



Factores patogénicos en la nefropatía diabética. ¿De dónde venimos y hacia dónde vamos?

B. Marrón, A. Ortiz y J. Egido

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

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las causas principales de insuficiencia renal terminal (IRT) en los países desarrollados y su incidencia está aumentando. Aunque existe una variabilidad geográfica, étnica y genética, aproximadamente un tercio de los pacientes con DM tipo I y un 15-20% de los diabéticos tipo II presentarán IRT. Este segundo grupo es quizá el más importante dado que su número es cada vez mayor. En ambos tipos de diabetes la hiperglucemia es el fenómeno primario. En la DM tipo I aparece en las primeras décadas y es la única causa de nefropatía; en la DM tipo II comienza después de la cuarentena, y el riñón puede sufrir el daño de patologías relacionadas con el envejecimiento, la hipertensión arterial (HTA), la obesidad, la dislipidemia o el tabaco. De cualquier modo, la nefropatía diabética (ND) constituye una entidad clínica e histológica única, aunque todavía se desconoce si la patogenia es exactamente igual para la tipo I y la tipo II. Así, la glomerulopatía diabética pura es más frecuente en los pacientes que han tenido una instauración de la hiperglucemia en edades tempranas y se encuentran en una fase clínica de microalbuminuria, mientras que los cambios de índole vascular y de daño tubulointersticial predominan más en diabéticos tipo II en los que existe macroalbuminuria e HTA.

A pesar de tener cada vez más conocimiento de los mecanismos patogénicos implicados, el patrón heterogéneo de enfermedad renal que existe en la diabetes del adulto hace que la evolución, la respuesta al tratamiento y el pronóstico esté pobremente caracterizado. Es decir, se debería considerar por separado a los diabéticos tipo I de los tipo II,

así como a los que tienen nefropatía incipiente de los que tienen una nefropatía establecida.

Múltiples factores patogénicos se han implicado en el desarrollo de nefropatía, sin embargo, la patogenia persiste incompletamente entendida. Se pone así de manifiesto que existen mecanismos diversos implicados que producen trastornos hemodinámico-funcionales y estructurales.

Algunos estudios como el UKPDS¹ han demostrado que la progresión de la ND puede reducirse, pero no prevenirse de manera global si se realiza únicamente un estricto control glucémico y un buen control tensional. Por este motivo, el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la ND resulta imprescindible para el desarrollo de nuevos marcadores de diagnóstico precoz y para conseguir nuevas líneas terapéuticas.

CAMBIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

El primer cambio objetivable después del diagnóstico de DM es el incremento del tamaño renal y del volumen glomerular secundario a factores hemodinámicos que potencialmente son reversibles y que no implican necesariamente una progresión hacia la ND. Algunos años más tarde se produce un aumento de la matriz extracelular (engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular y expansión de la matriz mesangial) y una hiperplasia proximal tubular. Estudios con microscopía electrónica han demostrado que el aumento de la matriz extracelular se correlaciona directamente con el grado de microalbuminuria, siendo ésta la manifestación más precoz de ND, que también se ha asociado en los pacientes con DM tipo II a una mayor morbi-mortalidad cardiovascular². La proliferación de nuevos tipos de colágeno que sustituyen al colágeno habitual de la matriz extracelular, resulta en una pérdida de la estructura fisiológica y morfológica del glomérulo. Cambios semejantes se pueden observar en el intersticio renal y en las arteriolas glomerulares. En la membrana basal existe un engrosamiento por deposición de colágeno y una pérdida de proteo-

Correspondencia: Dr. J. Egido
Laboratorio de Nefrología Experimental
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid
E-mail: jegido@fjd.es

glicanos tipo heparán sulfato que hace perder la habitual carga aniónica de la membrana, incrementándose la permeabilidad a la albúmina.

Expansión de la matriz extracelular

Como se ha referido previamente, la alteración típica de la matriz extracelular renal en la diabetes incluye una síntesis excesiva de colágeno que se deposita en las membranas basales, engrosándolas. Se produce así colágeno tipo III, IV, VI, tenascina y fibronectina. El colágeno tipo IV constituye un fenómeno temprano en esta síntesis incrementada con una sobreexpresión génica en diversas células renales como mesangiales, epiteliales y tubulares, mostrando un especial tropismo e implicándose claramente en el proceso de glomeruloesclerosis³.

