **Imatge 8A** es mostra un glomèrul d'un animal NOR.ACE2^{+/+} sense alteracions majors. La **Imatge 8B** correspon a un animal NOR.ACE2^{-/-} on s'hi observa prominència podocitària (fletxa). Els animals NOD.ACE2^{+/+} després de 30 dies de diabetis (**Imatge 8C**) presenten lleu expansió de la matriu mesangial (fletxa) i cert grau de congestió capil·lar. El grup NOD.ACE2^{-/-} presenta glomèruls amb un major nombre de capil·lars congestius (fletxa) fet que condueix a una dilatació glomerular per congestió. Addicionalment s'aprecia una lleu expansió mesangial així com prominència dels podòcits (**Imatge 8D**).



Imatge 8.- Estudi de la histologia glomerular. Fotografies representatives de glomèruls tenyits amb tinció PAS d'animals A) NOR.ACE2^{+/+} B) NOR.ACE2^{-/-} C) NOD.ACE2^{+/+} D) NOD.ACE2^{-/-}. La fletxa prima assenyala prominència podocitària. La fletxa gruixuda assenyala expansió de la matriu mesangial. La fletxa discontinua indica assenyala capil·lar. AJ = aparell juxtaglomerular. Fotografies preses a 400 augments.

C.6.2. ANÀLISI PODOCITÀRIA

S'ha determinat el nombre de podòcits/glomèrul (**Figura 59 i Imatge 9**) en cada un dels quatre grups d'estudi. Els resultats mostren una disminució en el recompte podocitari en els grups diabètics en comparació als no diabètics, assolint la significança en els animals *knockout* per ECA2 (13,19±0,4 podòcits/glomèrul en NOR en comparació a 10,17±1 podòcits/glomèrul en NOD; *p≤0,05).

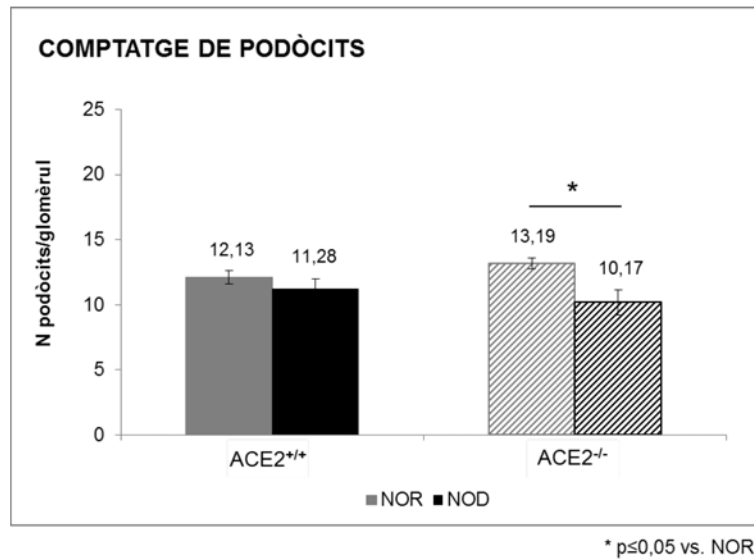
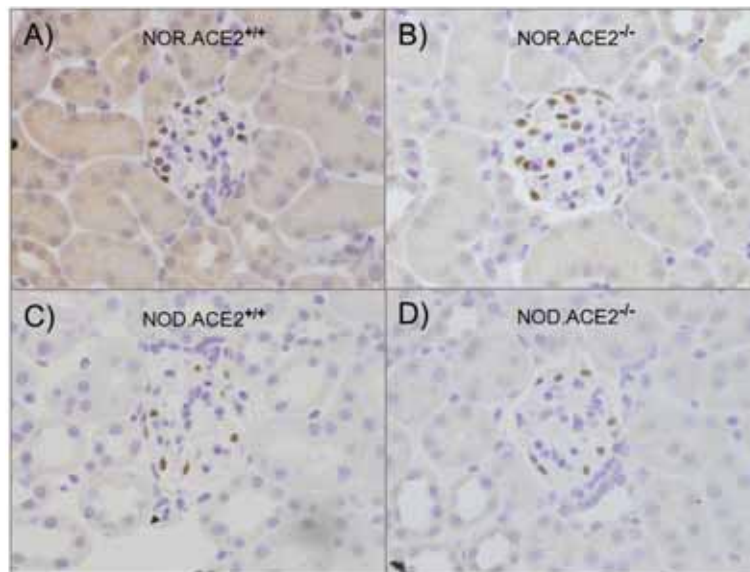


Figura 59.- N podòcits en animals knockout i wild-type de la soca NOR i NOD. Resultats expressats com la mitja de podòcits/ glomèrul. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p≤0,05 vs. NOR. \$p≤0,05 vs. WT.



Imatge 9.- Tinció podocitària en els grups d'estudi. Fotografies representatives de la cel·lularitat glomerular d'animals A) NOR.ACE2^{+/+} B) NOR.ACE2^{-/-} C) NOD.ACE2^{+/+} D) NOD.ACE2^{-/-}. Cèl·lules podocitàries tenyides amb WT-1 en marró al cabdell glomerular. Altres tipus cel·lulars glomerulars contratenyits amb hematoxilina. Fotografies preses a 400 augments.

C.7. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA D'ECA

C.7.1. ANÀLISI EN EL SÈRUM

S'observa un augment significatiu en l'activitat ECA en el sèrum d'animals diabètics en comparació als animals no diabètics (NOD.ACE2^{+/+}: 30519,5±1809,3 RFU/μL de sèrum vs. NOR.ACE2^{+/+}: 17982,5±985,2 RFU/μL de sèrum i NOD.ACE2^{-/-}: 23794,4±2577,1 RFU/μL de sèrum vs. NOR.ACE2^{-/-}: 19007,7±718,8 RFU/μL de sèrum; *p≤0,05) (**Figura 60**).

Adicionalment, en ratolins diabètics KO s'observa una disminució significativa en l'activitat enzimàtica circulant d'ECA en comparació amb els ratolins WT (23794,4±2577,1 RFU/μL de sèrum en NOD.ACE2^{-/-} vs. 30519,5±1809,3 RFU/μL de sèrum en NOD.ACE2^{+/+}; ¥p≤0,05).

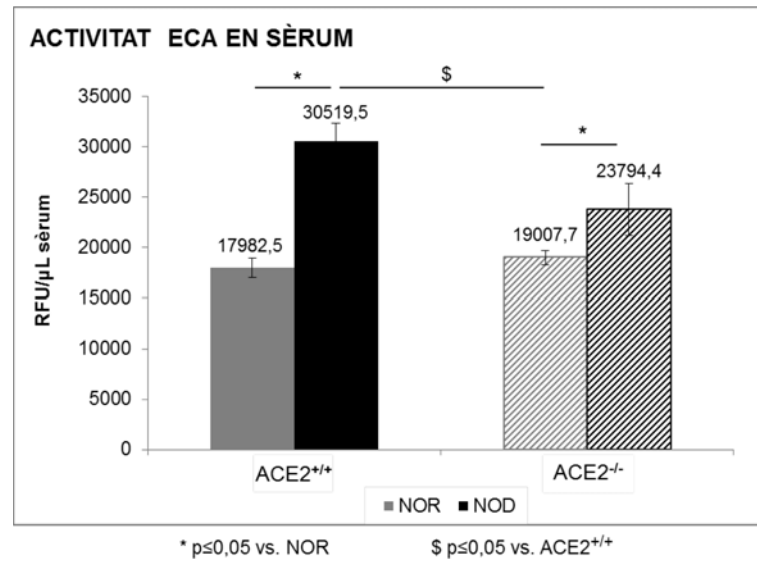


Figura 60.- Activitat ECA en el sèrum d'animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 en NOD vs. NOR.

C.7.2. ANÀLISI EN EL CÒRTEX RENAL

Malgrat observar una disminució en l'activitat ECA en els animals diabètics (Figura 61), WT o KO, no s'han assolit diferències significatives entre ambdós genotips (NOD.ACE2^{+/+}: 1231,0 ± 162,2 RFU/μg de proteïna vs. NOR.ACE2^{+/+}: 1434,4 ± 100,2 RFU/μg de proteïna i NOD.ACE2^{-/-}: 1361,1 ± 184,1 μg de proteïna vs. NOR.ACE2^{-/-}: 1823,6 ± 159,7 RFU/μg de proteïna; p=NS).

