



*UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA*  
*Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche (DIMI)*

**Dottorato di Ricerca in**  
**“MEDICINA INTERNA CLINICO-SPERIMENTALE” (XXX ciclo)**

**Curriculum:**  
**“Fisiopatologia e Clinica delle Malattie Renali, cardiovascolari e**  
**dell’ipertensione arteriosa”**

**Coordinatore: Prof. Marcello Bagnasco**

**“La miostatina: un nuovo mediatore di danno nella**  
**nefropatia diabetica”**

Relatore  
Prof. Giacomo Garibotto

Candidata  
Dott.ssa Samantha Milanesi

## **Indice**

### **1. Introduzione**

- 1.1 La Nefropatia diabetica
- 1.2 Microalbuminuria
- 1.3 Alterazioni morfologiche del rene
- 1.4 Aspetti molecolari della nefropatia diabetica
- 1.5 Miostatina

### **2. Scopo**

### **3. Materiali e Metodi**

- 3.1 Arruolamento pazienti
- 3.2 Preparazione istologica e immunoistochimica
- 3.3 Analisi di immagini
- 3.4 Laser-capture microdissection e estrazione di RNA
- 3.5 Colture cellulari
- 3.6 Proliferazione e Ciclo cellulare
- 3.7 Stress Ossidativo
- 3.8 Immunoistochimica
- 3.9 Western blot
- 3.10 Analisi mRNA
- 3.11 RNA Interference
- 3.12 Analisi statistica

### **4. Risultati**

- 4.1 L'espressione di miostatina aumenta nel rene dei pazienti con nefropatia diabetica.
- 4.2 Miostatina è espressa negli infiltrati delle biopsie dei

pazienti con nefropatia diabetica

4.3 L'ambiente diabetico induce l'espressione di miostatina nelle cellule tubulari prossimali

4.4 Effetti di miostatina sulle cellule tubulari prossimali

4.5 Effetti dell'ambiente simil-diabetico sull'espressione di miostatina e del suo silenziamento

## **5. Conclusioni**

## **1. Introduzione**

Il diabete è la più comune causa di malattia renale cronica negli Stati Uniti e in Europa. In base agli studi condotti su diverse popolazioni la prevalenza della malattia renale cronica, si aggira intorno al 18% della popolazione diabetica e tale percentuale aumenta in modo rilevante con l'avanzare dell'età: tra gli ultra sessantacinquenni diabetici, una persona su tre è affetta da una nefropatia di grado severo. Inoltre, soggetti con diabete e insufficienza renale cronica hanno un maggior rischio cardiovascolare e maggiore propensione a fratture, a sviluppare retinopatia e infezioni. Pertanto è fondamentale identificare strategie di diagnosi precoce, di prevenzione e trattamento.

Fino a qualche anno fa si riteneva che la nefropatia diabetica avesse sempre lo stesso tipo di evoluzione e cioè che la prima 'spia' di danno a comparire fosse la microalbuminuria seguita dalla macroalbuminuria e, infine, dalla riduzione del filtrato glomerulare. Più recentemente, studi osservazionali condotti su diverse migliaia di soggetti, hanno documentato come ci sia una percentuale rilevante di pazienti con diabete di tipo 2 (tra il 35% e il 50% circa) che perde una quota importante di filtrato, pur rimanendo normoalbuminurica. Quindi l'albuminuria, e in particolare la microalbuminuria, pur rimanendo importanti marcatori di rischio per la diagnosi e la progressione della malattia renale cronica in presenza di diabete, risultano essere scarsamente specifici e sensibili. Altri fattori di rischio per la malattia renale cronica in corso di diabete, sono

iperglicemia, ipertensione, durata del diabete, età, sesso, fumo e storia familiare, ai quali si affiancano nuovi biomarcatori, come marcatori di ossidazione e infiammazione, citochine pro-fibrotiche, livelli di acido urico, prodotti di glicazione (AGEs), fattori di disfunzione endoteliale, cambiamenti strutturali del rene e marcatori di danno tubulare. Tuttavia, ognuno di questi marcatori ha dei limiti e rimane la necessità di individuare dei biomarcatori affidabili per determinare quali pazienti diabetici sono a rischio di insorgenza e di progressione della malattia renale [1].

**Tabella 1.** Marcatori per l’insorgenza e la progressione della malattia renale cronica in corso di diabete. (AJKD 2014, 63(2)(S2):S39-S62).

Abbreviations: AER, albumin excretion rate; CKD, chronic kidney disease; CV, cardiovascular; DKD, diabetic kidney disease; (e)GFR, (estimated) glomerular filtration rate; ESRD, end-stage renal disease; TNF, tumor necrosis factor.

Marker for DKD	Advantages	Disadvantages
Albuminuria	Urinary albumin levels within the microalbuminuric range predict ESRD	High variability, low specificity for DKD; spontaneous regression and $\Delta$ AER within the microalbuminuric range $\neq$ $\Delta$ GFR
GFR	Best measure of kidney function	Routine methods for accurately estimating GFR in the normal-high range are still lacking
Glucose	An important marker because hyperglycemia is the initiator of DKD	Targets still to be optimally defined; evidence documenting that intensive glycemic control prevents ESRD is sparse
Blood pressure	An important promoter of DKD; also important in CV risk reduction	Targets are still to be optimally defined
Lipids	Important in CV risk reduction; lipid-modifying agents may have renal-protective effects independent of changes in lipid profile	The relationship between components of the lipid profile and risk for DKD progression is not optimally defined
Soluble TNF receptors	Circulating levels of TNF receptors have been shown to predict ESRD and possibly have a more powerful predictive ability than proteinuria	The relationship between TNF receptors and ESRD remains to be confirmed in various patient populations attending different centers
Uric acid	Easy to measure; levels also may relate to CV risk	Kidney disease outcome intervention studies to target uric acid levels are still required
Tubular markers	Easy to measure in urine sample	The prognostic significance of their measurement over and above established risk factors remains to be fully defined
Urinary proteome	The appearance of the CKD273 biomarker classifier is an earlier marker for the risk of the development of proteinuria, even prior to the onset of microalbuminuria	Clinical assays are lacking
Serum cystatin C	Predicts ESRD better than creatinine-based eGFR methods and possibly directly measured GFR	Expensive and the standardization of assays is not yet universal

## *1.1 La Nefropatia Diabetica*

La nefropatia diabetica è una delle cause principali di insufficienza renale cronica. La prevalenza del diabete di tipo 2 e della malattia renale ad esso correlata è andata aumentando rapidamente nei paesi in via di sviluppo a causa del progressivo invecchiamento della popolazione, di obesità e del diffondersi di stili di vita sbagliati. Il miglioramento della terapia antipertensiva ha permesso a più pazienti con diabete di tipo 2 di vivere tanto a lungo da sviluppare insufficienza renale cronica.

I Pazienti con nefropatia diabetica hanno una ridotta aspettativa di vita e maggior probabilità di sviluppare malattia cardiovascolare. Di conseguenza, l'identificazione e la gestione dei fattori di rischio per la nefropatia diabetica e la diagnosi tempestiva sono di fondamentale importanza per un trattamento efficace.

Una serie di fattori di rischio promuovono lo sviluppo e la progressione della nefropatia diabetica, come: elevati livelli di glucosio, la durata del diabete, ipertensione, obesità, dislipidemia, stress ossidativo, familiarità per nefropatia diabetica e la presenza di polimorfismo genico associato all'asse renina-angiotensina-aldosterone. Molti di questi fattori sono modificabili grazie a farmaci antidiabetici e antipertensivi e con lo stile di vita, altri invece come i fattori genetici e l'età avanzata non sono modificabili. Perciò il controllo stretto dei fattori di rischio modificabili diventa fondamentale

anche per prevenire e ritardare il declino della funzionalità renale. La diagnosi precoce è fondamentale per prevenire le complicanze del diabete, quindi è importante sviluppare nuovi marcatori specifici per la diagnosi precoce dei danni provocati dal diabete tra i quali anche la nefropatia ad esso associata [2].

L'esordio del diabete di tipo 2 non è facilmente identificabile, perciò un paziente a cui sia stato appena diagnosticata la patologia potrebbe avere una malattia renale insorta molti anni prima e presentarsi con una nefropatia diabetica avanzata. Nel 40% circa dei pazienti affetti da diabete in cui insorge la nefropatia diabetica, la manifestazione più precoce consiste in un aumento dell'albuminuria rilevato da test radioimmunologici sensibili. Quando i valori di albuminuria si aggirano in un intervallo compreso tra 30 e 300 mg/24ore si parla di microalbuminuria. Questa compare da 5 a 10 anni dopo l'esordio del diabete.

### *1.2 Microalbuminuria*

La microalbuminuria riflette un'anomalia della permeabilità capillare glomerulare ed è anche dipendente dalla capacità tubulare di riassorbire l'albumina filtrata.

E' definita clinicamente con valori tra 20 e 199 mg albumina/g creatinina nei maschi e 30 a 299 mg albumina/g creatinina nelle donne in almeno 2 su 3

campioni di urina spot positivi in diversi giorni. Valori al di sopra del limite superiore sono considerati macroalbuminuria o proteinuria.

Sulla base di sperimentazioni animali e umane, le forze emodinamiche alla base dell'albuminuria e della malattia renale progressiva sono l'aumento della pressione arteriosa sistemica e quella capillare glomerulare. Ciò che accompagna le alterazioni emodinamiche del "pre-diabete" è un aumento della permeabilità glomerulare. Cambiamenti strutturali glomerulari tipici della nefropatia diabetica possono essere osservati dal momento in cui la microalbuminuria diventa evidente. Lesioni simili sono state dimostrate nei capillari congiuntivali di soggetti con ipertensione borderline e alta gittata cardiaca. Si ritiene che un aumento dello stress ossidativo e delle citochine infiammatorie danneggino direttamente l'endotelio, accelerando il tasso di perdita glomerulare di albumina. L'endotelio non funzionante potrebbe far diminuire ulteriormente i cambiamenti dell'emodinamica glomerulare, aumentando ulteriormente la pressione intra-glomerulare. La concomitante lesione dei podociti e il danno endoteliale promuovono la dispersione di albumina nelle urine. Inoltre il mantenimento dell'iperglicemia continua ad aumentare lo stress ossidativo attraverso la produzione di superossido e di altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dai podociti in risposta ad alti livelli di glucosio. L'evidenza suggerisce anche un ruolo dell'angiotensina II nella generazione dei ROS come nei processi infiammatori che portano all'albuminuria [3,4].

