

Biología del podocito: Un nuevo paso adelante

Parte 1

PATRICK WAGNER GRAU

La membrana basal glomerular (MBG) representa la estructura de sostén principal del ovillo glomerular. Las células glomerulares endoteliales y mesangiales están situadas por dentro de la MBG mientras que los podocitos lo están en la facies externa de la membrana.

Los podocitos son células altamente especializadas con una organización celular y una citoarquitectura complejas⁽¹⁾. De esta manera, los podocitos están divididos en tres diferentes segmentos, desde el punto de vista tanto estructural como funcional: el cuerpo celular, las expansiones principales y los pies de los podocitos. Los cuerpos celulares y las expansiones principales no se hallan, generalmente, directamente ligados a la MBG, son más bien, estructuras que flotan libremente en el filtrado del espacio de Bowman, creando un verdadero subespacio entre el cuerpo celular y los pedicelos.

Por el contrario, los pies de los podocitos recubren la vertiente externa de la MBG y se entrelazan con los pedicelos de las células vecinas, formando hendiduras de filtración entre las células adyacentes. Además, las hendiduras de filtración son atravesadas por el diafragma de hendidura (DH).

Los podocitos están organizados en forma polarizada con un dominio de membrana luminal y un dominio abluminal, separados el uno del otro a nivel del DH. En su superficie luminal, los podocitos se hallan recubiertos por un glicocáliz bien desarrollado, compuesto por diversas sialoglicoproteínas, destacando entre ellas, la podocalixina^(2,3).

Takeda y col, han demostrado que la podocalixina funciona como una sustancia antiadhesión que mantiene abierta la vía de filtración entre los pedicelos vecinos del epitelio glomerular, por repulsión de cargas⁽⁴⁾. El revestimiento de superficie negativo no sólo contribuye a la carga negativa de la barrera

de filtración sino que es, asimismo, crítico en la formación y la preservación de la dinámica arquitectura de las expansiones podocitarias.

Hay otras proteínas presentes en la membrana del podocito: éstas son la tirosina fosfatasa GLEPP-1⁽⁶⁾ la podoplanina⁽⁷⁾, la nefrina⁽⁸⁾ y la podocina⁽⁹⁾.

El receptor de GLEPP-1 (Pt+pro) desempeña un importante rol en la regulación que asocia la filtración con la presión glomerular por medio de un efecto sobre la estructura y la función de los podocitos, como lo refleja la observación según la cual ratones deficientes en GLEPP-1 (Pt-pro) tienen una estructura alterada de los podocitos asociada a hipertensión arterial y a una disminución de la filtración glomerular⁽¹⁰⁾. Ha sido mostrado que la podocalixina es capaz de inhibir la adhesión célula-célula y de modificar las propiedades de unión de las células renales caninas Madin-Darby (MDCK)⁽⁴⁾.

Los pies de los podocitos no son estáticos sino que contienen un sistema contráctil similar al observado en los pericitos. Este aparato contráctil se compone de actina, de miosina-2, de alfa-actinina-4, de talina y de vinculina⁽¹¹⁾. Ciertas mutaciones de la alfa-actinina-4 resultan responsables de la aparición de una glomeruloesclerosis segmentaria y focal familiar⁽¹²⁾. Estos resultados poseen implicancias directas para la comprensión del rol del citoesqueleto de los podocitos en la fisiopatología renal. Se sabe que los haces de filamentos de actina forman arcos entre los pedicelos adyacentes del mismo podocito⁽¹¹⁾.

De manera importante, los filamentos de actina conectados a la MBG subyacente, en puntos de contacto focales, por intermedio de la integrina alfa3beta1⁽¹³⁾.

La inactivación de la integrina alfa3 provoca un defecto de formación de los pies de los podocitos⁽¹⁴⁾. Se ha reportado, recientemente, que los pies de los podocitos contienen, además,



un segundo sistema de unión a la MBG, constituido por los distroglicanos alfa y beta por la utrofina⁽¹⁵⁾, que es regulado de manera diferencial en la enfermedad a lesiones glomerulares mínimas y en la glomeruloesclerosis segmentaria y focal⁽¹⁶⁾. Además de las proteínas contráctiles descritas, se ha reportado recientemente la asociación de la sinaptopodina con los filamentos de actina en los pies de los podocitos⁽¹⁷⁾. La sinaptopodina es el primer miembro de una nueva clase de proteínas, ricas en prolina, que se encuentran también en un subgrupo de dendritas telencefálicas^(17,18).