En el grup NOR no diabètic amb deleció de l'ECA2 s'aprecia un augment significatiu de l'activitat ECA en còrtex renal en comparació als ratolins WT (NOR.ACE2^{-/-}: 1823,6 ± 159,7 RFU/μg de proteïna vs. NOR.ACE2^{+/+}: 1434,4 ± 100,2 RFU/μg de proteïna; *p ≤ 0,05).

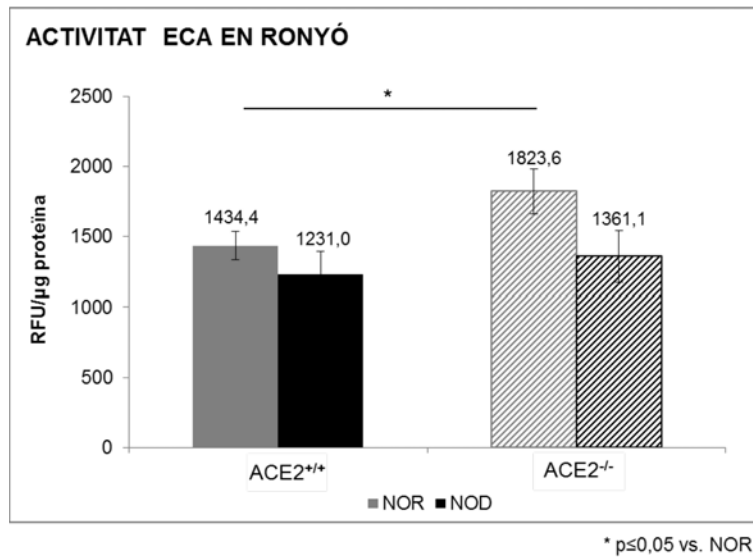


Figura 61.- Activitat ECA en el còrtex renal d'animals knockout i wild-type per ECA2 en les soques NOD i NOR. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}. *p ≤ 0,05 vs. NOR.

C.8. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA D'ECA EN CÒRTEX RENAL

L'anàlisi proteic de l'expressió d'ECA a nivell de còrtex renal es mostra en la **Figura 62**, on la quantificació de la banda d'ECA s'ha relativitzat per la de la βactina.

Malgrat observar una disminució en l'expressió d'ECA en els animals diabètics, ja siguin WT o KO, no s'han assolit diferències significatives (en els grups WT: 0,73 ± 0,07 en NOD vs. 0,84 ± 0,07 en NOR i en els grups KO: 0,87 ± 0,08 en NOD vs. 1 ± 0,07 en NOR; p = NS).

De manera interessant i malgrat no assolir diferències significatives, l'expressió proteica d'ECA es troba augmentada en absència d'ECA2 tant en la soca NOR com en la soca NOD (en la soca NOR: 0,84 ± 0,07 en WT vs. 1 ± 0,07 en KO i en la soca NOD: 0,73 ± 0,07 en WT vs. 0,87 ± 0,08 en KO; p = NS).

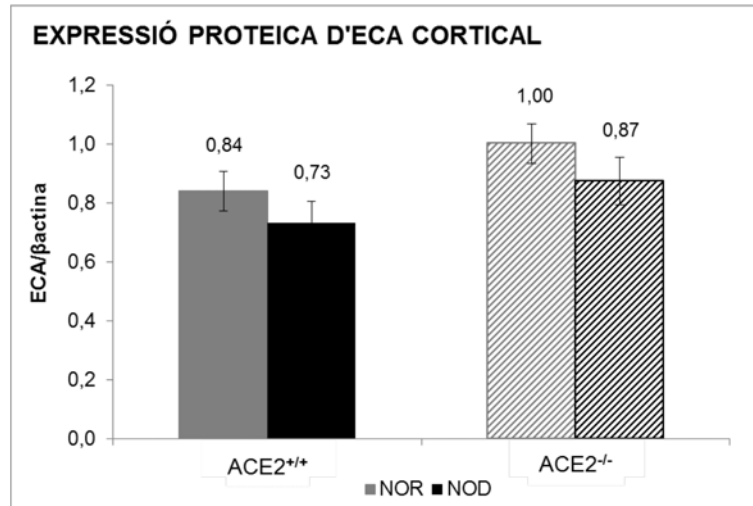


Figura 62.- Expressió proteica d'ECA en el còrtex renal d'animals knockout i wild-type de les soques NOR i NOD. Barra grisa opaca correspon al grup NOR.ACE2^{+/+}. Barra negra opaca correspon al grup NOD.ACE2^{+/+}. Barra grisa ratllada correspon al grup NOR.ACE2^{-/-}. Barra negra ratllada correspon al grup NOD.ACE2^{-/-}.

VI. DISCUSSIÓ

VI. DISCUSSIÓ

La discussió dels resultats d'aquesta tesi sobre l'estudi de la deleció de l'ECA2 en les soques NOD i NOR s'organitza en tres apartats: un primer centrat en les generalitats observades en les noves línies, un segon focalitzat en els efectes sobre l'homeòstasi de la glucosa i de la insulina i un tercer sobre els efectes en la nefropatia diabètica.

A. CARACTERITZACIÓ DE LES NOVES LÍNIES NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-}

El primer objectiu de la present tesi ha consistit en creuar ratolins de la soca NOD i ratolins de la soca NOR amb els ratolins ECA2 *knockout* en fons genètic C57BL/6. Treballs publicats han demostrat que en condicions fisiològiques (no patològiques) els ratolins ECA2 KO generats tant en fons C57BL/6 com 129/SV són viables, fèrtils i no presenten anomalies estructurals majors (Gurley et al. 2006; Crackower et al. 2002; Yamamoto et al. 2006). El grup del Dr. Scholey i cols. prèviament havia estudiat el creuament del ratolí Akita (Ins2^{WT/C96Y}) amb el ratolí ECA2 KO. El model Akita desenvolupa una DM tipus 1 secundària a una mutació del gen de la insulina, que produeix un defecte en el plegament proteic, apoptosi de les cèl·lules β pancreàtiques i un subseqüent dèficit en la secreció de la insulina. Els ratolins de la línia ACE2^{-/-}/Ins2^{WT/C96Y} també han mostrat ser viables i fèrtils (Wong et al. 2007). En el treball que aquí es presenta, estudiem la deleció del gen en el ratolí NOD, donat que presenta una DM tipus 1 que imita la DM tipus 1 en humans. La nova soca utilitzada en aquest estudi no ha estat estudiada prèviament, per tant la seva viabilitat, fertilitat i fenotip són desconeguts. Les noves línies murines generades en el treball són viables, fèrtils i no presentaren anomalies estructurals majors. Així, tant la soca NOD.ACE2^{-/-} com la soca NOR.ACE2^{-/-} han pogut ésser emprades donada la seva viabilitat.

Hem observat que els animals que presenten una deleció del gen de l'ECA2 presenten un **fenotip** diferent en relació al pelatge de la soca NOD original. Aquest canvi en la coloració del pelatge també es fa patent en els ratolins amb deleció de l'ECA2 en el fons genètic NOR. La causa del canvi de coloració en les noves línies podria estar relacionada amb la coloració negra dels ratolins ECA2 KO en fons genètic C57BL/6, soca donadora de la deleció. En aquest sentit, s'ha descrit el ratolí Agouti, un model de DM tipus 2 amb síndrome metabòlica i que presenta pelatge agouti. El gen agouti (A^{vy}) codifica un senyal paracrí que produeix *phaeomelanin* (A), conferint coloració groguenca. Aquesta coloració tanmateix s'ha vist que pot ésser modificada per fenòmens ambientals (Morgan et al. 1999; Dolinoy et al. 2007). Inicialment, la

coloració de l'agouti va ser atribuïda a la creació del model en el fons genètic C57BL/6, i posteriorment s'ha relacionat amb altres etiologies.