La microalbuminuria è un segno della malattia microvascolare renale e sistemica così come della progressione della nefropatia diabetica. Fattori simili a quelli che promuovono l'albuminuria facilitano l'aumento della permeabilità vascolare, un cambiamento che riguarda anche altri organi come grandi arterie, cuore e cervello. L'endotelio è danneggiato nelle prime fasi della patogenesi della malattia vascolare aterosclerotica nei pazienti con diabete. Quindi, l'infiammazione e lo stress ossidativo giocano un ruolo centrale nella patogenesi sia micro- che macro-vascolare della malattia, con le prove che designano l'endotelio vascolare come sito di danno iniziale.

La microalbuminuria è perciò un importante strumento per la diagnosi precoce della nefropatia diabetica e un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari.

Viene più spesso utilizzata nella valutazione dei pazienti diabetici sulla base di 2 linee di pensiero: 1) è un importante marker di nefropatia diabetica e 2) si tratta di un fattore di rischio validato per le malattie cardiovascolari, includendo i danni micro- e macro-vascolari.

La microalbuminuria viene riscontrata frequentemente nei pazienti con diabete, con o senza ipertensione. Una persona su cinque a cui viene posta una nuova diagnosi di diabete di tipo 2 presenta microalbuminuria, che alla fine può progredire a livelli di macroalbuminuria o proteinuria che definisce la presenza di nefropatia diabetica. Una quota di pazienti microalbuminurici

non progredisce o migliora nel tempo, specie se i pazienti sono trattati con inibitori del RAS. La microalbuminuria può essere anche un marcatore predittivo dello sviluppo della nefropatia stessa: maggiore è l'escrezione urinaria di albumina, più è alto il rischio di sviluppare lo stadio terminale della malattia renale. D'altra parte, diversi studi hanno evidenziato il ruolo della microalbuminuria come marker indipendente di morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti con diabete di tipo 2 ed ipertensione. A causa dell'associazione tra albuminuria e malattie renali e cardiovascolari, le linee guida internazionali dell'ipertensione consigliano lo screening regolare dell'albuminuria nei pazienti diabetici, al momento della diagnosi e poi annualmente, dal momento che l'esordio del diabete di tipo 2 spesso non è noto.

Molti pazienti soccombono a causa di eventi cardiovascolari prima che la malattia progredisca alla proteinuria o all'insufficienza renale. La proteinuria nella nefropatia diabetica può essere variabile, con valori da 500 mg a 25 g/24ore, e spesso è associata a sindrome nefrosica.

Quando la proteinuria supera i 500 mg/24 ore, la funzione renale declina inesorabilmente e il 50% dei pazienti arriva all'insufficienza renale nell'arco di 5-10 anni; così, a partire dai primi stadi della microalbuminuria, generalmente occorrono da 10 a 20 anni per raggiungere la malattia renale allo stadio terminale.

### *1.3 Alterazioni morfologiche del rene*

I principali cambiamenti morfologici che avvengono durante la nefropatia diabetica sono ipertrofia glomerulare, ispessimento della membrana basale glomerulare, espansione mesangiale, glomerulosclerosi, fibrosi tubulo-interstiziale. Alto glucosio, albumina glicata, altri prodotti di glicazione modificano irreversibilmente le cellule glomerulari. Una delle prime alterazioni è l'ispessimento della membrana basale glomerulare (MBG), evidenziabile solo in microscopia elettronica (ME). I podociti sono cellule altamente specializzate del glomerulo che con i loro prolungamenti costituiscono un efficace sistema di filtrazione. Questo cambiamento provoca un aumento della filtrazione delle proteine nelle urine. Il passaggio delle proteine nella matrice causa l'espansione mesangiale e correla all'instaurarsi di sclerosi mesangiale. Nella malattia più avanzata si sviluppano anche noduli eosinofili, PAS-positivi o noduli di Kimmelstiel-Wilson [5].

### *1.4 Aspetti molecolari della nefropatia diabetica*

Le cellule del rene (cellule tubulari, cellule mesangiali, cellule endoteliali e podociti) sono uno dei bersagli del danno da iperglicemia e a loro volta sono responsabili di infiammazione e fibrosi, attraverso la produzione di fattori e di citochine. Il mediatore pro-fibrotico più studiato nella nefropatia diabetica è Trasforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 [6]. In diversi studi clinici è stato dimostrato che il TGF- $\beta$ 1 è up-regolato nel comparto tubulo-interstiziale e

glomerulare sia a livello genico che proteico in biopsie renali di pazienti con nefropatia diabetica [7,8,9]. Si ipotizza che l'aumento dell'espressione del TGF- $\beta$ 1 sia implicato nella patogenesi della nefropatia diabetica poiché induce PAI-1 che a sua volta stimola la produzione di fibronectina a livello delle cellule mesangiali. Nelle cellule tubulari renali il TGF- $\beta$ 1 promuove la deposizione di collagene I e IV, stimola l'espressione di VEGF e IL-18. L'azione pro-fibrotica del TGF-  $\beta$ 1 è mediata dall'attivazione di Smad2 e Smad3. Nel rene di topi con nefropatia diabetica, indotta da infusione di streptozotocina, si è osservata l'attivazione sia di Smad2 che di Smad3 [10,11,12]. Se il segnale intracellulare TGF- $\beta$ 1/Smad è inibito con anticorpi anti TGF- $\beta$ 1, si nota una diminuzione significativa di fibrosi renale e della proteinuria [13].

Il TGF- $\beta$ 1 può indurre fibrosi anche attraverso l'attivazione di altre vie di segnale che coinvolgono la fosforilazione delle MAP chinasi nella quale viene coinvolto p38 MAPK [14,15,16]. Questo suggerisce che il TGF- $\beta$ 1 agisce attraverso diverse vie di segnale che insieme intervengono nel processo di fibrosi durante nefropatia diabetica.

Inoltre è stato osservato che il TGF- $\beta$ 1 nella fibrosi renale [17] attiva il differenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti [18], i quali producono proteine della matrice extracellulare [19,20]. La presenza dei miofibroblasti nella malattia renale cronica correla con la perdita progressiva della funzionalità renale [21]. D'altra parte, anche le cellule epiteliali tubulari

assumono un fenotipo simil “mesenchimale” esprimendo  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin ( $\alpha$ -SMA) e favorendo a loro volta la progressione della fibrosi [22].

Nelle cellule mesangiali, l’iperglicemia, aumenta l’espressione di GLUT-1 [23], che favorisce l’ingresso del glucosio nelle cellule. L’aumento del glucosio intracellulare altera il metabolismo ossidativo della cellula attraverso NADPH ossidasi. Tutti questi processi accelerano la progressione della nefropatia diabetica.

Inoltre l’iperglicemia aumenta lo stress ossidativo attraverso la produzione di superossido e di altre specie reattive dell’ossigeno (ROS). Diversi studi recenti supportano le ipotesi che le specie reattive all’ossigeno (ROS) prodotte a livello renale, possono giocare un ruolo fondamentale nel danno mediato dal diabete. Questo meccanismo è ben studiato in quanto è stato visto che sia in vivo che vitro l’aumento extracellulare di glucosio induce produzione di composti ossidanti intracellulari causando apoptosi e deplezione di podociti attraverso l’attivazione di p38MAPK e, a sua volta, l’inibizione di NADH ossidasi protegge i podociti da apoptosi. La perdita di podociti rappresenta uno dei meccanismi precoci che conduce alla nefropatia diabetica in modelli animali di topo di diabete di tipo 1 e 2 [24,25,26,27]. Gli enzimi della famiglia della NADH ossidasi sono dedicati alla produzione dei composti ossidanti, in particolare i geni codificanti gli enzimi Nox riscuotono un maggior interesse poiché sembrano essere coinvolti in diverse patologie renali [28,29,30,31].

Recentemente è stato visto che le isoforme di NOX4 contribuiscono al danno renale. L'inattivazione del gene di NOX4 in podociti di un modello sperimentale murino di nefropatia diabetica contribuisce al miglioramento della patologia con la diminuzione di albuminuria, di glomerulosclerosi e diminuzione nell'accumulo delle proteine di matrice [29,30,31,32].

Di recente si è osservato che in modelli sperimentali animali, miostatina, una miochina che regola la crescita muscolare, è coinvolta nella regolazione del metabolismo energetico. Infatti topi Knockout per miostatina hanno una riduzione della massa grassa e sono meno predisposti a sviluppare insulina resistenza [33, 34]. Questa scoperta suggerisce che miostatina influenza il trasporto cellulare di glucosio mediato dall'insulina [35]. Inoltre, in un altro studio recente, è stata individuata una correlazione tra obesità, infiammazione sistemica, disfunzione metabolica e livelli di miostatina nel muscolo dei pazienti con diabete di tipo 2, supportando sempre di più le evidenze che miostatina potrebbe partecipare in qualche modo ai meccanismi di disfunzione metabolica [36].

### *1.5 Miostatina*

Miostatina è una proteina della superfamiglia del TGF- $\beta$  espressa principalmente nel muscolo scheletrico. Recentemente è stata osservata la sua espressione anche in altri tessuti come muscolo cardiaco, tessuto adiposo, fegato, milza, polmoni, reni, nei fibroblasti e nelle cellule vascolari muscolari

lisce della parete intermedia dei vasi e nei monociti sia circolanti che macrofagi infiltranti [37]. Miostatina è un peptide di 375 aminoacidi. La sua forma attiva viene clivata e secreta nel siero. Sui tessuti circostanti ha effetti paracrini tramite il riconoscimento con il suo recettore Activina IIB (ActRIIA) [38].