La pared glomerular es altamente permeable al agua, a los solutos pequeños y a los iones, pero es impermeable a las proteínas plasmáticas y a las otras moléculas de gran tamaño, produciendo así un filtrado glomerular virtualmente desprovisto de proteínas. Las características estructurales que dan cuenta de esta especificidad, son aún insuficientemente conocidas.

A lo largo del paso de la barrera de filtración, el filtrado ha de atravesar poros abiertos del endotelio glomerular, la red colagénica altamente hidratada de la MBG y las hendiduras de filtración. Estas hendiduras están establecidas por las interdigitaciones de los pies de los podocitos y se hallan cubiertas por el DH que está anclado lateralmente a los pies de los podocitos. En 1974, Rodewald y Karnovsky publicaron un modelo de estructura fina del DH, basado en sus observaciones en microscopía electrónica de transmisión de un material coloreado por el ácido tánico⁽¹⁹⁾. De acuerdo con sus resultados, el DH está constituido por unidades conectadas en su centro con una formación lineal, formando una estructura parecida a un cierre relámpago. El espacio intercelular abarcado por el DH, de un ancho de 30 a 40 nm, así como los poros rectangulares del cierre relámpago, tienen el aproximado tamaño de una molécula de albúmina. Un muy fecundo descubrimiento ha sido el de la nefrina, producto de un gen que se encuentra mutado en el SN congénito de tipo finlandés (CNF, NIPHS1, MIM-256300)⁽²⁰⁾, que ha sido localizado en el DH^(8,21,22). De forma interesante, los ratones mutados para la nefrina desarrollan una proteinuria masiva desde el nacimiento, con una fusión sólo parcial de los pies de los podocitos y un estrechamiento de las hendiduras de filtración⁽²³⁾, indicando que diversas proteínas transmembranales contribuyen a la constitución del DH.

El complejo del diafragma de hendidura contiene, en efecto, además de la ZO-1 y de la nefrina, también P-cadherina^(24,25) así como cateninas gama pudiendo así representar una unión adherente modificada⁽²⁴⁾.

Así, la P-cadherina parece ser la proteína del esqueleto del DH mientras que la nefrina forma parte de las proteínas específicas de este diafragma.

Aún cuando la P-cadherina se expresa en elevadas concentraciones en la placenta y el testículo, los ratones machos y hembras invalidados para la P-cadherina son fértiles⁽²⁶⁾. Las cadherinas-E y P se hallan frecuentemente coexpresadas en los tejidos embrionarios y adultos; por ejemplo, ambas cadherinas están presentes en la cuerda dorsal y en las capas basales de la epidermis. En estos tejidos, la E-adherina puede sustituir funcionalmente a la P-cadherina en animales mutantes, explicando así su viabilidad⁽²⁶⁾.

De la misma manera, la E-adherina se expresa también en los podocitos⁽²⁴⁾ y puede sustituir a la P-cadherina a nivel del DH. Se requieren, indudablemente, estudios complementarios para analizar la función renal y la morfología de los ratones mutantes para la P-cadherina y también para clasificar este problema.