Del fenotip de la nova línia creada també destaca que la deleció del gen de l'*eca2* provoca una disminució del **pes corporal** dels animals. És interessant mencionar que aquesta disminució del pes s'observà en les dues soques, tant en la del fons NOD com la NOR. En aquest sentit, estudis previs han demostrat que la inhibició farmacològica de l'ECA2 produeix una disminució del pes corporal. Així, en ratolins diabètics per STZ on es va administrar de manera concomitant MLN-4760, un inhibidor sintètic específic de l'ECA2, es va observar una disminució de pes més accentuada que en ratolins diabètics tractats només amb vehicle (Soler et al. 2007a; Tikellis et al. 2008). És interessant ressaltar que la disminució de pes en el ratolí NOR control es va observar principalment en el post-dejú de ratolins amb 12-14 setmanes d'edat. Aquestes diferències corporals en els ratolins controls NOR (no en els NOD diabètics) no s'observen a les 24 setmanes de vida. Estudis recents han demostrat també aquesta disminució de pes en ratolins controls amb deleció del gen de l'*eca2* i exacerbada quan s'indueix la síndrome metabòlica mitjançant una dieta rica en greixos (Bernardi et al. 2015). No obstant altres autors no troben diferències de pes corporal (Jia et al. 2009; Takeda et al. 2013). Aquestes divergències podrien ser atribuïdes a dues causes: 1) diferents estratègies de generació dels *knockouts* estudiats que confereixen diferents característiques genotípiques, 2) en una edat precoç: a les 12 setmanes de vida s'aprecia una disminució significativa de pes en ratolins control que s'esvaeix amb l'edat de l'animal. És també d'interès mencionar que el desenvolupament inicial del fàrmac MLN-4760, un inhibidor sintètic específic de l'ECA2, es va concebre de cara al tractament de l'obesitat a través del seu impacte en el metabolisme sense afectar la sensació de sacietat. No obstant donades les accions nocives del compost, aquest no va sortir finalment al mercat.

B. ESTUDI DE L'HOMÈOSTASI DE LA GLUCOSA I DE LA INSULINA

En relació al test de **sobrecàrrega de glucosa**, els resultats mostren que els ratolins NOD.ACE2^{-/-} que no han desenvolupat diabetis presenten menor tolerància al bolus de glucosa en comparació als animals NOD.ACE2^{+/+}. L'alteració en resposta a la sobrecàrrega de glucosa és patent entre les 12 i 16 setmanes de vida i, posteriorment, desapareix. El model NOD desenvolupa una diabetis autoimmune que cursa amb destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques i insulinitis (Makino et al. 1980). En aquest

model no tots els ratolins desenvolupen diabetis, sinó que la malaltia es desenvolupa de forma progressiva en el transcurs de setmanes i la freqüència depèn del sexe (80-90% femelles i 10-40% mascles a les 30 setmanes), essent molt menor, al voltant d'un 20%, a les 16 setmanes de vida (Leiter et al. 1987). Així, les diferències observades en les setmanes inicials de l'estudi indiquen una alteració que es fa patent en el metabolisme de la glucosa, en una fase en què en aquest model l'aparició de diabetis és poc freqüent i va desapareixent en el moment en què s'observa una major taxa de diabetis (entre les 20-24 setmanes d'edat). En concordança amb aquestes observacions, després d'un dejú de 5 hores, els animals NOD.ACE2^{-/-} a les 16 i 20 setmanes d'edat presenten alteracions en la glicèmia basal, malgrat no ser diabètics. Aquestes diferències es perden amb l'edat, a les 24 setmanes. Tanmateix, els ratolins NOD.ACE2^{-/-} presenten una taxa d'aparició de diabetis en edats més joves en comparació als ratolins NOD.ACE2^{+/+}. La taxa d'aparició de la diabetis durant el període de seguiment d'aquest estudi presenta una tendència a l'alça en el ratolí amb deleció del gen de l'eca2. En aquest sentit, estudis clínics han demostrat que els fàrmacs inhibidors del SRA com els iECA i els ARB poden retardar l'aparició de diabetis de novo i milloren el control glicèmic en pacients ja diabètics (Lewis et al. 1993; Hoogwerf 2010). Per tant, en el cas d'un model amb deleció de l'ECA2 (enzim que promou la degradació de l'Ang-II) s'observa un efecte contrari a la inhibició farmacològica de l'ECA (enzim que promou la formació de l'Ang-II) i la subseqüent alteració del metabolisme de la glucosa.

S'ha demostrat que els ratolins ECA2 KO, tant als que se'ls administrà una dieta estàndard com als que se'ls alimentà amb dieta rica en greixos, presenten una menor secreció de la insulina posterior a la sobrecàrrega oral de glucosa (Bernardi et al. 2015). En la línia NOD.ACE2^{-/-} també hem observat una lleu disminució en la primera fase de la secreció de la insulina, indicador de lesió a nivell pancreàtic. L'expressió de l'ECA2 en pàncrees, tant endocrí (cèl·lules β dels illots) com exocrí (cèl·lules acinars) en diversos models experimentals ha estat prèviament demostrada (Niu et al. 2008; Fang & Yang 2010; Tikellis et al. 2004). En rates Zucker (fa/fa), un model animal d'obesitat que desenvolupa diabetis, l'expressió de l'ECA2, tant a nivell proteic com gènic es troba elevada. Aquest augment es correlacionà amb diversos marcadors d'apoptosi i fibrosi com tinció TUNEL, expressió de col·lagen IV i col·lagen I i III (per *red picrosirius*) (Tikellis et al. 2008). L'augment d'aquesta expressió d'ECA2 podria constituir un mecanisme protector amb l'objectiu de contrarestar un excés d'Ang-II. Tanmateix, en un estudi en animals no diabètics, l'absència d'ECA2 va determinar una

glicèmia basal més elevada en ratolins de la soca C57BL/6 (Tikellis et al. 2008; Bindom & Lazartigues 2009). D'aquesta manera, i segons els resultats d'aquesta part de l'estudi, la deleció de l'ECA2, que condueix a un desequilibri del SRA, podria estar afectant l'aparició de la malaltia en els ratolins NOD. Tot i que no s'ha descrit un mecanisme, hi ha indicis que apunten que els efectes deleteris de l'absència d'ECA2 en els illots pancreàtics es podrien explicar per una acumulació d'Ang-II. A través de la seva unió a AT1R es provocaria una vasoconstricció del flux sanguini i una activació de fenòmens d'estrès oxidatiu conduint a una major taxa d'apoptosi de les cèl·lules β i, per tant, a una disminució de la secreció d'insulina (Bindom & Lazartigues 2009).

Amb la finalitat d'elucidar la causa de l'alteració del metabolisme de la glucosa en el ratolí NOD, hem estudiat el nombre d'illots pancreàtics, l'expressió d'insulina i els nivells d'apoptosi pancreàtica. El grup NOD.ACE2^{-/-} presenta una tendència a la disminució en el nombre d'illots pancreàtics i en l'expressió de la insulina en comparació amb els WT, sense observar-se canvis en l'apoptosi β pancreàtica. La manca de diferències clares en termes d'apoptosi, expressió d'insulina i nombre d'illots pancreàtics entre els models KO i el WT podria ésser degut a diverses causes: a) el model NOD *per se* presenta les lesions mencionades a nivell dels illots pancreàtics (Diana et al. 2013), fet pel qual, una vegada iniciades perdem la capacitat de trobar diferències en funció de l'absència o presència del gen de l'ECA2, b) pot ésser que en el model existeixi una apoptosi en un estadi més precoç on és patent tal i com demostrem en el treball una alteració de la homeòstasi de la glucosa. No obstant el plantejament inicial de l'estudi no va ésser recollir mostres pancreàtiques a les 12 setmanes de seguiment i c) en la nova línia creada *knockout* per ECA2, l'alteració de la homeòstasi de la glucosa podria explicar-se per altres mecanismes moleculars, no relacionats directament amb l'apoptosi d'illots pancreàtics. En aquest sentit, estudis en models induïts amb dieta rica en greixos en ratolins ECA2 KO, postulen que l'alteració del metabolisme de la glucosa es podria produir en relació a canvis en els transportadors de glucosa, com el GLUT-4 o el GLUT-2 (Takeda et al. 2013). No obstant, aquest estudi està realitzat en un model de DM tipus 2 amb síndrome metabòlica mentre que el present treball s'ha realitzat amb un model de DM tipus 1. D'altra banda, estudis *in vitro* amb cèl·lules β pancreàtiques han demostrat que la glucosa pot produir una inducció de les vies ACE2/Ang-(1-7)/Mas i APN/Ang-IV/IRAP, suggerint que en aquest model podríem tenir una alteració de l'expressió de l'aminopeptidasa A (Härdtner et al. 2013). L'estrès oxidatiu és un altre dels mecanismes implicats en la regulació del SRA intrapancreàtic, concretament s'ha

demostrat que en ratolins la infusió d'Ang-II produeix una disminució de l'activitat i l'expressió pancreàtica d'ECA2 juntament amb un augment tant de l'expressió de l'AT1R com de l'estrès oxidatiu. L'administració exògena d'ECA2 recombinant restaura l'expressió pancreàtica d'ECA2 i disminueix l'estrès oxidatiu (Chhabra et al. 2013).