Miostatina controlla l'omeostasi e lo sviluppo muscolare [39], la sintesi proteica e la sensibilità all'insulina nel muscolo. Miostatina è coinvolta nella perdita di massa muscolare presente nella cachessia in paziente con malattia renale cronica (MRC) [40], con cancro, insufficienza respiratoria e HIV. Miostatina è stata osservata fortemente espressa nella tonaca media delle aorte di pazienti con lesioni aterosclerotiche e la sua espressione correla con la gravità della lesione e con la perdita della proteina strutturale delle cellule vascolari muscolari lisce, smotolina [37]. Questi dati suggeriscono che miostatina è coinvolta in specifici processi all'interno degli organi come per esempio i processi di fibrosi e processi metabolici [41]. Infatti è stato dimostrato che a livello cardiaco miostatina induce fibrosi interstiziale attraverso l'attivazione di p38MAPK e l'up-regolazione di miostatina in cardiomiociti potrebbe essere il legame presunto con i fibroblasti cardiaci [42]. Inoltre miostatina nel muscolo scheletrico sostiene la proliferazione dei fibroblasti muscolari e aumenta la loro resistenza all'apoptosi tramite l'attivazione di Samd e p38MAPK [43]

Inoltre miostatina è espressa nelle cellule infiltranti e dati in vitro dimostrano che monociti trattati con miostatina esprimono un fenotipo pro-fibrotico e pro

infiammatorio; nello stesso contesto miostatina e MCP1 stimolano l'espressione l'uno dell'altro in modo reciproco instaurando un loop. È stato anche riportato che citochine infiammatorie e stress ossidativo stimolano l'espressione di miostatina: infatti, in cellule muscolari scheletriche murine, il TNF- $\alpha$  in vitro induce l'espressione di miostatina attraverso l'attivazione di NF-kB [44]. Inoltre è stato visto che la produzione di radicali liberi, nel muscolo scheletrico, è modulata da miostatina attraverso l'attivazione di NF-kB. A loro volta gli stessi composti ossidanti sono induttori di miostatina, ad esempio TNF- $\alpha$  e NF-kB instaurano un meccanismo "feedforward". L'inibizione di entrambi, TNF- $\alpha$  o NF-kB, diminuisce i livelli di miostatina indotti dalle specie reattive all'ossigeno in mioblasti e miotubi [45].

Recenti ricerche hanno dimostrato che miostatina potrebbe avere un ruolo nelle complicanze del diabete: infatti è stata vista up-regolata nel tessuto muscolare di pazienti con diabete di tipo 2 [46]. Miostatina è stata trovata anche più espressa nel tessuto muscolare di genitori, non obesi e iperinsulinemici, di pazienti con diabete di tipo 2 [47] e anche nel tessuto muscolare scheletrico e nel plasma di soggetti obesi con insulina resistenza [48].

Ad oggi, miostatina è studiata dai nefrologi come mediatore della sarcopenia nel paziente con insufficienza renale cronica, ma un suo possibile ruolo diretto sul rene non è ancora stato studiato in modo esaustivo. È stato riportato che nell'ultimo stadio dell'insufficienza renale cronica i livelli sierici di miostatina

sono elevati [49] e il suo recettore, ActRIIA, è stato ritrovato espresso a livello del rene, però tale evidenza è stata provata solo sul rene di suino [50].

## **2. Scopo**

Lo scopo degli esperimenti della presente tesi è stato valutare se miostatina sia espressa nel rene umano e il suo ruolo come mediatore di danno nelle malattie renali ed in particolare nella nefropatia diabetica. A tal fine è stata studiata per prima cosa l'espressione del gene e della proteina di miostatina nel rene normale e nelle biopsie renali di pazienti con nefropatia diabetica. In vitro sono stati valutati gli effetti di miostatina su cellule tubulari prossimali umane e l'azione dell'ambiente simil-diabetico sull'espressione di miostatina.

### **3. Materiali e Metodi**

#### *3.1 Arruolamento pazienti.*

Sono stati valutati 29 pazienti con diabete di tipo 2 dei quali sono stati raccolti i dati clinici, i dati di laboratorio e le biopsie renali. Le caratteristiche cliniche dei pazienti diabetici sono riassunte in tabella 2. Nei pazienti con una patologia più avanzata la durata del diabete era maggiore. Tra i due gruppi non erano presenti differenze significative per età, peso, albumina glicata e livelli di glucosio. La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) era più alta in tutti i pazienti con microalbuminuria. ACE inibitori e/o inibitori del recettore dell'angiotensina erano sospesi tre settimane prima della biopsia renale. Tutti i soggetti sono stati informati riguardo la natura, lo scopo, le procedure e i possibili rischi della biopsia renale al momento del consenso informato. Le procedure erano conformi alle dichiarazioni di Helsinki. Lo studio è stato approvato da comitato etico del Dipartimento di Medicina Interna.

Le lesioni che compaiono durante nefropatia diabetica si possono dividere in lesioni glomerulari e lesioni tubulo-interstiziali [53]. La società Internazionale di Nefrologia (ISN) definisce quattro classi di lesioni glomerulari e sono riassunte in tabella 3, mentre le lesioni tubulo-interstiziali sono descritte in tabella 4. La classe I descrive la membrana basale glomerulare e l'ispessimento. La Classe II, suddivisa a sua volta in due sottoclassi IIa (lieve) e IIb (severa), descrive l'espansione mesangiale. La classe III descrive la sclerosi

nodulare (Kimmelstiel-Wilson lesions). La classe IV comprende le lesioni più tardive e il grado di glomerulosclerosi. Le lesioni tubulo-interstiziali invece insorgono durante lo sviluppo delle lesioni glomerulari raggruppate in classe II e diventano più evidenti con la progressione della malattia. Le modificazioni che si descrivono sono:

-fibrosi interstiziale e atrofia tubulare (IFTA) che segue di pari passo le lesioni glomerulari

-infiammazione interstiziale caratterizzata dalla presenza di cellule infiltranti

-lesioni vascolari come ialinosi arteriolare e più tardivamente arteriosclerosi.

Queste caratteristiche sono riassunte in tabella 4.

Tra le biopsie dei pazienti, 11 sono state classificate di classe I e uno di classe IIa. In questi campioni la fibrosi interstiziale era assente (IFTA 0). Per le biopsie dei pazienti con nefropatia diabetica avanzata, 8 sono stati classificati come di Classe III (glomerulosclerosi nel 50% dei glomeruli e presenza di lesioni Kimmelstiel-Wilson), e 11 sono stati classificati nella Classe IIb (era presente una severa espansione mesangiale nel 25% del mesangio osservato). In questi campioni IFTA era compresa tra 1 e 3. Il gruppo di controllo è formato da tessuto renale di persone sane non diabetici non proteinurici e non ipertesi.

L'indice di massa corporea (BMI) è calcolato con la formula: peso (Kg)/altezza<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>).

Le pressioni arteriose di base erano la media delle pressioni arteriose misurate durante le due visite precedenti alla biopsia renale. L'albuminuria e proteinuria era misurata sulle urine delle 24 ore. La concentrazione dell'albumina urinaria era misurata usando un kit commerciale disponibile RIA (Pantec, Torino, Italia). La proteinuria era dosata attraverso metodo immunoturbidimetrico. La GFR era stimata secondo l'equazione CKD-EPI [42]. I livelli di glucosio e di HbA1c erano determinati dai laboratori di biochimica clinica.

**Tabella 2.** *Caratteristiche cliniche dei pazienti*

	diabetici con nefropatia	controlli
N. pazienti	29	10
età (anni)	58±4	59±4
sexo (M/F)	19M/10F	6M/4F
durata della malattia (mesi)	216±40	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31±4	26±3
pressione sanguigna sistolica (mm Hg)	148±6	133±3
pressione diastolica (mm Hg)	86±4	85±2
creatinina sierica (mg/dl)	2.90±0.8	1.1±0.9
GFR stimata(ml/min per 1.73m <sup>2</sup> )	33±7	99±4
Proteinuria (g/die)	3.8±1	-
glucosio nel sangue (mg/dl)	149±13	88±14
HbA1c (%)	8.0±0.7	NA

**Tabella 3.** *Classificazioni ISN.*

Classe	Descrizione
I	Lievi e non specifiche modificazioni inizio ispessimento GBM
II a	Lieve espansione mesangiale
II b	Severa espansione mesangiale
III	Sclerosi nodulare (lesione di Kimmelstiel-Wilson)
IV	Avanzata glomerulosclerosi diabetica

**Tabella 4.** *Lesioni tubulo-interstiziali*

Lesione	Criteri	Score
<b>IFTA</b>	NO IFTA	0
	<25%	1
	25%-50%	2
	>50%	3
<b>Inflammatione interstiziale</b>	assente	0
	infiltrati in relazione solo a IFTA	1
	infiltrati in aree senza IFTA	2
<b>Lesioni vascolari</b>		
<b>Ialinosi arteriolare</b>	assenti	0
	almeno un'area di ialinosi arteriolare	1
	più di un area con ialinosi arteriolare	2
<b>Arteriosclerosi</b>	nessun ispessimento dell'intima	0
	ispessimento dell'intima minore rispetto allo spessore della media	1
	ispessimento dell'intima superiore rispetto all'ispessimento della media	2

### *3.2 Preparazione istologica e immunoistochimica.*

Le sezioni di paraffina (5µm) di tessuto fissato in paraformaldeide al 2% sono state analizzate per miostatina (anticorpo policlonale, Proteintech, LaboSpace s.r.l., Milano, Italia). Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo anti miostatina diluito 1:200 in PBS+ 1% BSA e 0,1% di NaN<sub>3</sub> a temperatura ambiente, per tutta la notte. Il sistema di rilevazione consiste in una prima incubazione con un anticorpo secondario biotinilato IgG diluito 1:300 in PBS 1X (VectorLaboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) seguita dall'incubazione con streptavidina diluita 1:500 in PBS 1X coniugata con perossidasi (Dako, Glostrup, Denmark). Il legame antigene/anticorpo è stato rilevato dall'incubazione con diamminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) per 15 minuti. Le sezioni sono state, quindi, controcolorate con ematossilina, ed esaminate al microscopio ottico. Per la procedura di immunoistochimica doppia il protocollo era lo stesso, ma veniva usata la fosfatasi alcalina per lo sviluppo, in modo tale da distinguere i due segnali. La reazione chimica indotta dalla DAB produce un colore marrone mentre la fosfatasi alcalina produce un colore rosso. Prima di controcolorare con ematossilina, si procedeva sulla stessa fettina con incubazione di anticorpo primario CD45 (anticorpo monoclonale, Leica Biosystem, Wetzlar, Germania) diluito 1.100 in PBS+ 1%

BSA e 0,1% di  $\text{NaN}_3$  per 1 ora a temperatura ambiente. Le fettine sono state incubate con anticorpo secondario biotinilato mentre la streptavidina utilizzata era coniugata a fosfatasi alcalina (VectorLaboratories). Per la rilevazione del segnale le fettine sono state incubate con il substrato di fosfatasi alcalina addizionato con levamisole diluito 1:125 per 15 minuti (VectorLaboratories). Infine le fettine sono state controcolorate in ematossilina. Le cellule prossimali tubulari sono state indentificate tramite criteri morfologici (presenza o meno di brushborder) [51,52].