Otro mecanismo que participa en la proliferación de la matriz mesangial es el desequilibrio existente entre la producción y deposición de proteínas de matriz y la degradación de las mismas que ocurre a través de la actividad de metaloproteinasas (MMP). En el caso de la diabetes, experimentalmente se ha visto que hay un mecanismo de degradación anormal, con inhibición de los factores implicados en la degradación y una sobreexpresión de los factores favorecedores de la expansión mesangial. Los datos en humanos son muy similares, con una expresión pobre del gen para las MMP tipo 2 (MMP2), y una expresión apropiada de su inhibidor específico (TIMP2), que es capaz de expresarse en el glomérulo de pacientes con DM aún sin nefropatía clínica o histológica, aunque no se ha encontrado una correlación directa entre la expresión baja de MMP2 y la severidad de la nefropatía⁴. El fallo descrito en la incapacidad para la degradación de la matriz parece colaborar y precisarse para la instauración de una ND, aunque no es una condición suficiente⁵. El factor transformante de crecimiento beta (TGFβ) también incrementa la proliferación del mesangio y disminuye su degradación.

EFFECTOS PATOGENICOS DE LA GLUCOSA

Mecanismos indirectos

La glucosa puede reaccionar con diversas proteínas de manera pasiva (no enzimática) por su grupo carbonilo, produciendo productos de glicosilación avanzada (AGEs). Se ha demostrado acúmulo de AGEs en la corteza renal de ratas diabéticas⁶ y en los glomérulos esclerosados de pacientes con DM⁷. Entre las consecuencias biológicas de los AGEs encontramos:

entrecruzamiento (cross-linking) de proteínas de larga vida media en la matriz extracelular, disminución de la actividad del óxido nítrico, aumento de la permeabilidad vascular, activación de receptores específicos (RAGES) en macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso y células mesangiales, lo que activa el factor de transcripción NFκB y la expresión de genes de la respuesta inflamatoria⁸. Experimentalmente, la aminoguanidina, un inhibidor de la formación de AGEs, previene la microalbuminuria, la proteinuria y la esclerosis glomerular de la ND⁹, efecto independiente de la tensión arterial. Todavía no hay datos de su uso en humanos.

Mecanismos directos

Los niveles altos de glucosa ejercen efectos tóxicos en el interior de las células a través de su incorporación por transportadores de glucosa (como GLUT-1). Se produce así una cadena enzimática de distintas reacciones que incluyen: formación de sorbitol, aumento de stress oxidativo, activación de proteína quinasa C (PKC) y activación de la ruta de la hexosaminasa. Todas ellas contribuyen a la activación de citoquinas y de factores de crecimiento.

La vía de los polioles

La aldolasa reductasa metaboliza la glucosa a sorbitol. Sin embargo, el aumento que se produce de sorbitol renal no parece ser un factor que contribuya de manera decisiva en la ND. La inhibición de la aldolasa reductasa en el animal experimental disminuye la expansión mesangial.

El papel oxidativo de la glucosa

Experimentalmente se ha demostrado que la glucosa induce la formación de radicales de oxígeno, lo que podría favorecer el incremento de la apoptosis en células tanto endoteliales¹⁰ como tubulares¹¹.

La proteína quinasa C (PKC)

El aumento de diacilglicerol intracelular tiene como consecuencia la activación de la PKC. Diversos grupos de trabajo han encontrado que esta enzima se encuentra activada en las células vasculares de los diabéticos¹². Su papel se ha visto claramente implicado en el tratamiento de animales

diabéticos al administrar un inhibidor específico (LY-333531) que es capaz de inhibir de manera precoz el daño renal y retiniano¹³.

CITOQUINAS

Estudios fundamentalmente experimentales han puesto de manifiesto la participación de diversas citoquinas en la patogenia de las complicaciones microvasculares de la diabetes. Entre éstas destacan el TGF β 1, el CTGF (factor de crecimiento del tejido conjuntivo), la angiotensina II (A-II) y el VEGF (Factor de crecimiento endotelial).