El test de la **sensibilitat de la insulina** exògena ha demostrat un increment d'aquesta en els ratolins NOD.ACE2^{-/-} respecte els ratolins NOD.ACE2^{+/+}. La nova línia NOD.ACE2^{-/-} presenta una alteració en el metabolisme de la glucosa i una major sensibilitat a la insulina exògena. Aquest resultat està en concordança amb estudis previs on s'ha demostrat que la pèrdua d'ECA2 contribueix a un empitjorament en la regulació dels nivells de glucosa en ratolins no diabètics (Niu et al. 2008). En models de DM tipus 2 secundària a una dieta alta en greixos també s'ha observat una alteració del metabolisme de la glucosa, acompanyada d'una disminució en el nombre d'illots pancreàtics (Yuan et al. 2013).

L'aparició de la **diabetis en el fons NOD** difereix en comparació a la descrita clàssicament i, tant en la línia NOD.ACE2^{-/-} com en la NOD.ACE2^{+/+}, la incidència de la diabetis és inferior a l'observada en la soca congènica NOD. Aquesta observació pot ser deguda a les condicions experimentals ja que el model NOD presenta una diabetis espontània amb una etiologia complexa i multifactorial que inclou una herència poligènica de penetrància molt variable en funció de la manipulació, l'entorn, la dieta i l'exposició a patògens (Leiter 2001). En el nostre cas, creiem que és adient mencionar que els models utilitzats per l'estudi varen ésser manipulats mensualment a partir de les 12 setmanes de vida, fet que pot haver afectat la predisposició a patògens en l'entorn. Els ratolins han estat estabulats en l'àrea lliure de patògens de l'animalari del PRBB, però la seva manipulació ha estat major i constant cada 4 setmanes. Estudis previs del nostre grup han demostrat que l'aparició de diabetis en el ratolí NOD en l'àrea mencionada es similar a la descrita en la literatura, en l'estudi comentat no es varen realitzar tests de sobrecàrrega de glucosa ni insulina, per tant la manipulació del ratolí va ésser menor que la del estudi actual (Riera et al. 2014). Tampoc es pot menysprear la idea de la pèrdua de canvis fenotípics en generacions posteriors en relació a la soca NOD congènica derivats de la creació de les noves línies a base de creuaments successius (Wong et al. 2007) o fins i tot una possible influència en l'aparició de la malaltia de la regió flanquejant al gen deletat, corresponent a la soca donadora (Ridgway et al. 2007).

C. ESTUDI DE LA NEFROPATIA DIABÈTICA

La valoració de la **PA** es va realitzar una setmana abans del sacrifici. Vàrem observar un augment de la PAS en els ratolins diabètics NOD tant en la línia NOD.ACE2^{-/-} com en la línia NOD.ACE2^{+/+} en comparació amb els respectius NOR. La deleció del gen de l'*eca2* tant en el ratolí NOD diabètic com en la línia NOR no es va acompanyar de canvis en la PA tant sistòlica com diastòlica. Malgrat que s'ha demostrat que el gen d'*eca2* es localitza en el cromosoma X, concretament en un locus de caràcter quantitatiu (QTL) associat a hipertensió (Crackower et al. 2002; Donoghue et al. 2000a), no hem trobat alteracions clares en els paràmetres de pressió arterial en el grup KO. En coherència amb aquests resultats, estudis inicials en ratolins amb deleció de l'ECA2 en el fons C57BL/6 (en absència de diabetis i HTA en el ratolí WT) no varen detectar una alteració en la PA (Crackower et al. 2002). Posteriorment, Gurley i cols. realitzaren un estudi enfocat en conèixer l'efecte de la delecció de l'ECA2 en la PA en diferents fons genètics i l'efecte de l'administració d'Ang-II. Demostraren que la PA està elevada en el ratolí KO pel gen de l'*eca2* depenent del fons genètic, així, mentre ells sí observaren augment de la PA en el fons C57BL/6, no varen trobar diferències de PA en el fons 129/SvEv. L'administració crònica d'Ang-II en ratolins ECA2 KO s'acompanya d'un augment significatiu (de dues vegades més) de la PA en comparació als ratolins WT. Així, l'absència d'ECA2 accentua la severitat de la hipertensió arterial a través d'un mecanisme depenent de l'Ang-II (Gurley et al. 2006). Aquests resultats suggereixen que en una condició fisiològica, el dèficit de l'enzim no comporta una alteració important, però en context d'hipertensió arterial, l'excés d'Ang-II no es pot degradar per dèficit de l'ECA2 amb augment de les xifres de PA. L'efecte de la delecció de l'ECA2 en la diabetis ha estat prèviament estudiat en dos models de diabetis tipus 1: en la línia ACE2^{-y}/Ins2^{WT/C96Y} i en el ratolí diabètic induït per l'administració d'estreptozotocina (Tikellis et al. 2008; Patel et al. 2012). En ratolins amb diabetis secundària a l'administració d'estreptozotocina s'observa un augment significatiu de la PA tant en el ratolí diabètic amb delecció del gen de l'*eca2* com en el ratolí amb inhibició de l'ECA2 en comparació amb el ratolí diabètic WT tractat amb vehicle (Tikellis et al. 2008). Contràriament, en el ratolí ACE2^{-y}/Ins2^{WT/C96Y}, no s'observaren diferències de PA en comparació amb el ratolí Akita WT. No obstant, el ratolí KO i diabètic presentà una hiperactivació de la via de l'Ang-II/AT1R amb remodelació miocàrdica adversa, disfunció sistòlica, estrés oxidatiu vascular i alteració en la dilatació depenent de l'endoteli. Aquestes característiques demostren una gran importància del gen a nivell de la regulació del SRA i el sistema vascular, donat que en la seva absència, apareix una disfunció endotelial crítica, determinant de la progressió

de les complicacions de la diabetis (Boudina & Abel 2007; Ishii et al. 1998). Així, la manca de l'elevació de la pressió arterial en la nova línia estudiada està en concordança a l'estudi publicat prèviament. Per altra banda, en el nostre model la mesura de la PA s'ha realitzat mitjançant el mètode del manegot a la cua del ratolí. La mesura de la PA es pot realitzar mitjançant tècniques no invasives (com l'emprada en aquest treball) i tècniques invasives, entre les que hi ha la telemetria. Les últimes ofereixen una mesura més acurada de la PA, obtenint PA diürna, nocturna i de 24 hores (Gurley & Coffman 2008). No obstant en el present estudi no es va realitzar per dues raons: elevat cost de la tècnica i elevada morbi-mortalitat del model murí juntament amb la baixa incidència en el desenvolupament de la diabetis. En el ratolí NOD que desenvolupa diabetis, la manca d'administració d'insulina com a estratègia terapèutica comporta una poliúria, polidípsia, pèrdua de pes i malestar del animal que no creiem hagués tolerat l'implantació d'un catèter vascular per a la mesura telemètrica de la PA (Feng et al. 2008).

Adicionalment, també hem pogut observar que els ratolins diabètics presenten una disminució del **quocient pes cardíac/pes corporal**. Aquesta disminució s'observa tant en WT com en absència d'ECA2, possiblement com a resultat de l'activació de mecanismes metabòlics que condueixen a la caquèxia cardíaca en el model NOD secundaria a la deficiència immunològica (Zhao et al. 2008). En els ratolins diabètics NOD també hem trobat una disminució de la freqüència cardíaca en comparació als ratolins no diabètics, independentment de la línia. Aquesta observació està en concordança amb altres estudis que, mitjançant mesura per telemetria, han observat una disminució de la freqüència cardíaca en paral·lel a un augment de l'inici de la diabetis en el model NOD (Gross et al. 2008). És digne de mencionar que la delecció de l'ECA2 en el ratolí NOR es va acompanyar d'un augment significatiu de la freqüència cardíaca en comparació als ratolins WT. En aquest sentit, estudis inicials on es va generar un model murí transgènic amb sobreexpressió de l'enzim a nivell cardíac, van demostrar que aquests animals presentaven una mort sobtada correlacionada amb l'expressió del transgen. L'estudi electrofisiològic va demostrar que aquests ratolins presentaven alteracions en la conducció del ritme cardíac amb taquicàrdia ventricular i fibril·lació ventricular. Aquests efectes negatius es varen atribuir a una alteració de les unions Gap i disminució de la conexina 40 i 43 durant el període de desenvolupament. Amb el desenvolupament de l'animal en cas de supervivència, s'observà regulació del sistema de conducció cardíaca amb una normalització del ritme i de l'expressió de conexines (Donoghue et al. 2003). Cal

mencionar que l'administració exògena d'ECA2, tant en forma de proteïna recombinant com la teràpia gènica, ha demostrat revertir la hipertensió arterial i la hipertrofia cardíaca en diferents models murins d'hipertensió com ara la rata espontàniament hipertensa i la hipertensió arterial secundària a la infusió d'Ang-II en el ratolí de la soca C57BL/6 (Zhong et al. 2004; Díez-Freire et al. 2006). La disfunció diastòlica es va millorar amb l'administració d'ECA2 recombinant humana, associant-se a una disminució de la fibrosi miocàrdica i una hipertròfia cardíaca, efectes que s'observen independentment dels canvis hemodinàmics (Zhong et al. 2010).