### *3.3 Analisi di immagine.*

Le immagini sono state analizzate con Leica Q500 MC Image Analysis System (Leica, Cambridge, UK). Per ogni campione tutti i tubuli sono stati esaminati e la densità ottica del segnale è stata quantificata tramite PC. Le singole immagini sono state digitalizzate per l'analisi a 256 livelli di grigio. I dati importati sono stati analizzati quantitativamente da Q500MC Software-Qwin (Leica, Cambridge, UK). I tubuli sono stati selezionati dall'operatore e le aree positive sono state automaticamente misurate. I valori sono stati riportati come fold increase verso i controlli.

### *3.4 Laser-capture microdissection e estrazione di RNA.*

I glomeruli e i tubuli sono stati microdissestati dalle biopsie renali. Le sezioni delle biopsie renali congelate spesse circa 7  $\mu\text{M}$  sono state fissate su PEN membrane glassslides (MDS Analytical Technologies, Herborn, Germany). Le

sezioni di tessuto sono state disidratate in 100/95/75 % di etanolo e xilene e lasciate ad asciugare a temperatura ambiente. Per ogni campione dalle 6 alle 10 sezioni sono state tagliate al laser captur e microdisettore (LCM) (ArcturusBioscience, Mountain View, California, USA). Sono stati raccolti una media di 20 glomeruli per campione. I campioni sono stati isolati poi messi in buffer per 30 minuti a 42°C e l'RNA è stato estratto con Arcturus Pico Pure Isolation Kit (AppliedBiosystem, Life Technologies, Monza, Italia). L'RNA è stato eluito in 15 µL di buffer, secondo il protocollo e quantificato al NanoDrop Spectrophotometer (ND-100 Celbio, Milano, Italia).

### *3.5 Colture cellulari*

HK-2, una linea immortalizzata di cellule epiteliali prossimali distali tubulari derivate da rene di uomo adulto sano, sono state ottenute da ATCC. Le cellule crescevano in adesione in DMEM/F12 (Euroclone, Milano, Italia) addizionato con 5% [v/v] FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mmol L-glutammina, 5 µg/ml insulina, 5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml sodium selenite, 5 pg/ml T3, 5 ng/ml idrocortisone, 5 pg/ml PGE1 and 10 ng/ml epidermal growth factor. Le cellule sono state mantenute in coltura in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per gli esperimenti le cellule sono state esposte ad alto (30mmol/L) e basso glucosio (5.5mmol/L), albumina umana e albumina glicata (Sigma Aldrich SRL, Milan, Italia), o miostatina (500 ng/ml) (Peprotech, LiStarFish, Cernusco S/N, Italia).

### *3.6 Proliferazione e Ciclo cellulare*

La proliferazione è stata valutata attraverso il legame di dicarboxilfluoresceinsuccidinidina (CFDA-SE Invitrogen, Milano, Italia) con il DNA della cellula. Le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (Attune Acoustic Focusing Cytometer, ThermofisherScientific) per rilevare la percentuale di fluorescenza. I dati sono stati analizzati con Proliferation Wizard module of the ModFit LT 4.0 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA) e il risultato è stato espresso come indice di proliferazione. Per l'analisi del ciclo cellulare le cellule sono state permeabilizzate e il contenuto di DNA nucleare è stato marcato con una soluzione ipotonica (PI 50  $\mu$ g / ml in Sodium Citrate / Triton X-100) a temperatura ambiente. L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita utilizzando lo stesso software utilizzato per la proliferazione, ModFit LT 4.0 (Verity Software House).

### *3.7 Stress ossidativo*

CellROX® Deep Red Reagent (Thermofisherscientific) è stato usato per analizzare lo stress ossidativo nelle HK-2. Questa sonda lega i composti ossidanti prodotti dalle cellule. Dopo aver incubato con la sonda secondo il protocollo, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (Attune Acoustic Focusing Cytometer, ThermofisherScientific) per misurare l'intensità di fluorescenza.

### *3.8 Immunocitochimica*

HK-2 cresciute in vetrini-chamberslides- sono state incubate con diversi stimoli come descritti sopra. Dopo 30 secondi di fissaggio in metanolo freddo le cellule sono state incubate con anticorpo primario anti-miostatina, NOX-4 e fibronectina (come descritto sopra). Le cellule sono state poi controcolorate con ematossilina e esaminate al microscopio. Le immagini sono state analizzate con Leica Q500 MC Image Analysis System (Leica)

### *3.9 Western blot*

Le cellule, dopo opportuno trattamento, sono state lisate in ghiaccio per 1 ora con un tampone contenente 20 mmol/L Hepes, 150 mmol/L NaCl, 10% (v/v) glicerolo, 0.5% (v/v) NP-40, 1 mmol/L EDTA e inibitori enzimatici ( 2.5 mmol/L DTT, 10 µg/ml aprotinina, leupeptina, pepstatina A, 1 mmol/L PMSF e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). La concentrazione proteica è stata valutata mediante metodo di Coomassie. 30 o 50 µg di proteine sono state separate, in condizioni riducenti, usando un gel al 10% di acrilamide. Le proteine separate sono state poi trasferite, mediante campo elettrico, ad una membrana di PVDF (Merck Group, Milano, Italia). Al termine del trasferimento, per verificarne l'efficienza, sono state visualizzate le proteine presenti sulla membrana, mediante la colorazione con rosso di Ponceau. Le membrane sono state incubate con anticorpo anti-miostatina (Proteintech, LaboSpace s.r.l., Milano, Italia), anti-p-ERK1(T202/Y204)/ERK2(T185/Y187) (R&D Systems, Space Import-Export s.r.l., Milano, Italia), anti-p-NF-kB p65 (Ser 536) (Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA, USA), anti-p-Smad2 (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Stati Uniti) e anti-p-Smad3 (Cell Signaling). Successivamente le membrane sono state incubate nuovamente con  $\beta$ -actina, ERK (Santa Cruz Biotechnology) o Smad2/3 (Cell Signaling) per la normalizzazione del segnale. I segnali sono stati determinati con il seguente passaggio:

- saturazione per 1 ora con latte al 5%;
- lavaggio con PBS e 0.05% (v/v) Tween 20 per 15 minuti;
- incubazione over night a 4°C con gli opportuni anticorpi primari;
- lavaggio con PBS e 0.05% (v/v) Tween 20 per 15 minuti;
- incubazione per 1 ora con anticorpo secondario marcato con perossidasi;
- rivelazione del legame Ag/Ab mediante chemiluminescenza con Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Merckgroup).
- L'intensità delle bande erano determinate usando Alliancesystem (Uvitec, Cambridge, UK).

### *3.10 Analisi mRNA*

HK-2 sono state incubate per 5 ore con miostatina (500 ng/ml), alto (30 mmol/L) e basso glucosio (5.5mmol/L), albumina glicata e albumina umana (500 ng/ml) e RNA è stato estratto usando Qiazol Lysis reagent (QiagenSciences, Maryland, USA). La concentrazione dell'RNA e la sua integrità sono state verificate con NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

(NanoDrop Technologies Inc.). 1 µg RNA è stato usato per la sintesi di cDNA con Iscript cDNA synthesis kit (Biorad). La Real-Time PCR è stata effettuata in un volume di 10 µL, contenente 1 µL cDNA, 5 µL SYBR solution Mastermix (Eppendorf, Milano, Italia), 0,5µL per ogni primer (Primerdesign, Southampton, United Kingdom) e 3,5µL di acqua nucleasi-free. L'espressione di β-actina è stata usata per normalizzare l'espressione dei geni interessati. È stato usato il metodo di  $\Delta\Delta CT$  per la quantificazione relativa per calcolare il fold change dell'espressione [54]. Il ciclo soglia (CT) del gene target è stato normalizzato con il ciclo soglia del gene housekeeping nello stesso campione ( $\Delta CT = CT_{target} - CT_{con}$ ) e dopo è stato normalizzato con il nostro controllo interno all'esperimento (CN-T0). Il saggio è stato eseguito in triplicato utilizzando Universal PCR Master Mix on Master Cycler realplex (Eppendorf). La sequenza dei primer è riportata nella tabella 5.

**Tabella 5.** Sequenze primers per Real Time PCR.

primers	forward	reverse
Miostatina	ccaaagctcctccactccg	gggagtacagcaagggcc
MCP-1	accgagaggctgagactaac	aatgaaggaggctgctatgag
β-Actin	catccccaaagttcacaat	agtgggggtggcttttagga
Nox-4	cacagactggctttgatttc	ggatgacttatgaccgaaatgatg
Fibronectina	gagaaccaagactgagacgat	gcttctgacatctggcttga

### *3.11 RNA Interference*

HK-2 sono state trasfettate con 30 nM di siRNA specifico per miostatina oppure con il siRNA di controllo negativo (Ambion, Carlsbad, CA) usando Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Poi le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore prima dei vari trattamenti e saggi. L'efficienza del silenziamento è stata valutata in Real-Time PCR e in immunocitochimica.

### *3.12 Analisi statistica*

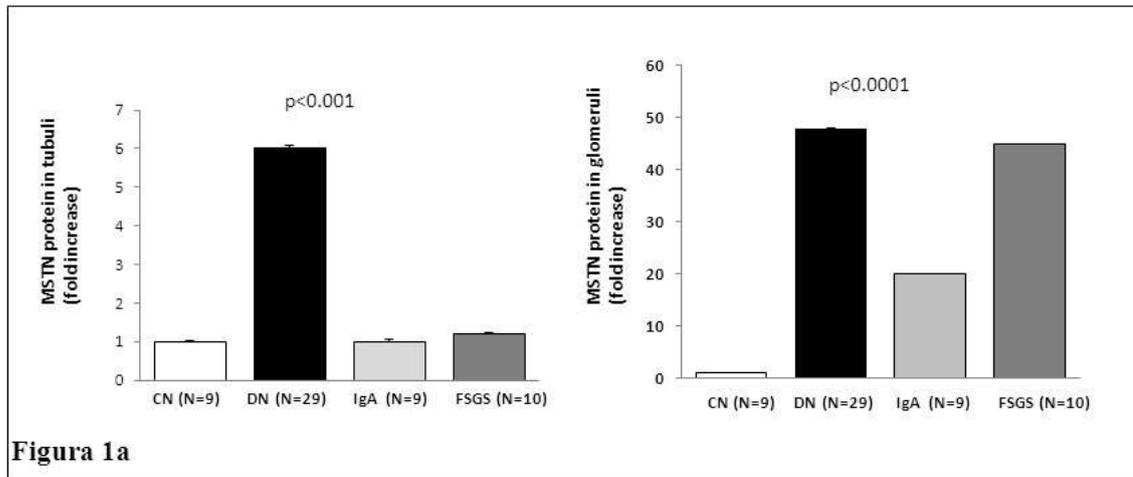
I dati ottenuti sono stati presentati come media  $\pm$  SEM. L'analisi statistica è stata svolta usando il t test non parametrico a due code oppure un test ad una coda ANOVA seguita da un test a controllo multiplo Bonferroni usando SPSS 16.01 (SPSS Inc., Chicago, IL). La relazione tra i parametri analizzati impiegava la regressione lineare o Spearman test come richiesto. Per l'analisi di regressione, l'espressione genica di miostatina, MCP-1 fibronectina e NOX4 è stata trasformata in una funzione logaritmica. L'analisi di regressione multipla è stata eseguita per valutare se l'espressione genica di miostatina fosse correlata alla gravità della fibrosi interstiziale. Un p value  $<0.05$  indica una differenza statistica significativa.