TGF β 1

El TGF β 1 es una citoquina fundamentalmente fibrogénica, pero que también tiene un efecto regulador de la proliferación celular, inmunosupresor y antiproliferativo. El TGF β 1 aumenta la producción de matriz extracelular, disminuye la actividad de enzimas degradadoras y modula la expresión de receptores para matriz. Existen dos formas biológicas: el TGF β 1 activo y el TGF β 1 latente o biológicamente inactivo. La expresión de TGF β 1 está aumentada en el glomérulo de animales de experimentación diabéticos y en la ND en humanos¹⁴. La excreción urinaria de TGF β 1 en pacientes con microalbuminuria está incrementada respecto a pacientes con normoalbuminuria¹⁵, y los anticuerpos neutralizantes anti-TGF β 1 se han visto beneficiosos en la ND experimental¹⁶. Se ha sugerido que la PKC y el factor de transcripción AP1 son responsables del incremento en la expresión génica de TGF β 1 en el glomérulo diabético¹⁷. También se ha demostrado que la A-II induce la expresión génica de TGF β 1 en células mesangiales en el seno de altas concentraciones de glucosa¹⁸.

Existe menos información sobre la participación de otros tipos de TGF β , como el TGF β 2 y el TGF β 3, así como de los receptores de TGF β en la patogenia de la ND.

CTGF

Es una citoquina recientemente identificada por varios grupos cuyo objetivo de trabajo era la búsqueda en un modelo experimental de genes cuya expresión aumentase en células mesangiales en presencia de hiperglucemia¹⁹. El CTGF es responsable de la mayor parte del efecto inductor de síntesis de matriz extracelular por parte del TGF β 1 en estas células. Su utilización como objetivo terapéutico ten-

dría como ventaja que actuaría sobre todo en el efecto fibrogénico del TGF β 1, respetando sus otras acciones, como su efecto antiinflamatorio. Hemos de recordar aquí que la ausencia de TGF β 1 en ratones causa una enfermedad inflamatoria multifocal, que afecta, entre otros órganos, al riñón.

EL sistema renina-angiotensina (RAS)

Los inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina (ECA) enlentecen la progresión de la insuficiencia renal en la ND, y no sólo por motivos ligados al control de la HTA. La A-II está imbricada en un mosaico de distintas acciones. Se trata de un factor de crecimiento, con propiedades vasoactivas, que actúa como péptido profibrogénico, y que es capaz de inducir en estudios *in vitro* la hipertrofia y proliferación de diversas células como las de músculo liso vascular, las mesangiales glomerulares y las células tubulares proximales. En algunas circunstancias también induce apoptosis. Gran parte de su actividad fibrogénica está mediada por el TGF β 1. Cuando se estudia la expresión génica de los distintos componentes del RAS en el tejido renal los resultados son contradictorios, por lo que no se conoce el papel que juega cada uno de estos factores. El hecho más concluyente es que existe una infraexpresión (down-regulation) de los receptores para la A-II en el glomérulo y en los túbulos de las ratas diabéticas, lo que sugiere una sobreproducción de A-II libre. Esto parece indicar que existe una acción exagerada de la A-II local y un feedback negativo que disminuye la expresión de su receptor²⁰. La A-II induce la expresión de TGF β 1 y de sus receptores²¹.

Otro mecanismo interesante a considerar es que la A-II es capaz de estimular la incorporación de glucosa y la transcripción del transportador de glucosa (GLUT-1) en distintas células. Esto permite suponer que la inicial actividad incrementada del RAS en diabéticos, por un mecanismo que hipotéticamente podría ser mediado por factores genéticos, permitiría que la incorporación de glucosa al interior celular fuera mayor en los diabéticos con riesgo de nefropatía que en los que no está presente⁵.

En resumen, se puede decir que tanto la hiperglucemia como la activación de A-II en el diabético tienen efectos aditivos en la activación de la PKC, que a su vez a través de reacciones de fosforilación es capaz de inducir hipertrofia y proliferación celular (fig. 1). Sin embargo, no es bien conocido si la A-II y la hiperglucemia comparten la misma cascada intracelular en cuanto a la PKC o si pueden existir distintas isoformas que induzcan la expresión de