L'estudi de la nefropatia diabètica als 30 dies de malaltia en aquesta tesi s'ha realitzat mitjançant estudis funcionals (TFG i EUA) i amb estudis morfològics renals (patologia renal, estudis morfomètrics i marcatge podocitari). Els animals diabètics mostren un clar augment en el **pes renal** i en el quocient **pes renal/pes corporal**, signe indirecte d'hipertròfia renal ja descrit amb anterioritat en el model NOD i corroborat en estudis previs del nostre grup (Sharma & Ziyadeh 1994; Segev et al. 1997; Riera et al. 2014). En el model diabètic NOD tant amb deleció del gen de l'*eca2* com en el WT, s'ha detectat un clar augment en l'albuminúria en comparació amb el grup no diabètic. L'augment de l'EUA està descrit en aquest model, ja existent als 21 dies de diabetis i mantingut fins als 40 dies. Aquest augment s'acompanya d'un increment de l'activitat de l'ECA2 tant a nivell plasmàtic com urinari (Riera et al. 2014). No varem trobar diferències en l'EUA en el ratolí KO pel gen de l'*eca2* tant en la línia diabètica com en els controls. En contrast als nostres resultats, en el model Akita de DM tipus 1 emprant animals mascles de 12 setmanes KO per ECA2, s'observa un augment de l'EUA en comparació al WT (Wong et al. 2007). De la mateixa manera, els resultats en un model de DM tipus 1 induït per estreptozotocina en mascles de 4 i 18 setmanes KO per ECA2 mostra un augment en l'EUA (Shiota et al. 2010). Estudis inicials demostren que la deleció del gen de l'*eca2* en ratolins mascles (animals sans) comporta *per se* un dany a nivell glomerular depenent d'Ang-II, observable de forma patent a l'any de vida (Oudit et al. 2006). En aquest sentit podríem extrapolar que potser estem observant un efecte del gènere, donada l'absència de diferències entre el KO i el WT, on les femelles podrien estar protegides per les hormones sexuals femenines. Estudis en models murins han demostrat l'efecte renoprotector de l'administració d'estrògens (Manigrasso et al. 2012).

Com a element fonamental de l'estudi de la **funció renal** destaca la TFG, calculada mitjançant l'aclariment d'inulina, donat que aquesta tècnica és considerada el *gold-standard* per a la determinació de la TFG (Qi et al. 2004). Els ratolins diabètics

de la soca WT presenten un augment de la TFG, reflectint una fase d'hiperfiltració en la DM no tractada. L'augment de la TFG s'acompanya d'un augment de la mida renal/pes corporal, augment de la matriu mesangial i una tendència l'alça de l'àrea glomerular. Aquestes troballes van en concordança amb els resultats obtinguts en el nostre grup en ratolins diabètics NOD de 21 dies evolució (Riera et al. 2014). A remarcar que en els ratolins KO per ECA2 diabètics no s'ha observat un augment del filtrat glomerular, malgrat que sí que presentaren un augment de la mida renal/pes corporal, de l'expansió de la matriu mesangial i de l'àrea glomerular. En l'estudi histològic varem observar que els ratolins diabètics KO presenten un augment de la congestió del capil·lar glomerular, fet que podria ésser secundari a una acumulació d'Ang-II a nivel intraglomerular per una disminuïda capacitat en la seva degradació a causa de la delecció de l'ECA2. En aquest sentit, estudis amb infusió d'Ang-II han demostrat que disminueix el flux plasmàtic renal i augmenta la pressió glomerular hidrostàtica, juntament amb un augment de la resistència vascular post-glomerular en model caní (Schnackenberg & Granger 1997). Tanmateix, la infusió d'Ang-II en rates disminueix la taxa de filtració glomerular en la nefrona aïllada per micropuntura secundària a una disminució en el flux plasmàtic a la nefrona, mentre que s'observa un augment del gradient hidrostàtic (Blantz et al. 1993). Els resultats del nostre estudi estan en concordança amb els publicats en el model de diabetis Akita amb delecció pel gen de l'eca2. En aquest model no es varen trobar diferències en relació a la creatinina plasmàtica (com a marcador de funció renal) però, no obstant, sí que varen observar augment de la matriu mesangial i l'àrea glomerular (Wong et al. 2007). En contrast, en ratolins diabètics després de l'administració d'estreptozotocina, la delecció de l'ECA2 portà a una disminució de la TFG (calculada a través de la creatinina sèrica i urinària amb HPLC), en el ratolí KO diabètic en comparació amb el ratolí diabètic WT (Tikellis et al. 2008). En el nostre estudi el ratolí diabètic NOD.ACE2^{-/-} presenta una tendència a disminuir el TFG mesurat per inulina-FITC en comparació amb el ratolí NOD.ACE2^{+/+}. En aquest sentit, un estudi posterior va demostrar que en ratolins diabètics mitjançant estreptozotocina, la sobreexpressió de l'ECA2 específicament al glomèrul, portà a un augment significatiu de la TFG (segons les dades de l'aclariment d'inulina) en comparació al ratolí transgènic no diabètic (Nadarajah et al. 2012). És d'interès mencionar que en el estudi de Tikellis, els ratolins ACE2^{-/-} diabètics presenten un augment de la TFG en comparació amb els ACE2^{-/-} no-diabètics (Tikellis et al. 2008), nosaltres no hem trobat diferències entre aquests els ko control i diabètics. La divergència en els resultats podria ésser per diferents causes: a) la tècnica de mesura de TFG emprada, b) l'edat de l'animal, c) la soca murina estudiada essent

diferent la susceptibilitat a modificacions de les concentracions glomerulars d'Ang-II i d) el gènere de l'animal.

Estudis del nostre grup han demostrat que l'ECA2 està present en el **podòcit** essent un enzim clau en el SRA i la diabetis (Marquez et al. 2014a; Marquez et al. 2014b). En ratolins NOD hem observat una disminució del nombre de podòcits als 40 dies de diabetis, sense diferències als 21 dies (Riera et al. 2014). En la línia NOD.ACE2^{-/-} hem observat una disminució del nombre de podòcits, acompanyant-se d'un augment de l'àrea glomerular i expansió de la matriu mesangial. Els resultats indiquen que en una fase precoç de la ND en el ratolí NOD, la delecció del gen comporta a una acceleració de les lesions podocitàres, observades en el ratolí WT als 40 dies de diabetis (Riera et al. 2014). En concordança, la sobreexpressió de l'ECA2 humana en podòcits comporta una atenuació en el desenvolupament de la ND en ratolins amb DM tipus 1 induïts per STZ (Nadarajah et al. 2012). En aquest estudi els investigadors han demostrat que la millora es dona per un retard en l'aparició d'albuminúria, una reducció de l'expansió de la matriu mesangial, una atenuació de la hipertòfia glomerular i una prevenció en el pèrdua de podòcits, a les 16 setmanes d'edat. Els resultats observats en coherència amb els treballs publicats a la literatura suggereixen que l'amplificació de l'ECA2 podria ésser una estratègia terapèutica enfront de la ND i un inici precoç quan la ND incipient seria el més indicat.

En aquest treball també hem valorat l'**activitat enzimàtica d'ECA** a nivell ciruclant i renal. L'activitat d'ECA circulant està augmentada en ratolins diabètics en comparació amb els controls, tant en els ratolins KO pel gen d'*eca2* com en els ratolins WT. En aquest sentit, estudis previs han demostrat un augment de l'activitat sèrica de l'ECA en rates mRen2.Lewis hipertenses diabètiques per administració d'estreptozotocina (Yamaleyeva et al. 2012). En DM1 en humans l'activitat sèrica de l'ECA està elevada en pacients amb nefropatia diabètica/proteïnúria i/o retinopatia diabètica (Duntas et al. 1992). En la línia NOD.ACE2^{-/-} hem observat una disminució significativa de l'activitat circulant de l'ECA en comparació amb la línia WT diabètica. Potser, l'excès d'Ang-II esperat en aquest model genera mecanismes de *feed-back* negatius per evitar major formació d'aquest pèptid.