## **4. Risultati**

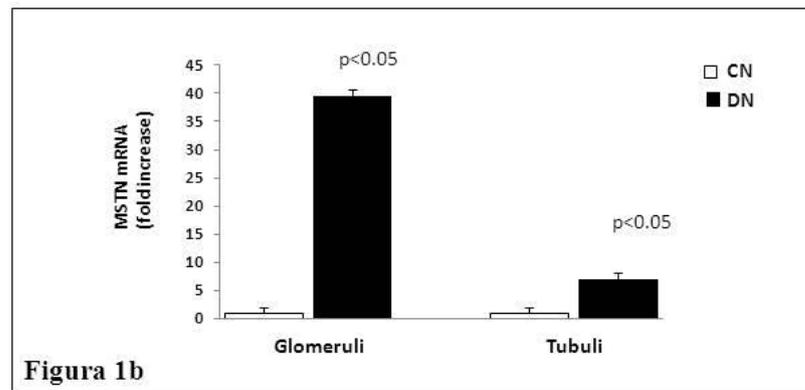
### *4.1 L'espressione di miostatina aumenta nel rene dei pazienti con nefropatia diabetica.*

La figura 1a riporta l'espressione della proteina di miostatina nei glomeruli e a livello tubulo interstiziale; i valori nei pazienti con nefropatia diabetica sono maggiori di circa 4-8 volte rispetto ai controlli ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ). Dalla figura 2 si può notare come miostatina nei glomeruli sia presente nelle cellule mesangiali e nei podociti. I pazienti con nefropatia diabetica esprimono più miostatina rispetto anche ai pazienti con glomerulonefrite da depositi di IgA e con glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS) (figura 1a) come si vede dalle immagini di immunistochemica riportate in figura 2. Nella figura 1b, è riportata l'espressione genica di miostatina. Nei pazienti con nefropatia diabetica l'mRNA è aumentato di 8-10 volte, rispettivamente nei glomeruli e nei tubuli ( $p < 0.05$ ), rispetto ai controlli.

**Figura 1.** Livelli di proteina e di mRNA di miostatina nelle biopsie renali.

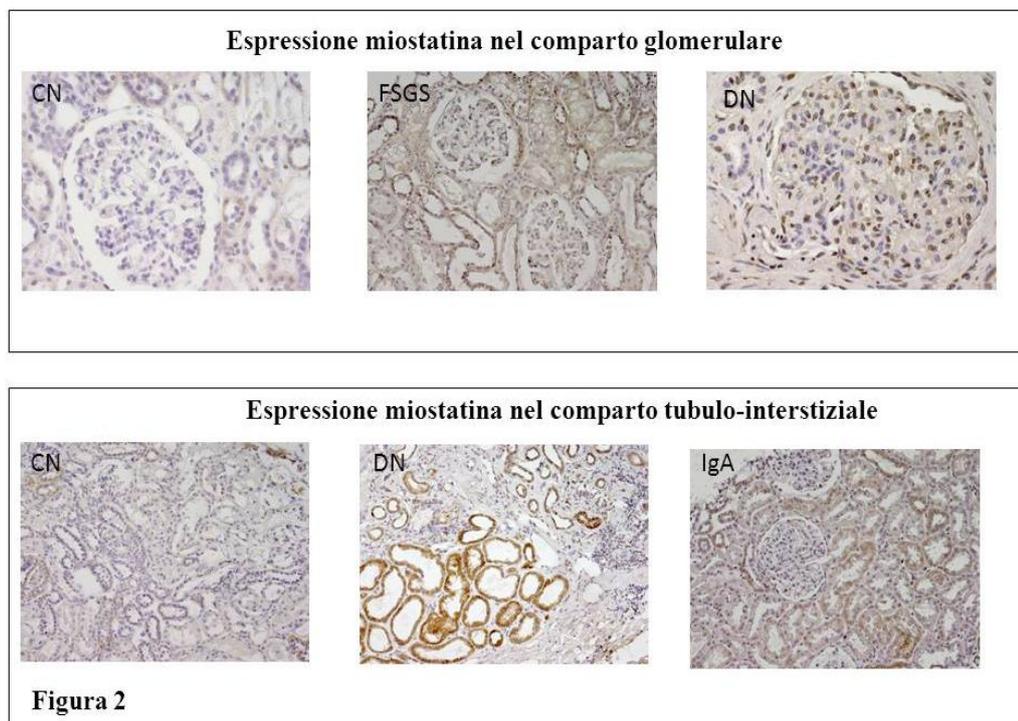


**Figura 1a**



**Figura 1b**

**Figura 2.** Immunoistochimica di miostatina su biopsie renali

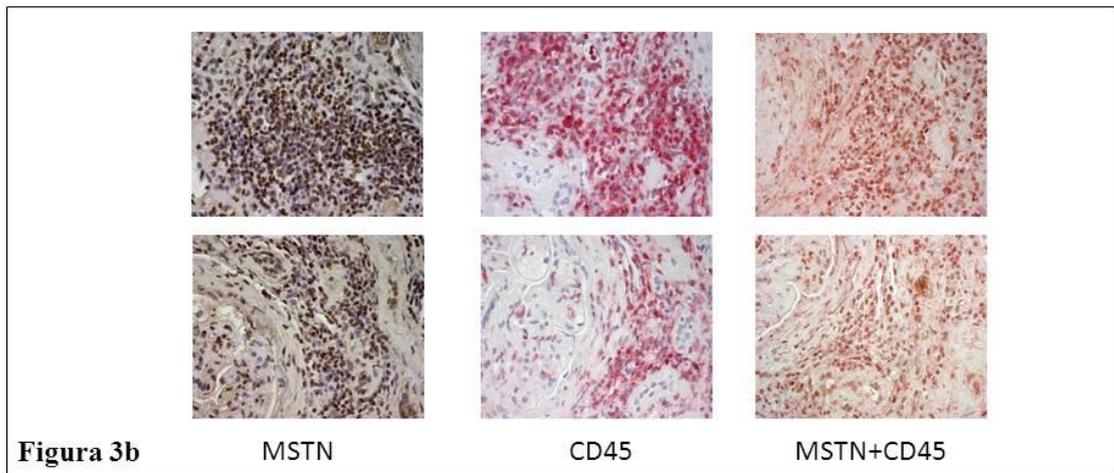
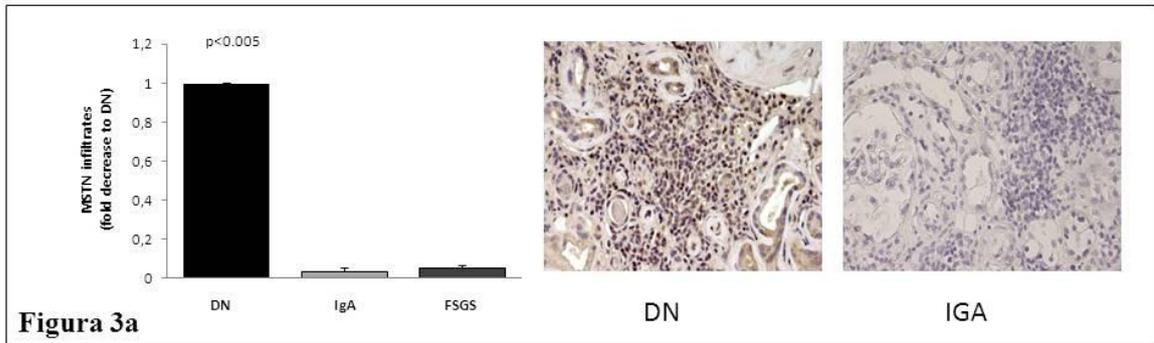


**Figura 2**

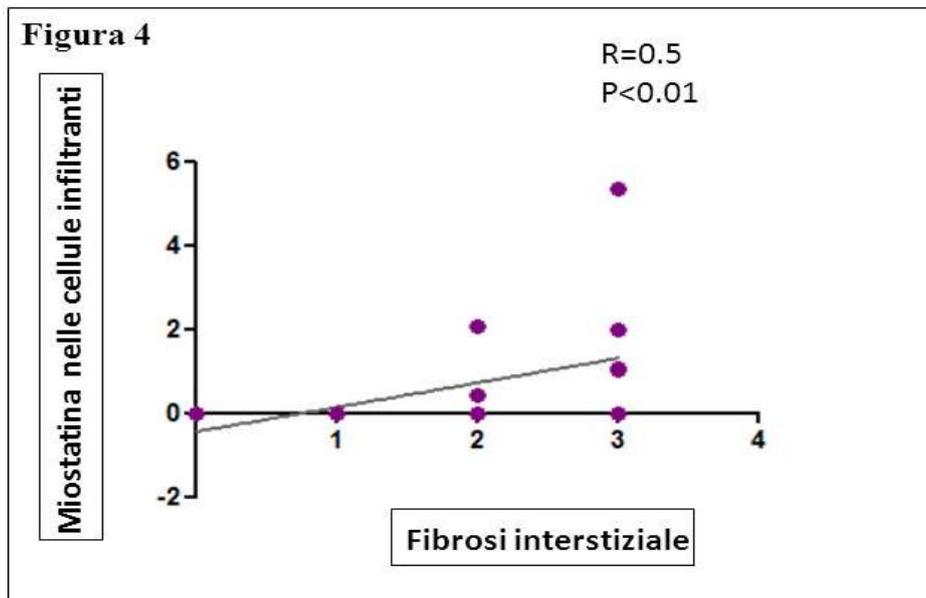
#### *4.2 Miostatina è espressa negli infiltrati delle biopsie dei pazienti con nefropatia diabetica.*

La figura 3a mostra il grafico dei valori dei livelli di proteina di miostatina nelle cellule infiltranti nelle biopsie di pazienti con nefropatia diabetica, con glomerulonefrite da depositi di IgA e con FSGS. Miostatina viene maggiormente espressa nelle cellule infiltranti delle biopsie dei pazienti con nefropatia diabetica (97% in meno nella glomerulonefrite a depositi di IgA e 95% in meno nella glomerulo sclerosi focale segmentale  $p < 0,005$ ). Inoltre miostatina è espressa in cellule CD45 positive (Figura 3b). In corso di nefropatia diabetica l'espressione di miostatina degli infiltrati correla con la fibrosi interstiziale (Figura 4).