Los podocitos son lesionados en muchas formas de enfermedad glomerular, de origen inmune (glomerulonefritis membranosa), tóxico (modelo del aminonucleósido de puromicina, que produce un cuadro histológico parecido al de las lesiones glomerulares mínimas), metabólico (diabetes mellitus) y hemodinámico (hipertensión glomerular). Con excepción de la nefropatía asociada a la infección por VIH y la glomeruloesclerosis segmentaria y focal idiopática con colapso^(27,28), las anomalías estructurales que sobrevienen son secundarias a la respuesta a la lesión podocitaria. En efecto las observaciones histológicas son idénticas sea cual sea la causa subyacente. Los eventos más precoces se caracterizan por la alteración de los pies de los podocitos y la configuración del DH, con pérdida de los pies de los podocitos y de la integridad de este diafragma. La fusión de los pies de los podocitos se asocia al inicio de la proteinuria y al desprendimiento de los podocitos de la MBG⁽²⁹⁾. Estos fenómenos se acompañan de la reorganización del citoesqueleto de actina en una red densa, precedida por la inducción de la expresión de la alfa-actinina podocitaria⁽³⁰⁾. Estas lesiones precoces son totalmente reversibles. Sin embargo, los mecanismos moleculares que provocan las alteraciones morfológicas de los pies de los podocitos están aún insuficientemente comprendidos y constituyen un activo dominio de investigación⁽⁵⁾.

Desde el punto de vista de las enfermedades glomerulares progresivas, resulta importante reconocer que si las lesiones estructurales precoces no son eliminadas, se desarrollarán entonces lesiones glomerulares severas y progresivas. Dichas lesiones comportan la vacuolización de los podocitos, la formación de pseudoquistes y el desprendimiento de los podocitos de la MBG. Estos eventos subyacen a la formación de sinequias por la adhesión de las células parietales epiteliales de la cápsula de Bowman a las zonas deterioradas de la MBG. Estas lesiones son ya irreversibles y conducen de ma-



nera última al desarrollo de la glomeruloesclerosis segmentaria y a la insuficiencia renal terminal⁽³¹⁾.

La diferenciación de los podocitos del hombre y de la rata *in vitro* se asocia a una detención irreversible del crecimiento.

Con el fin de cortocircuitar o "bypasear" este problema, Mundel y col, derivaron líneas celulares de podocitos inmortalizados a partir del "immorto-mouse", que portan un antígeno T sensible a la temperatura como transgen⁽³²⁾.

Estas células pueden ser mantenidas o en un estado de proliferación a 33° C o ser inducidas hacia la diferenciación a 37° C. Los podocitos que proliferan y se diferencian expresan la proteína WT-1⁽³³⁾. La célula diferenciada muestra un arreglo ordenado de los filamentos de actina y de los microtúbulos, extendiéndose en los pedicelos en formación, en el curso de la diferenciación, recordando a las expansiones podocitarias *in vivo*.

Estos rearrreglos del citoesqueleto y la formación de las expansiones se acompañan del comienzo de la síntesis de sinaptopodina⁽³³⁾.

Además de la WT-1 y de la sinaptopodina, los podocitos de ratón expresan otras proteínas que son específicas de los podocitos. Ha sido posible detectar podocalixina por RT-PCR y por análisis en Northern blot⁽³⁴⁾.

Con ayuda de la RT-PCR y la inmunocitoquímica, ha sido posible hallar la expresión de la tirosina-fosfatasa GLEPP-1, específica del podocito⁽⁶⁾. Además, las células también expresan la nefrina⁽²⁰⁾, la proteína CD2AP asociada a la nefrina⁽³⁵⁾ y el homólogo murino de la podoplanina⁽²⁰⁾.

Expresan, asimismo, diversos receptores o una amplia variedad de sustancias vasoactivas, incluyendo la bradiquinina⁽³³⁾ y un receptor funcional de la angiotensina II⁽³³⁾. En su conjunto, muestran estos estudios que las líneas celulares inmortalizadas de podocitos de ratón conservan un potencial de diferenciación similar al de los podocitos *in vivo* y confirman que se trata de instrumentos útiles para estudiar tanto la diferenciación como la función de los podocitos *in vitro*.