En els ratolins KO per ECA2 no diabètics hem observat un augment significatiu de l'activitat renal d'ECA. En aquest sentit, estudis previs en ratolins STZ varen demostrar que la inhibició de l'activitat de l'ECA2 amb un inhibidor selectiu (MLN-4760) s'acompanya d'un augment de l'expressió proteica de l'ECA a nivell glomerular i

vascular (Soler et al. 2007a). Contràriament, la deleció de l'ECA2 en un model no diabètic, s'acompanya d'una disminució de l'expressió gènica de l'ECA a nivell del còrtex renal (Oudit et al. 2006). Així, les diferències observades en els estudis esmentats podrien esser atribuïdes tant a la diferència entre la presència o absència de diabetis, als diferents models estudiats i/o a les diferències entre expressions tubulars i glomerulars publicades amb anterioritat (Ye et al. 2006; Wysocki et al. 2006).

En resum, el present treball mostra la creació de dues noves línies murines amb deleció del gen de l'ECA2. La deleció de l'ECA2 en el model NOD confereix un empitjorament de l'homeòstasi de la glucosa i de la insulina. A nivell renal l'absència d'ECA2 comporta d'alteracions estructurals a nivell del glomèrul que inclouen: augment de l'àrea glomerular, expansió de la matriu mesangial i pèrdua podocitària.

VII. CONCLUSIONS

VII. CONCLUSIONS

1. Les noves línies NOD.ACE2^{-/-} i NOR.ACE2^{-/-} generades són ratolins que han mostrat esser **viables i fèrtils**. Fenotípicament no hem observat cap alteració major i només hem trobat una alteració de la coloració del pelatge i disminució del pes del ratolí com a característiques principals.
2. La nova línia NOD.ACE2^{-/-}, derivada d'un model de DM tipus 1 espontània, presenta alteració de l'**homeòstasi de la glucosa** en comparació als animals NOD.ACE2^{+/+}. Tanmateix l'aparició de diabetis en els ratolins amb deleció de l'ECA2 és major que en els ratolins WT.
3. La línia NOD.ACE2^{-/-}, presenta un augment en la **sensibilitat de la insulina** exògena en comparació amb els ratolins NOD.ACE2^{+/+}.
4. Els ratolins NOD.ACE2^{-/-} presenten una major **progressió de la nefropatia diabètica** en termes d'augment de l'àrea glomerular, expansió de la matriu mesangial i pèrdua podocitària. Aquestes alteracions no s'acompanyen de canvis en la TFG en el ratolí diabètic KO no obstant en el ratolí diabètic WT hem observat un augment de la TFG.
5. Els ratolins NOR.ACE2^{-/-} tenen una major activitat renal cortical de l'**ECA** en comparació amb els ratolins WT. En canvi, en els ratolins NOD.ACE2^{-/-} hem detectat una menor activitat circulat de l'ECA en comparació amb els ratolins NOD.ACE2^{+/+}. Aquests resultats suggereixen un diferent comportament del SRA circulat i renal.

VIII. LIMITACIONS I NOVES PERSPECTIVES

VIII. LIMITACIONS I NOVES PERSPECTIVES

A. LIMITACIONS DEL TREBALL EXPOSAT

Donat que en els ratolins NOD el desenvolupament de diabetis està fortament condicionat per l'ambient i la manipulació, precisant un ambient lliure de patògens. Els tests de sobrecàrrega de la glucosa i la insulina en el model NOD poden haver afectat la disminució de l'aparició de diabetis en les dues línies estudiades tant en el model de deleció d'ECA2 com en wt,

Els estudis de l'apoptosi, la insulinitis i l'expressió de la insulina en el pàncrees no han estat concloents. Pensem que es tracten de processos ràpids que necessiten d'un estudi a diferents talls en el temps en animals més joves, objectiu que no es va plantejar en el disseny inicial de l'estudi. No obstant, els mecanismes de l'augment de la sobrecàrrega oral a glucosa podrien esser altres vies moleculars alterades tal i com comentem en la discussió i no testats en l'estudi actual.

Així, en una valoració global del treball presentat, on s'estudien dues noves línies generades, el treball es majoritàriament descriptiu de les línies, l'efecte en el metabolisme de la glucosa i la ND, restant per aclarir els mecanismes implicats.

B. PRESPECTIVES FUTURES

Les limitacions d'aquest treball ens porten a plantejarnos futures línies d'investigació que es poden establir en base als resultats obtinguts. Aquestes línies aniran dirigides a:

- Ampliar el estudi de la morfologia renal en el model de ND amb anàlisi ultrastructural.
- Profunditzar en el estudi d'altres elements del SRA per a poder realitzar una valoració integrada del sistema, principalment en l'estudi dels pèptids actius: Ang-II i Ang-(1-7). Estudis d'altres vies moleculars que podrien esser implicades en les alteracions trovades a nivell pancreàtic: Transportadors de glucosa, estrès oxidatiu i aminopeptidases.
- Estudis específiques de la interacció entre l'ADAM17/ECA2, com a marcador de l'estat glicèmic, risc cardiovascular i progressió de ND.

IX. BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFIA

- Adorini, L., Gregori, S. & Harrison, L.C., 2002. Understanding autoimmune diabetes: Insights from mouse models. *Trends in Molecular Medicine*, 8, pp.31–38.
- Astin, R. et al., 2013. No evidence for a local renin-angiotensin system in liver mitochondria. *Scientific reports*, 3, p.2467. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3747509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Atkinson, M.A. & Leiter, E.H., 1999. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nature medicine*, 5, pp.601–604.
- Bernardi, S. et al., 2015. ACE2 deficiency shifts energy metabolism towards glucose utilization. *Metabolism*, 64(3), pp.406–415.
- Bindom, S.M. et al., 2010. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes*, 59, pp.2540–2548.
- Bindom, S.M. & Lazartigues, E., 2009. The sweeter side of ACE2: Physiological evidence for a role in diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302, pp.193–202.
- Black, B.L. et al., 1998. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism: clinical and experimental*, 47, pp.1354–1359.
- Blantz, R. et al., 1993. Role of mesangial cell in glomerular response to volume and angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*, 264, pp.158–65.
- Boudina, S. & Abel, E.D., 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115, pp.3213–3223.
- Brenner, B.M. et al., 2001a. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*, 345(12), pp.861–869. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11565518.
- Brenner, B.M. et al., 2001b. *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy.*
- Breyer, M.D. et al., 2005. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 16(1), pp.27–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15563560.
- Brosius, F.C. et al., 2009. Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20, pp.2503–2512.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, pp.813–820.

- Bucci, M. et al., 2008. ACE-inhibition ameliorates vascular reactivity and delays diabetes outcome in NOD mice. *Vascular Pharmacology*, 49, pp.84–90.
- Camargo, S.M.R. et al., 2009. Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations. *Gastroenterology*, 136.
- Cechova, S. et al., 2013. Loss of collectrin, an angiotensin-converting enzyme 2 homolog, uncouples endothelial nitric oxide synthase and causes hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*, 128, pp.1770–1780.
- Chappell, M.C., Diz, D.I. & Jacobsen, D.W., 1992. Pharmacological characterization of angiotensin II binding sites in the canine pancreas. *Peptides*, 13, pp.313–318. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1409010.
- Chawla, T., Sharma, D. & Singh, A., 2010. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World journal of diabetes*, 1, pp.141–145.
- Chhabra, K.H. et al., 2013. Pancreatic angiotensin-converting enzyme 2 improves glycemia in angiotensin II-infused mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304, pp.E874–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chin, B. et al., 2001. Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280.
- Chipitsyna, G. et al., 2007. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 expression by angiotensin II in the pancreatic islets and beta-cells. *Endocrinology*, 148, pp.2198–2208.
- Chu, K.Y. et al., 2006. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 55, pp.367–374. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16443769.
- Chua, S. et al., 2002. Differential beta cell responses to hyperglycaemia and insulin resistance in two novel congenic strains of diabetes (FVB- Lepr (db)) and obese (DBA- Lep (ob)) mice. *Diabetologia*, 45, pp.976–990.
- Chua, S.C. et al., 1996. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science (New York, N. Y.)*, 271, pp.994–996.
- Chung, S.S.M. et al., 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14, pp.S233–S236.
- Clarke, N.E. et al., 2012. Angiotensin converting enzyme (ACE) and ACE2 bind integrins and ACE2 regulates integrin signalling. *PLoS ONE*, 7.