**Figura 3.** *Espressione di miostatina negli infiltrati.*



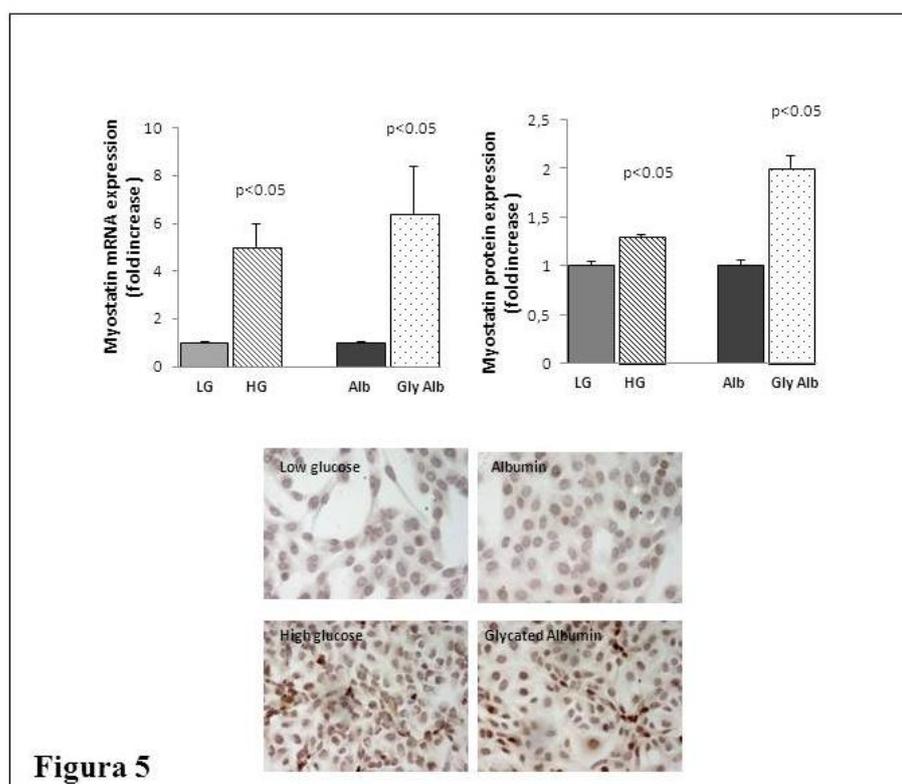
**Figura 4.** *Correlazione di miostatina e fibrosi tubulo-interstiziale.*



### 4.3 L'ambiente diabetico induce l'espressione di miostatina nelle cellule tubulari prossimali

Per dimostrare se miostatina fosse indotta dall'ambiente simil diabetico le cellule prossimali tubulari umane HK-2 sono incubate con terreno addizionato con alto glucosio (HG) e albumina glicata (Glycated Alb). Come si vede nei grafici riportati in figura 5, dopo 48 ore l'alto glucosio aumenta i livelli di mRNA e di proteina di miostatina di 5 e 1,3 volte rispettivamente ( $p < 0.05-0.01$  vs basso glucosio-LG). Il terreno addizionato con albumina glicata incrementa di 6 volte l'espressione genica e di 2 volte l'espressione proteica ( $p < 0.05-0.01$  vs albumina-Alb).

**Figura 5.** Condizioni simil-diabetiche inducono miostatina.



**Figura 5**

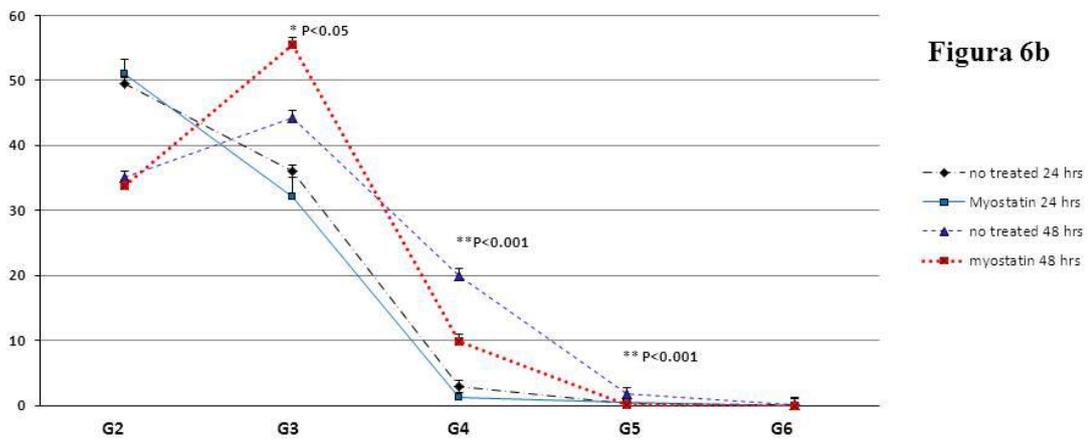
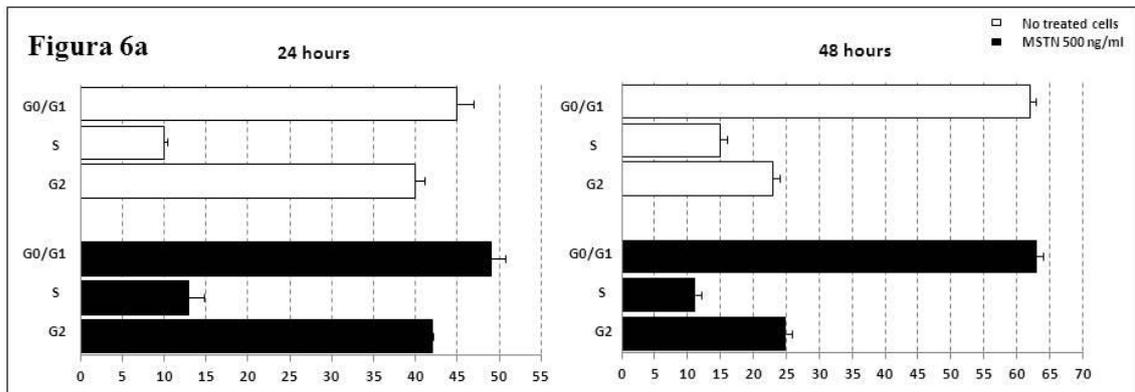
#### *4.4 Effetti di miostatina sulle cellule tubulari prossimali*

##### Ciclo cellulare e proliferazione.

Nella figura 6 è riportato il grafico sugli effetti di miostatina sul ciclo cellulare e sulla proliferazione. Dopo 24 ore di trattamento si osserva una differenza non significativa sulla percentuale di cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo (cellule non trattate 45± 2%, cellule trattate con miostatina 49±1,8%, p=NS).

La proliferazione è valutata mediante colorazione con Carboxyfluoresceina (CFSE) sonda fluorescente che si intercala nel DNA. Quando la cellula si divide la sonda fluorescente si dimezza, per cui meno fluorescente è la popolazione cellulare, più le cellule si sono divise. Dopo 48 ore di trattamento con miostatina la proliferazione cellulare rallenta in modo significativo (figura 6b). Durante la generazione G<sub>3</sub> abbiamo una percentuale di cellule positive alla fluorescenza maggiore, circa il 75,5% delle cellule trattate con miostatina contro il 54,2% delle cellule non trattate (p<0.05-0.01).

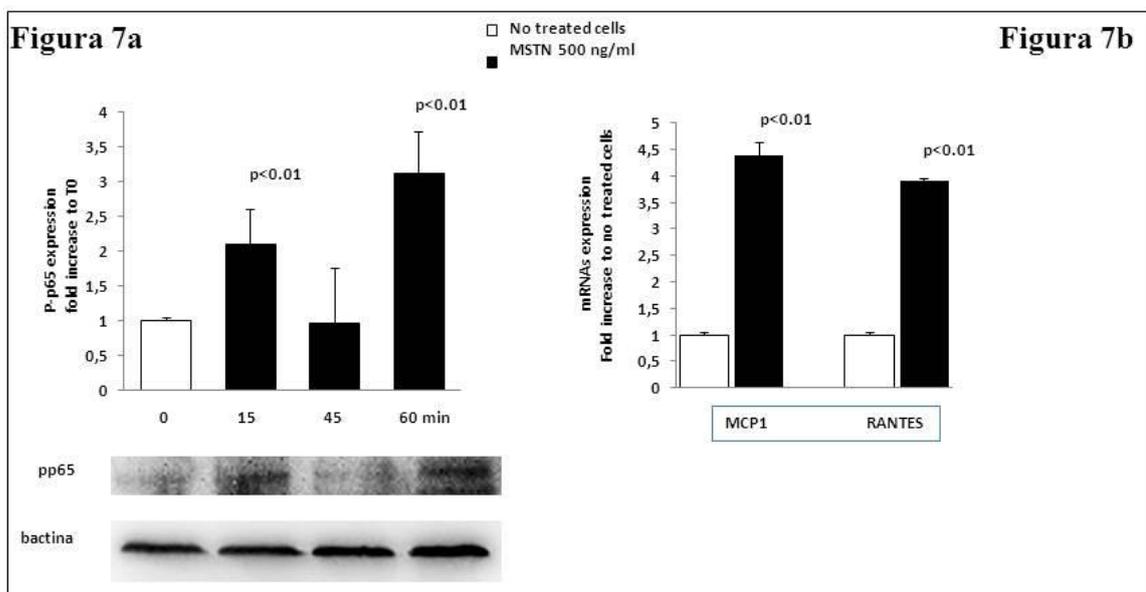
**Figura 6. Ciclo cellulare e proliferazione delle cellule trattate con miostatina**



## Infiammazione

Miostatina ha un effetto pro-infiammatorio sulle cellule tubulari renali. I dati riportati in figura 7a mostrano che dopo 15 e 60 minuti di trattamento con miostatina NF-kB p65 è attivato di circa 2-3 volte rispetto al non trattato, ( $p < 0.01$ ). NF-kB svolge un ruolo centrale nel processo di infiammazione. La subunità p65 è sequestrata nel citosol, ma dopo attivazione trasloca nel nucleo inducendo l'espressione di molecole pro-infiammatorie. Le cellule trattate per 5 ore con miostatina aumentano l'espressione di MCP1 e RANTES (rispettivamente  $4,4 \pm 0,24$ ,  $3,9 \pm 0,05$  volte vs le cellule non trattate,  $p < 0.01$ , figura 7b).