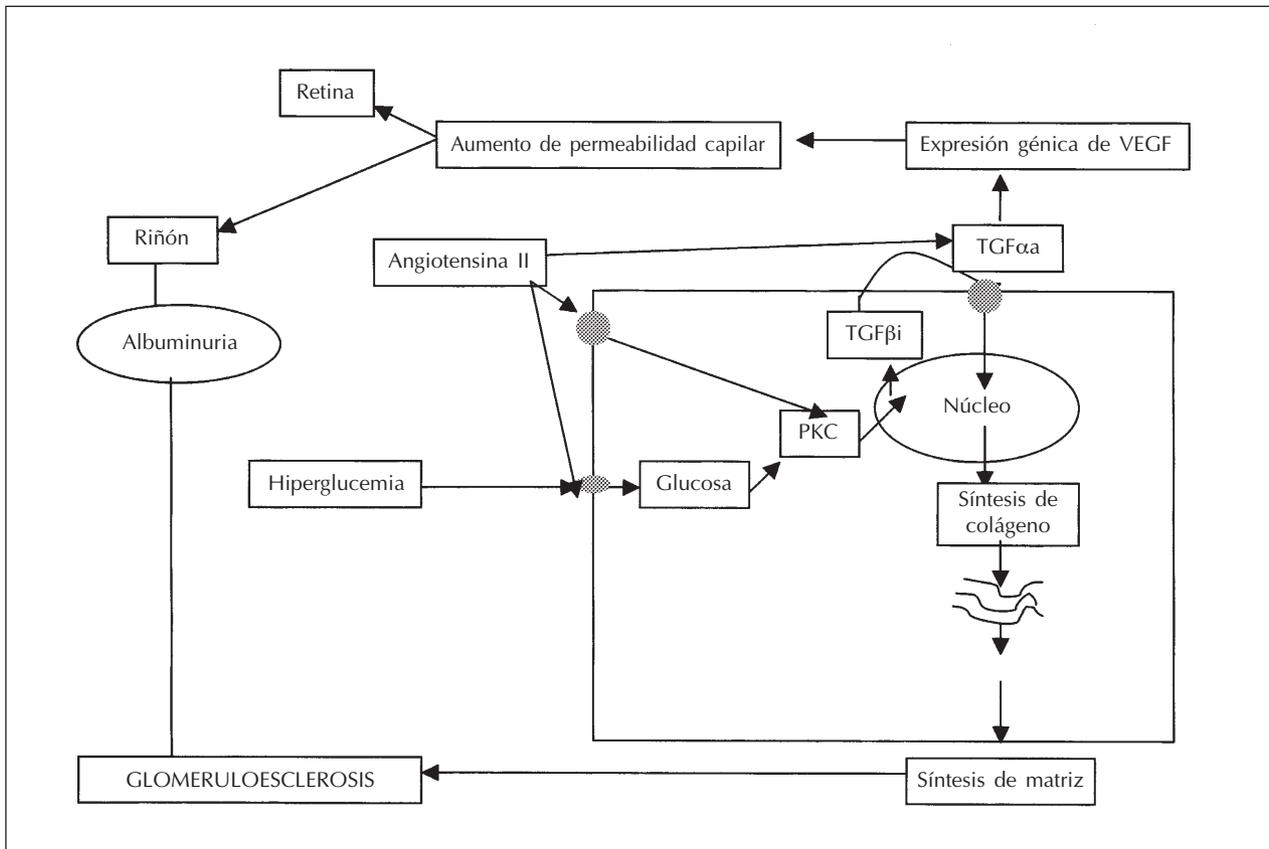


Fig. 1.—Interrelación entre la hiperglucemia, angiotensina II, TGFβ1 y VEGF. La hiperglucemia y la activación de A-II en el diabético, tienen efectos aditivos en la activación de la proteína quinasa C (PKC).

TGFβ1, como parecen apuntar algunos estudios en células epiteliales glomerulares.

Más recientemente, dos grupos independientes han descrito una nueva ECA (ECA-2) en humanos, que se expresa predominantemente en riñón y corazón, por lo que podría estar relacionada con las complicaciones cardíacas y renales derivadas del RAS. Esta enzima no es inhibida por los inhibidores tradicionales del enzima de conversión.