- Clee, S.M., Nadler, S.T. & Attie, A.D., 2005. Genetic and Genomic Studies of the BTBR ob/ob Mouse Model of Type 2 Diabetes. *American Journal of Therapeutics*, 12, pp.491–498.
- Colucci, J.A. et al., 2011. Renin-angiotensin system may trigger kidney damage in NOD mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 12(1), pp.15–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20627940.
- Cooper, M.E., 1998. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, 352, pp.213–219.
- Coughlan, M.T. et al., 2009. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20, pp.742–752.
- Crackower, M.A. et al., 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 417(6891), pp.822–828. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12075344.
- Deji, N. et al., 2009. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296, pp.F118–F126.
- Derubertis, F.R. & Craven, P.A., 1994. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*, 43, pp.1–8.
- Deschepper, C.F., 1994. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney international*, 46, pp.1561–1563.
- Diana, J. et al., 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine*, 19, pp.65–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242473>.
- Díez-Freire, C. et al., 2006. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiological genomics*, 27, pp.12–19.
- Dolinoy, D.C., Weidman, J.R. & Jirtle, R.L., 2007. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive Toxicology*, 23, pp.297–307.
- Donoghue, M. et al., 2000a. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87(5), pp.E1–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10969042.

- Donoghue, M. et al., 2000b. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, 87, pp.E1–E9.
- Donoghue, M. et al., 2003. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35, pp.1043–1053.
- Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international. Supplement*, 77, pp.S3–S12.
- Duntas, L. et al., 1992. Serum angiotensin-converting enzyme activity and active renin plasma concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 16, pp.203–208.
- Epstein, P.N., Overbeek, P.A. & Means, A.R., 1989. Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell*, 58, pp.1067–1073.
- Eriksson, U., Danilczyk, U. & Penninger, J.M., 2002. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Current Biology*, 12.
- Etoh, T. et al., 2003. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia*, 46, pp.1428–1437.
- Fang, H.J. & Yang, J.K., 2010. Tissue-specific pattern of angiotensin-converting enzyme 2 expression in rat pancreas. *J Int Med Res*, 38, pp.558–569. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515569>.
- Feng, M. et al., 2008. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *American journal of hypertension*, 21, pp.1288–1291.
- Fioretto, P. & Mauer, M., 2007. Histopathology of Diabetic Nephropathy. *Seminars in Nephrology*, 27, pp.195–207.
- Freedman, B.I. et al., 2007. Genetic factors in diabetic nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 2, pp.1306–1316.
- Fujita, H. et al., 2001. Increased expression of glutathione S-transferase in renal proximal tubules in the early stages of diabetes: a study of type-2 diabetes in the Akita mouse model. *Experimental nephrology*, 9, pp.380–386.
- Gall, M.A. et al., 1997. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *Bmj*, 314, pp.783–788. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9080995.
- Gembardt, F. et al., 2005. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides*, 26, pp.1270–1277.

- Gilbertson, D.T. et al., 2005. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16, pp.3736–3741.
- Gross, J.L. et al., 2005. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*, 28, pp.164–176.
- Gross, V. et al., 2008. Cardiovascular autonomic regulation in Non-Obese Diabetic (NOD) mice. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 138, pp.108–113.
- Gurley, S.B. et al., 2006. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116, pp.2218–2225.
- Gurley, S.B. et al., 2010. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+/-C96Y) (Akita) mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298, pp.F788–F795.
- Gurley, S.B. & Coffman, T.M., 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 gene targeting studies in mice: mixed messages. *Experimental physiology*, 93, pp.538–542.
- Hamming, I. et al., 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, 203, pp.631–637.
- Härdtner, C. et al., 2013. High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β -cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 32, pp.795–804.
- He, C.J. et al., 2000. Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: Possible role in nonobese diabetic renal disease. *Kidney International*, 58, pp.1931–1940.
- Hoogwerf, B.J., 2010. Renin-Angiotensin System Blockade and Cardiovascular and Renal Protection. *American Journal of Cardiology*, 105.
- Hudkins, K.L. et al., 2010. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21, pp.1533–1542.
- Hummel, K.P., Dickie, M.M. & Coleman, D.L., 1966. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153, pp.1127–1128. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5918576.
- Husdan, H. & Rapoport, A., 1968. Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clinical Chemistry*, 14, pp.222–238.
- Imai, E. et al., 2011. Effects of olmesartan on renal and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes with overt nephropathy: A multicentre, randomised, placebo-controlled study. *Diabetologia*, 54, pp.2978–2986.

- Imai, T. et al., 1983. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, pp.7405–7409.
- Imai, Y. et al., 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436, pp.112–116.
- Inagi, R. et al., 2006. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megsin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice. *Diabetes*, 55, pp.356–366.
- Ishii, H., Koya, D. & King, G.L., 1998. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 76, pp.21–31.
- Ito, T. et al., 2006. Glomerular changes in the KK-Ay/Ta mouse: A possible model for human type 2 diabetic nephropathy. *Nephrology*, 11, pp.29–35.
- Iyengar, S.K. et al., 2007. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND). *Diabetes*, 56, pp.1577–1585.
- Jia, H.P. et al., 2009. Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297(1), pp.L84–96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19411314.
- Kanasaki, K. & Koya, D., 2011. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.197636.
- Kodama, S. et al., 2014. Meta-analysis of the quantitative relation between pulse pressure and mean arterial pressure and cardiovascular risk in patients with diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*, 113, pp.1058–1065. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462067>.
- Komatsu, T. et al., 2002. Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping*, 13, pp.217–220.
- Kong, L.L. et al., 2013. Advances in murine models of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, 2013.
- Krege, J.H. et al., 1995. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, 25, pp.1111–1115.
- Kuhn, J.H. et al., 2004. Angiotensin-converting enzyme 2: A functional receptor for SARS coronavirus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp.2738–2743.

- Kumar, B. et al., 2012. Hesperetin ameliorates hyperglycemia induced retinal vasculopathy via anti-angiogenic effects in experimental diabetic rats. *Vascular Pharmacology*, 57, pp.201–207.
- Lee, S. & Harris, N.R., 2008. Losartan and ozagrel reverse retinal arteriolar constriction in non-obese diabetic mice. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 15, pp.379–387.
- Lee, S.M. & Bressler, R., 1981. Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse. *Diabetes*, 30, pp.106–111.
- Leiter, E.H., 2001. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 15, p.Unit 15.9.
- Leiter, E.H., Prochazka, M. & Coleman, D.L., 1987. The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am J Pathol.*, Aug; 128(2), pp.380–383.
- Leung, P.S. et al., 1999. Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *Journal of Endocrinology*, 160, pp.13–19.
- Leung, P.S., 2007. The physiology of a local renin – angiotensin system in the pancreas. *The Journal of Physiology*, 580, pp.31–37.
- Lewis, E.J. et al., 1993. *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group.*,
- Lu, T.-C. et al., 2009. Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy. *Kidney international*, 76, pp.63–71.
- Maeda, M. et al., 2003. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. *Veterinary pathology*, 40, pp.187–195.
- Makino, S. et al., 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 29, pp.1–13.
- Manigrasso, M.B. et al., 2012. Combined inhibition of aromatase activity and dihydrotestosterone supplementation attenuates renal injury in male streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *AJP: Renal Physiology*, 302, pp.F1203–F1209.
- Marcus, Y., Shefer, G. & Stern, N., 2013. Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 378, pp.1–14.
- Marquez, E. et al., 2014. Albumin inhibits the insulin-mediated ACE2 increase in cultured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(11), pp.F1327–34. Available at:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24671333.