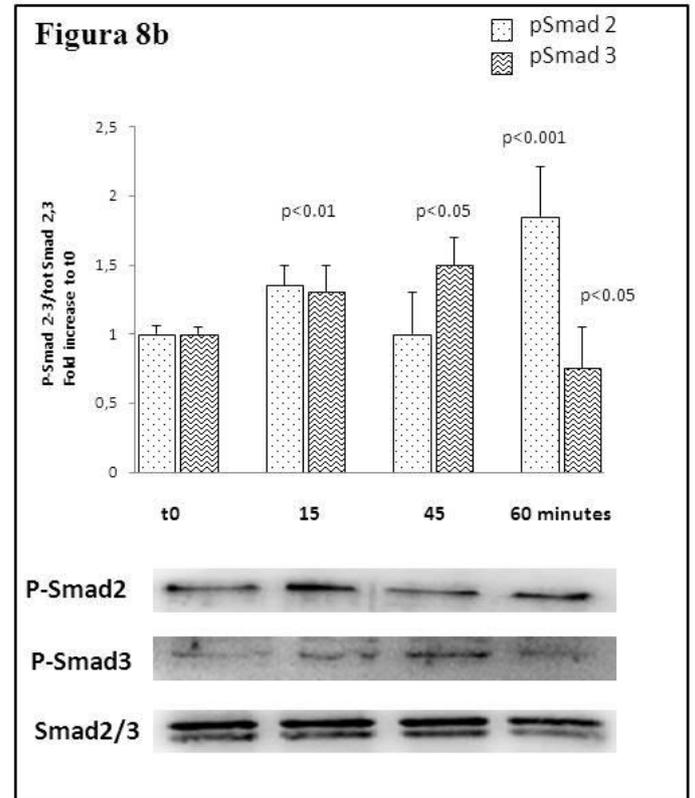
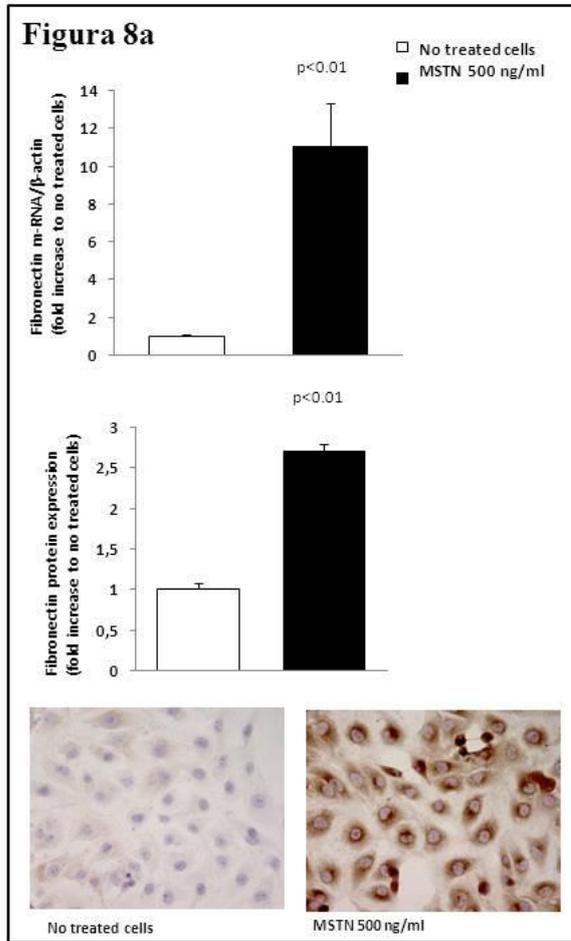
**Figura 7. Miostatina induce infiammazione.**



## Fibrosi

Precedenti studi dimostrano che miostatina e l'ambiente infiammatorio inducono una risposta pro-fibrotica. Miostatina agisce nello stesso modo di molti membri della superfamiglia TGF- $\beta$ , inducendo fibrosi specialmente nei muscolo scheletrico e cardiaco [55]. La fibronectina è un componente importante della matrice extracellulare e diversi studi hanno dimostrato il suo ruolo nella fibrosi renale indotta dal diabete. Le cellule esposte a miostatina, aumentano i livelli genici e della proteina di fibronectina (11 e 3 volte rispettivamente vs le cellule non trattate  $p < 0.01$ ) (Figura 8a). Inoltre le cellule stimulate con miostatina aumentano la fosforilazione di Smad2 e Smad3. Già dopo 15 minuti Smad2 e Smad3 erano attivati (aumentava di 1,3 volte rispetto al non trattato  $p < 0.01$ ) (figura 8b). la fosforilazione di Smad2 permaneva fino a un'ora, aumentando ulteriormente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), mentre Smad3 dopo 60 minuti ritornava ai livelli basali.

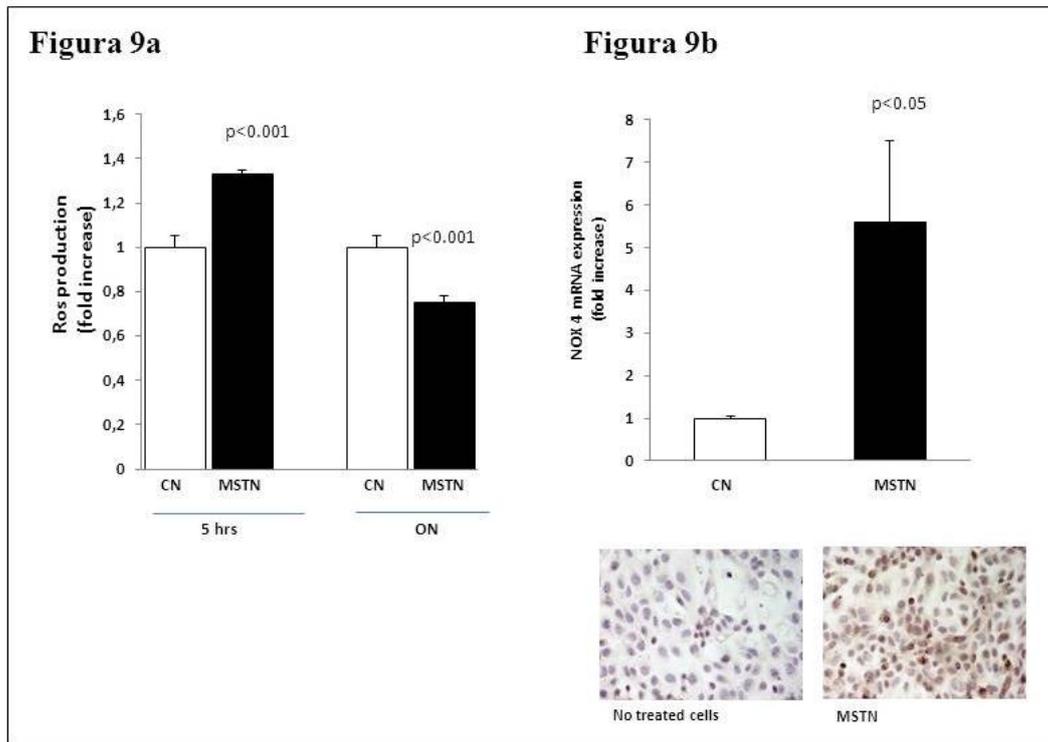
**Figura 8.** *Miostatina induce fibronectina e attiva pSmad2/3*



## Stress Ossidativo

Di recente è stato dimostrato che miostatina è una molecola pro-ossidante e stimola la produzione di composti ossidanti nelle cellule muscolari tramite l'enzima NADPH. La colorazione con CellRox è stato utilizzato per studiare gli effetti di miostatina sulla produzione di specie reattive all'ossigeno. L'analisi citofluorimetrica ha indicato che i ROS intracellulare aumentano di 1,5 volte dopo 5 ore di stimolazione con miostatina ( $p < 0.01$ ) (Figura 9a). La produzione di composti reattivi all'ossigeno si estingue dopo esposizione prolungata alla miostatina (18 ore) (- 25% rispetto alle cellule non trattate). Per indagare ulteriormente i meccanismi alla base della produzione di specie reattive all'ossigeno, abbiamo esaminato gli effetti di miostatina sull'espressione di NOX 4, un membro della famiglia di NAD(P)H. I livelli di mRNA e di proteina di NOX 4 sono marcatamente aumentati nelle cellule trattate con miostatina per 5 ore ( $5,6 \pm 1,9$  volte rispetto alle cellule non trattate,  $p < 0.05$ ) (Figura 9b).

**Figura 9.** *Miostatina induce produzione di ROS e NOX4*

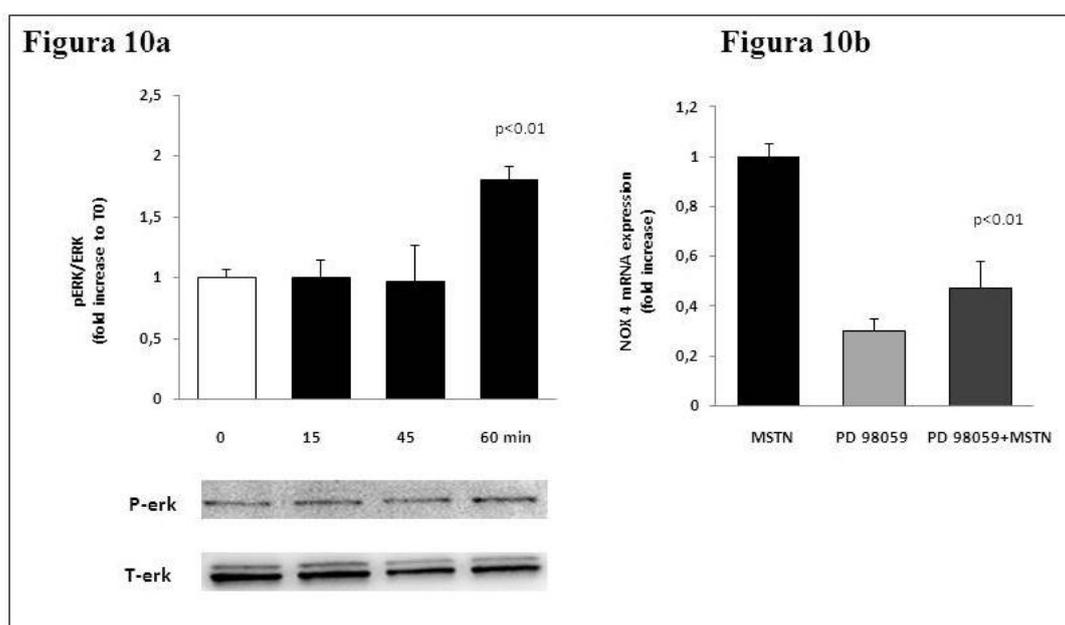


## Segnali intracellulari

Studi in vitro hanno dimostrato che miostatina è coinvolta nell'attivazione di MAPK che controllano la crescita e la differenziazione delle cellule.