VEGF

El VEGF es el factor de crecimiento del endotelio vascular que regula de forma crucial la angiogénesis. Esta función vascular se encuentra alterada en la DM, favoreciendo la neoangiogénesis y participando en el espectro de complicaciones como la retinopatía (formación de microaneurismas) y la nefropatía (pérdida de pericitos que favorece la microalbuminuria). Aunque de un modo puramente es-

peculativo, se puede decir que el VEGF es capaz de incrementar la permeabilidad capilar glomerular favoreciendo la microalbuminuria y el paso de diversos factores de crecimiento, bien desde el torrente sanguíneo o por células endoteliales activadas, colaborando así a la proliferación de matriz extracelular glomerular y la producción de glomerulosclerosis. Hipotéticamente, y pensando en una predisposición genética para la nefropatía en algunos diabéticos, es probable que exista una regulación anormal del gen para el VEGF, produciendo una sobreexpresión local exagerada que a su vez produciría uniones alteradas en los proteoglicanos de la matriz extracelular⁵. De forma experimental se ha visto que el inhibidor selectivo de la PKC es también inhibidor selectivo del VEGF, y capaz de suprimir la hiperpermeabilidad a nivel retiniano y disminuir la microalbuminuria²³.

En experimentos *in vitro* se ha visto que el VEGF es producido de manera fisiológica exclusivamente por las células epiteliales del glomérulo. Sin embar-

go, la hipoxia, la hiperglucemia (a través de la PKC) y el TGF β 1 pueden inducir la expresión de VEGF en otras estirpes celulares, como células musculares lisas y células mesangiales^{24,25}.

CONSERVAR LA CELULARIDAD RENAL

Las nefropatías progresivas se caracterizan por la pérdida de la celularidad parenquimatosa renal por apoptosis. Existe poca información sobre los mecanismos que regulan la eventual pérdida de células que conduce a la atrofia tubular y a la reducción de células glomerulares en la ND. La hiperglucemia induce apoptosis de células endoteliales y tubulares renales y este efecto, al igual que en el blastocisto, es críticamente dependiente de la proteína letal intracelular Bax¹¹. Desde este punto de vista, la hiperglucemia y la diabetes son factores de riesgo independientes para el fracaso renal agudo isquémico²⁶, y es posible que isquemias repetidas de bajo nivel colaboren a la progresión de la ND. Es materia de especulación que se pueda intervenir sobre la muerte celular como medio para retrasar la evolución de la ND.

¿POR QUÉ EXISTE HETEROGENEIDAD EN EL DESARROLLO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA?

Resulta llamativo que tan solo un 30% de los pacientes con diabetes desarrollen nefropatía, y que exista una agrupación de estos pacientes en familias. Esto sugiere un papel clave de la predisposición genética para el desarrollo de nefropatía cuya base biológica es todavía desconocida. Se ha observado también una predisposición genética al desarrollo de nefropatía progresiva en ciertas cepas de animales de experimentación y en pacientes afectados de nefropatías no diabéticas. El estudio de los polimorfismos de genes que codifican factores implicados en la ND puede aportar información sobre las causas de la predisposición genética. De hecho, algunos autores han asociado una más rápida progresión de la nefropatía a la presencia de determinados alelos de la ECA, de la apolipoproteína E y de la aldosa reductasa. Sin embargo, es muy probable que los patrones de herencia de la predisposición a la ND sean poligénicos, y la mayoría de los posibles candidatos no han sido estudiados todavía (polimorfismos del TGF β 1 y de sus receptores, transportadores de glucosa, ECA-2, etc.) y muchos no son todavía conocidos. La reciente secuenciación del genoma humano y la tecnología de los microarrays, que permite examinar miles de genes en un solo experimento²⁷, pueden promover el avance en este campo.

Otros factores genéticos estudiados han sido los antecedentes familiares de HTA que parecen predisponer al desarrollo de ND, a través de una actividad incrementada del cotransportador Na⁺/Li o Na/H⁺. De cualquier modo, los distintos estudios sobre factores genéticos y ND revelan resultados controvertidos.

REMODELAMIENTO EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA

Estudios iniciales en pacientes diabéticos con nefropatía que recibieron un trasplante pancreático sugerían que ciertas lesiones estructurales eran irreversibles. Un seguimiento más prolongado (10 años) ha demostrado que la expansión de la matriz extracelular es potencialmente reversible y ha abierto un nuevo campo de investigación: la definición de los mecanismos de reversión de las lesiones estructurales glomerulares de la ND²⁸. Algunos factores implicados en la reparación glomerular han sido recientemente revisados²⁹.