En resumen, la identificación y la caracterización moleculares de un buen número de nuevas proteínas específicas de los podocitos, entre las que destacan la podocalixina, GLEPP-1, la podoplanina, pod-1, la sinaptopodina, la nefrina, CD2AP y ahora también la podocina⁽⁹⁾ deberían abrir nuevas vías para el estudio de los mecanismos moleculares que determinan el borramiento y la fusión de los pies de los podocitos, la proteinuria y la progresión de la esclerosis glomerular. El reciente desarrollo de las líneas celulares de podocitos de ratón inmortalizados que conservan un potencial de diferenciación idéntico al

de los podocitos *in vivo*⁽³³⁾ y la disponibilidad de estrategias de "ciblaje" específico para los podocitos^(36,37) deberían facilitar el análisis de las funciones del podocito tanto en condiciones normales como patológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Embryol Berl* 1995; 192: 385-97.
2. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar R MG. Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoglycoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98: 1591-96.
3. Kershaw DB, Thomas PE, Wharram BL, et al. Molecular cloning, expression and characterization of podocalyxin-like protein from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium. *J Biol Chem* 1995; 270: 29439-46.
4. Takeda T, Gowdy O, Orlando RA, Farquhar MG. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in madin-darby canine kidney cell. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 3219-32.
5. Somlos M, Mundel P. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 333-5.
6. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, et al. GLEPP-1, a renal glomerular epithelial (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning and characterization in rabbit. *J Biol Chem* 1994; 269: 19953-62.
7. Breitender-Geleffs M, Matsui K, Soleimani A, et al. Podoplanin, novel 43-kD membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1141-52.
8. Ruotsalainen V, Lijnberg P, Wartiovaara J, et al. Nephric is specifically located at the slit diaphragm glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962-67.
9. Boute N, Gribouval O, Rosellis, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-54.
10. Wharram BL, Goyal M, Gillespie J, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest* 2000; 106: 1281-90.
11. Drenckhahn D, Francke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat and man. *Lab Invest* 1988; 59: 673-82.
12. Kaplan JM, Kimsh N, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-6.
13. Adler S. Characterization of glomerular epithelial. Cell matrix receptors. *Am J Pathol* 1992; 141: 571-8.
14. Kreidberg JA, Donovan MJ, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 1996; 122: 3537-47.
15. Raats CJ, Van Den Born J, Baaker MA, et al. Expression of agrin, dystroglycan and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 2000; 156: 1749-65.
16. Regele HM, Filipovic E, Langer B, et al. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 403-12.
17. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, et al. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139: 40.
18. Dellert M, Merten T, Roth SU, et al. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol* 2000; 418: 164-81.



19. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol* 1974; 60:423-33.
20. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally clone gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1:575-82.
21. Holthofer H, Ahola H, Solin ML, et al. Nephrin localizes at her podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 1999; 155: 1681-7.
22. Holzman LB, John PL, Kovari IA, et al. Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999; 56:1481-91.
23. Putaala H, Soinnen R, Kilpelainen P, et al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1-8.
24. Reiser J, Kriz W, Kritzler M, Munder P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1-8.
25. Routsalancin V, Patrakka J, Tissari P, et al. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* 2000; 157-16.
26. Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, et al. Precocious mammary gland development in P-cadherin deficient mice. *J Cell Biol* 1997; 139: 1025-32.
27. Barisonil L. Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. *Kidney Int* 2000; 58:81-7.
28. Barisonil L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 51-61.
29. Kris W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54: 687-97.
30. Smoyer WE, Mundel P, Gupta A, Welsh MJ. Podocyte alpha actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephritic syndrome. *Am J Physiol* 1997; 273: F150-7.
31. Kris W, Hosser H, Hannel B, et al. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2781-98.
32. Jay PJ, Noble MD, Ataliotis P, et al. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-TsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5096-00.
33. Mundel P, Reiser J, Borja AZ, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 236: 248-58.
34. Mundel P, Schwarz K, Reiser J. The biology of podocyte: the progress. *Act Nephrol Hôp Nécker*, 2001; pp 219-24.
35. Shin NJ, Li J, Karpitskiy, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice locking CD2 associated protein, *Science* 1999; 286:312-5.
36. Moeller MJ, Kovari JA, Holzman LB. Evaluation of a new tool for exploring podocyte biology; mouse nphs 15' flanking region drives Lac Z expression in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2306-14.
37. Wong MA, Cui S, Quaggin SE. Identification and characterization of a glomerular specific protein from the human nephrin gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F1027-32.