- Marquez, E. et al., 2014. Renin-angiotensin system within the diabetic podocyte. *AJP: Renal Physiology*, 308(1), pp.F1–F10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339703> [Accessed March 13, 2015].
- Melez, K.A. et al., 1980. Diabetes is associated with autoimmunity in the New Zealand Obese (NZO) mouse. *Diabetes*, 29, pp.835–840.
- Mogensen, C.E., 1987. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney International*, 31, pp.673–689.
- Mogensen, C.E., Christensen, C.K. & Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32, pp.64–78.
- Morgan, H.D. et al., 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics*, 23, pp.314 – 318.
- Nadarajah, R. et al., 2012. Podocyte-specific overexpression of human angiotensin-converting enzyme 2 attenuates diabetic nephropathy in mice. *Kidney International*, 82, pp.292–303.
- Ninomiya, H., Inomata, T. & Ogihara, K., 1999. Obstructive uropathy and hydronephrosis in male KK-Ay mice: a report of cases. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61, pp.53–57.
- Niu, M.J. et al., 2008. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 leads to impaired glucose homeostasis in mice. *Endocrine*, 34, pp.56–61.
- Okazaki, M. et al., 2002. Diabetic nephropathy in KK and KK-Ay mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 51, pp.191–196.
- Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT), 2012. *Registre de malalts renals de Catalunya*,
- Ortiz, A. et al., 2015. Translational value of animal models of kidney failure. *Eur J Pharmacol.*, Jul 15;(759), pp.:205–20.
- Otero, A. et al., 2010. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 30, pp.78–86.
- Oudit, G.Y. et al., 2006. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *The American journal of pathology*, 168, pp.1808–1820.
- Patel, B., Agarwal, S. & Bhadada, S., 2012. Perindopril protects against streptozotocin-induced hyperglycemic myocardial damage/alterations. *Human & Experimental Toxicology*.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R., 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, 86, pp.747–803.

- Peach MJ., 1977. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.*, Apr;(57(2):), pp.313–70.
- Qi, Z. et al., 2004. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *American journal of physiology. Renal physiology*, 286, pp.F590–F596.
- Ridgway, W.M. et al., 2007. New tools for defining the “genetic background” of inbred mouse strains. *Nature Immunology*, 8, pp.669 – 673.
- Riera, M. et al., 2014. Effect of Insulin on ACE2 Activity and Kidney Function in the Non-Obese Diabetic Mouse. *PLoS One*, 9(1), p.e84683. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24400109.
- Rivière, G. et al., 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension*, 46, pp.1169–1174.
- Rossing, P., 2005. The changing epidemiology of diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 48, pp.1439–1444.
- Ruggenenti, P., Cravedi, P. & Remuzzi, G., 2010. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. *Nature reviews. Nephrology*, 6, pp.319–330.
- Santos, R.A.S., Ferreira, A.J. & Simões E Silva, A.C., 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental physiology*, 93, pp.519–527.
- Der Sarkissian, S. et al., 2006. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 91, pp.163–198.
- Schena, F.P. & Gesualdo, L., 2005. Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, pp.S30–S33. Available at: http://jasn.asnjournals.org/content/16/3_suppl_1/S30.abstract.
- Schnackenberg, C.G. & Granger, J.P., 1997. Verapamil abolishes the preglomerular response to ANG II during intrarenal nitric oxide synthesis inhibition. *The American journal of physiology*, 272, pp.R1670–R1676.
- Schreyer, S.A., Wilson, D.L. & LeBoeuf, R.C., 1998. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 136, pp.17–24.
- Schwager, S.L., Carmona, A.K. & Sturrock, E.D., 2006. A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme. *Nat Protoc*, 1(4), pp.1961–1964. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17487183.
- Seaquist, E.R. et al., 1989. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *The New England journal of medicine*, 320, pp.1161–1165.

- Segev, Y. et al., 2004. Comparison between somatostatin analogues and ACE inhibitor in the NOD mouse model of diabetic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 19, pp.3021–3028.
- Segev, Y. et al., 1997. Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 8, pp.436–444.
- Serreze, D. V. & Leiter, E.H., 1994. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Current Opinion in Immunology*, 6, pp.900–906.
- Sesso, H.D. et al., 2000. Systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of cardiovascular disease risk in Men. *Hypertension*, 36, pp.801–807.
- Sharma, K. & Ziyadeh, F.N., 1994. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *The American journal of physiology*, 267, pp.F1094–F1001.
- Shiota, A. et al., 2010. Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 33, pp.298–307.
- Soler, M.J. et al., 2007a. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int*, 72(5), pp.614–623. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17579661.
- Soler, M.J. et al., 2007b. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney international*, 72, pp.614–623.
- Soler, M.J., Riera, M. & Batlle, D., 2012. New experimental models of diabetic nephropathy in mice models of type 2 diabetes: Efforts to replicate human nephropathy. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- Soro-Paavonen, A. et al., 2012. Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications. *J Hypertens*, 30(2), pp.375–383. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22179088.
- Studdy, P.R., Lapworth, R. & Bird, R., 1983. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. *Journal of clinical pathology*, 36, pp.938–947.
- Sturgeon, C., Sam, A.D. & Law, W.R., 1998. Rapid determination of glomerular filtration rate by single-bolus inulin: a comparison of estimation analyses. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 84, pp.2154–2162.

- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, pp.537–546.
- Takeda, M. et al., 2013. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. *Diabetes*, 62, pp.223–233.
- Tervaert, T.W.C. et al., 2010. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21, pp.556–563.
- Tikellis, C. et al., 2008. ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes. *Diabetes*, 57(4), pp.1018–1025. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18235039.
- Tikellis, C. et al., 2004. Improved Islet Morphology after Blockade of the Renin-Angiotensin System in the ZDF Rat. *Diabetes*, 53, pp.989–997.
- Tipnis, S.R. et al., 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275, pp.33238–33243.
- Turner, A.J. et al., 2002. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallo-carboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 80, pp.346–353.
- Turner, A.J. & Hooper, N.M., 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: Genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, pp.177–183.
- Vickers, C. et al., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 277(17), pp.14838–14843. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11815627.
- Wakeland, E. et al., 1997. Speed congenics: A classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunology Today*, 18, pp.472–477.
- Wicker, L.S., Todd, J.A. & Peterson, L.B., 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annual review of immunology*, 13, pp.179–200.
- Wiggins, J.E. et al., 2005. Podocyte hypertrophy, “adaptation,” and “decompensation” associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16, pp.2953–2966.
- Wishart, T.M. et al., 2007. Design of a novel quantitative PCR (QPCR)-based protocol for genotyping mice carrying the neuroprotective Wallerian degeneration slow (Wlds) gene. *Molecular neurodegeneration*, 2, p.21.

- Wolf, J., Lilly, F. & Shin, S.I., 1984. The influence of genetic background on the susceptibility of inbred mice to streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, 33, pp.567–571.
- Wong, D.W. et al., 2007. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *The American journal of pathology*, 171, pp.438–451.
- Wong, G., 2002. Speed confenics: applications for transgenic and knockout mouse strains. *Neuropeptides.*, Apr-Jun;36((2-3):), pp.230–6.
- Wysocki, J. et al., 2006. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes*, 55(7), pp.2132–2139. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16804085.
- Xiao, X. et al., 2009. Cellular and humoral immune responses in the early stages of diabetic nephropathy in NOD mice. *Journal of Autoimmunity*, 32, pp.85–93.
- Yamaleyeva, L.M. et al., 2012. Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes. *AJP: Renal Physiology*, 302, pp.F1374–F1384.
- Yamamoto, K. et al., 2006. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension*, 47, pp.718–726.
- Yang, H.Y., Erdös, E.G. & Levin, Y., 1971. Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 177, pp.291–300.
- Ye, M. et al., 2006. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 17(11), pp.3067–3075. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17021266.
- Ye, M. et al., 2006. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17, pp.3067–3075.
- Yoo, T.-H. et al., 2007. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney international*, 71, pp.1019–1027.
- Yoshioka, M. et al., 1997. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, 46, pp.887–894.
- Yuan, L. et al., 2013. Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency aggravates glucose intolerance via impairment of islet microvascular density in mice with high-fat diet. *Journal of Diabetes Research*, 2013.

- De Zeeuw, D. et al., 2004. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: Lessons from RENAAL. *Kidney International*, 65, pp.2309–2320.
- Zhang, H. et al., 2001. Collectrin, a Collecting Duct-specific Transmembrane Glycoprotein, is a Novel Homolog of ACE2 and is Developmentally Regulated in Embryonic Kidneys. *Journal of Biological Chemistry*, 276, pp.17132–17139.
- Zhao, C. et al., 2008. Cachexia in the non-obese diabetic mouse is associated with CD4+ T-cell lymphopenia. *Immunology*, 125, pp.48–58.
- Zhao, H.J. et al., 2006. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17, pp.2664–2669.
- Zheng, S. et al., 2004. Development of late-stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Diabetes*, 53, pp.3248–3257.
- Zhong, J. et al., 2010. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation*, 122, pp.717–728.
- Zhong, J.-C. et al., 2004. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 by all-trans retinoic acid in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 44, pp.907–912.