CONCLUSIONES

La hiperglucemia es el motor patogénico de la ND. Las consecuencias patogénicas de la hiperglucemia pueden deberse a efectos lesivos directos de la glucosa sobre las células o a efectos indirectos a través de la glicosilación no enzimática de proteínas. Ambos procesos desencadenan reacciones de activación de señales intracelulares que modifican la biología celular, la matriz extracelular y la producción de citoquinas, entre las que destacan el TGF β 1 y la A-II. Es preciso delimitar el papel relativo de esos factores y definir la participación de nuevos mediadores como el ECA-2. Más urgente resulta definir las bases moleculares que justifican la predisposición genética al desarrollo de ND, lo que aportará información sobre mecanismos patogénicos y permitirá dirigir los esfuerzos terapéuticos a la población de alto riesgo. Por último, el estudio de los factores implicados en el remodelamiento y restitución de la normalidad de la estructura renal en los pacientes diabéticos con nefropatía trasplantados de páncreas deben ser dilucidados a fin de aplicar tratamientos que sean capaces de revertir el daño renal establecido.

BIBLIOGRAFÍA

1. UKPDS 33: An intensive blood glucose control policy with sulphonylureas or insulin reduces the risk of diabetic complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352: 837-853, 1998.

2. Mogensen CE: Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 31: 673-689, 1987.
3. Ceol M, Nerlich A, Baggio B y cols.: Increased glomerular $\alpha 1$ (IV) collagen expression and deposition in long term diabetic rats is prevented by chronic glycosaminoglycan treatment. *Lab Invest* 74: 484-495, 1996.
4. Del Prete D, Anglani F, Forino M y cols.: Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase 2 gene in human NIDDM. *Diabetología* 40: 1449-1454, 1997.
5. Del Prete D, Anglani F, Ceol M, D'Angelo A, Forino M, Vianello D, Baggio B, Gambaro G: Molecular biology of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 13: 20-25, 1998.
6. Mitsuhashi T, Nakayama H, Ithoh T y cols.: Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat. *Diabetes* 42: 826-832, 1993.
7. Witztum JL, Miyata T, Maeda K y cols.: Immunohistochemical localization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 100: 2995-3004, 1997.
8. Bierhaus A, Chevion A, Chevion M y cols.: Advanced glycation endproduct (AGEs) induced activation of NF κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46: 1481-1490, 1997.
9. Soulis T, Cooper ME, Sastra S y cols.: Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetología* 40: 1141-1151, 1997.
10. Du XL, Sui GZ, Stockklauser-Farber K y cols.: Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells mediated by reactive oxygen species. *Diabetología* 41: 249-256, 1998.
11. Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG: Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Invest Med* 45: 50-56, 1997.
12. Larkins RG, Dunlop ME: The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetología* 35: 499-504, 1992.
13. Ishii H, Jirousek MR, Koya D y cols.: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272: 728-731, 1996.
14. Iwano M, Kubo A, Nishino T y cols.: Quantification of glomerular TGF β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49: 1120-1126, 1996.
15. Ellis D, Forrest KY, Erbey J, Orchard TJ: Urinary measurement of transforming growth factor β and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 44: 950-956, 1998.
16. Sharma K, Ziyadeh FN: Perspectives in diabetes. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor β as a key mediator. *Diabetes* 44: 1139-1146, 1995.
17. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K: Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 47: 782-788, 1995.
18. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437, 1994.
19. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR: Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 274: 5830-5834, 1999.
20. Cheng HF, Burns KD, Harris RC: Reduced proximal tubule angiotensin II receptor expression in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int* 46: 1603-1610, 1994.
21. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA: Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med* 77: 556-564, 1999.
22. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87: E1-9, 2000.
23. Ishii H, Jirousek MR, Koya D y cols.: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science* 272: 728-731, 1996.
24. Williams B, Gallagher B, Patel H, Orme C: Glucose induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Diabetes* 46: 1497-1503, 1997.
25. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T y cols.: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 6271-6274, 1994.
26. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT: Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *Ann Intern Med* 128: 194-200, 1998.
27. Penn SG, Rank DR, Hanzel DK, Barker DL: Mining the human genome using microarrays of open reading frames. *Nat Genet* 26: 315-318, 2000.
28. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M: Reversal of Lesions of Diabetic Nephropathy after Pancreas Transplantation. *N Engl J Med* 339: 69-75, 1998.
29. Kitamura M, Fine LG: The concept of glomerular self-defense. *Kidney Int* 55: 1639-1671, 1999.