Miostatina nelle cellule tubulari induce l'attivazione di p44/42 MAPK (ERK) di 1,8 volte dopo 60 minuti ( $p < 0.01$  vs CN) (figura 10a), mentre p38 e JNK sono invariati rispetto alle cellule non trattate (dati non mostrati). Si sono valutati gli effetti dell'inibizione di ERK sulla produzione di fibronectina, di citochine infiammatorie e sull'espressione di NOX 4. Si è osservato che solo i livelli genici di NOX 4 diminuiscono quando le cellule sono trattate con miostatina e PD 98059, un inibitore di ERK (Figura 10b) (-50% rispetto alle cellule trattate con miostatina  $p < 0.01$ ) suggerendo un coinvolgimento di ERK nella produzione di specie reattive all'ossigeno.

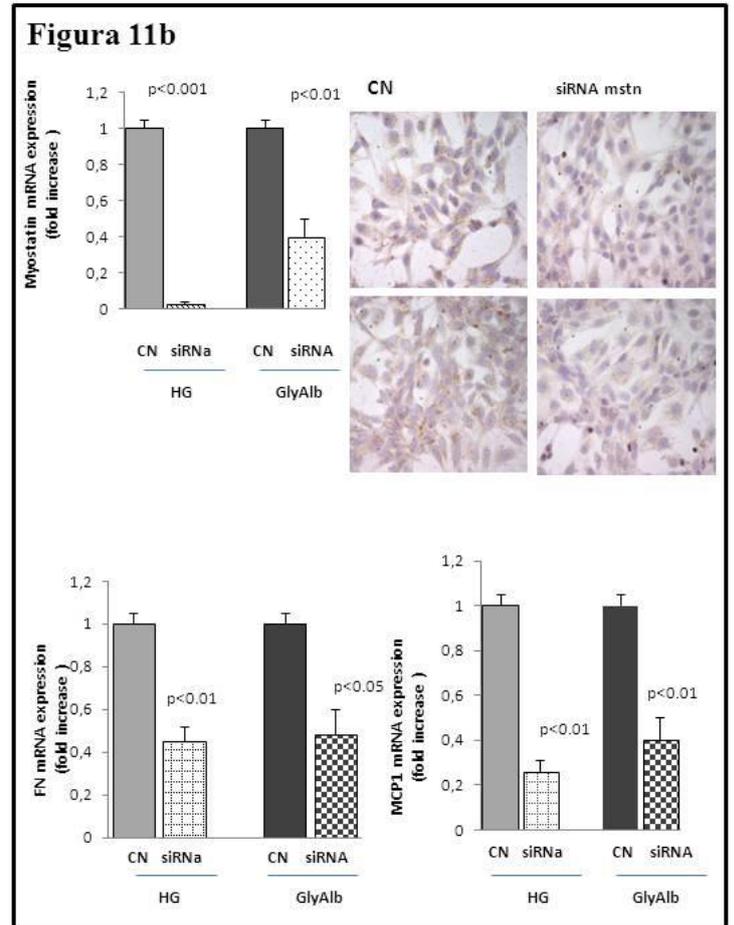
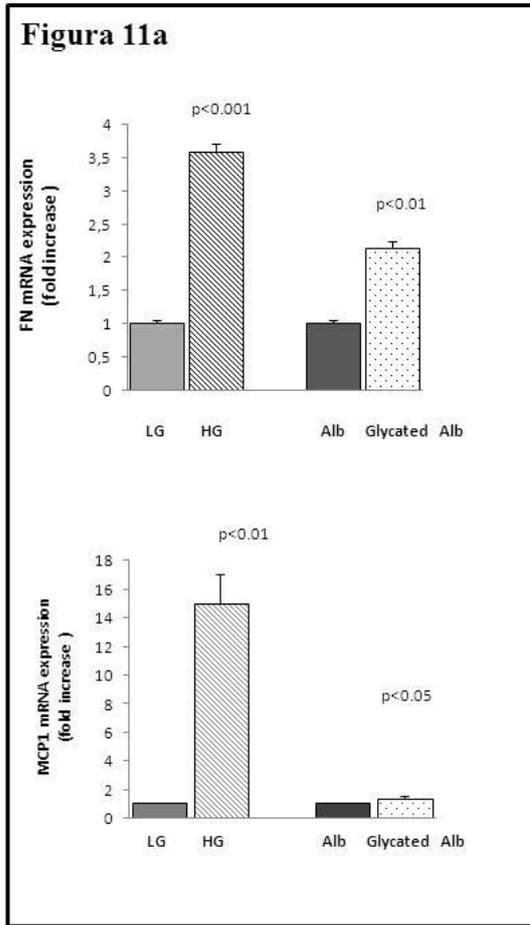
**Figura 10.** ERK è coinvolto nella produzione dei ROS.



#### *4.5 Effetti dell'ambiente simil-diabetico sull'espressione di miostatina e del suo silenziamento.*

Le cellule trattate con alto glucosio e albumina glicata esprimono maggiormente miostatina, fibronectina e MCP-1 (figura 11a). I livelli di mRNA di fibronectina e di MCP-1 delle cellule trattate con alto glucosio aumentano rispettivamente di 4 e 15 volte rispetto alle cellule trattate con basso glucosio ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Mentre nelle cellule trattate con albumina glicata aumentano rispettivamente di 2 e 1,5 volte rispetto alle cellule trattate con albumina normale ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). Per verificare il diretto coinvolgimento di miostatina nei processi di infiammazione e fibrosi la sua espressione è stata inibita con l'utilizzo del siRNA specifico. Dopo 24 ore di trasfezione le cellule sono state stimulate con alto glucosio e albumina glicata. Il silenziamento di miostatina diminuiva significativamente l'espressione di fibronectina e MCP1 rispetto alle cellule trattate con il siRNA di controllo (~ 60-80%,  $p < 0.05-0.01$ ) (Figura 11b).

**Figura 11.** *Miostatina è coinvolta nei processi di fibrosi e infiammazione.*



## 5. Discussione

In questo studio è stato valutato se miostatina, una miochina, può essere espressa anche nel rene o se essa può essere coinvolta nei processi di fibrosi e infiammazione in vitro.

Nelle biopsie renali di pazienti con nefropatia diabetica l'espressione di miostatina è up-regolata sia a livello del comparto glomerulare che tubulare.

Recentemente è stato riportato che miostatina è espressa in molti altri tipi di tessuti e non solo nel muscolo ed è dimostrato che ne influenza in certa misura le loro funzioni. Oltre che a regolare la crescita muscolare, miostatina regola la struttura dei tendini [56]. Inoltre miostatina è stata trovata espressa anche nelle ghiandole mammarie di topo [57] e nella ghiandola ipofisaria del maiale [58].

Sono stati trovati elevati livelli di messaggero e proteina nel tessuto adiposo di topi obesi e alimentati con una dieta ricca di grassi [59]. In base a queste evidenze è stato condotto uno studio nel suino che ha osservato l'espressione di miostatina e del suo recettore anche in una serie di altri tessuti. mRNA di miostatina e il suo recettore, attivina IIB, sono stati trovati nel muscolo scheletrico, muscolo cardiaco, tessuto adiposo, milza, polmone, rene e fibroblasti in coltura. Nello stesso studio l'analisi immunocistochimica ha riportato la presenza di miostatina e attivina IIB nel muscolo scheletrico tessuto adiposo, muscolo cardiaco, milza, polmone e rene del maiale. Questo

risultati suggeriscono che miostatina potrebbe essere associata a specifiche funzioni all'interno degli organi, come metabolismo energetico e fibrosi [60].

Queste evidenze dimostrano un coinvolgimento di miostatina in altri contesti diversi dal muscolo scheletrico. È risaputo che miostatina ha un ruolo nel metabolismo energetico in quanto a livello muscolare regola l'ingresso di glucosio, il meccanismo di insulina resistenza e la sintesi proteica in cellule muscolari scheletriche. Inoltre altri studi hanno dimostrato livelli maggiori di miostatina circolante nel siero dei pazienti diabetici di tipo 2 e una sua up-regolazione nel muscolo scheletrico di questi pazienti. L'aumento di questo fattore sia circolante che a livello muscolare potrebbe associarsi a insulina resistenza, aumento di trigliceridi, infiammazione cronica a bassi livelli e obesità in questi pazienti [61]. Nel presente lavoro miostatina è stata trovata up-regolata sia a livello genico che proteico in biopsie renali di pazienti con nefropatia diabetica.

L'espressione di miostatina nelle cellule infiltranti è un altro aspetto importante da considerare. In questo lavoro si è osservato che le cellule infiltranti nelle biopsie di pazienti con nefropatia diabetica esprimevano maggiori livelli di miostatina, rispetto agli infiltrati di altre patologie renali (glomerulonefrite da depositi di Iga e FSGS). Inoltre questo segnale correlava con il grado di fibrosi interstiziale in corso di nefropatia diabetica, sottolineando il fatto che le cellule infiltranti che esprimono miostatina partecipano ai processi di infiammazione e

di fibrosi tubulo-interstiziale. Questo aspetto è stato approfondito in un lavoro precedente nel quale è stato dimostrato che durante il processo aterosclerotico l'espressione di miostatina da parte delle cellule muscolari vascolari lisce aveva un ruolo nel reclutamento dei leucociti dalla circolazione sanguigna favorendo l'avanzamento della lesione. Inoltre nello stesso lavoro è stato visto che monociti trattati con miostatina esprimevano maggiori livelli di  $\alpha$ -SMA e aumentavano il tasso di migrazione. Nello stesso contesto è stato visto che i monociti trattati con miostatina aumentavano i livelli di MCP-1 e CCR-2: inoltre se trattati con MCP-1 erano stimolati a produrre miostatina instaurando un meccanismo "feed forward".

Queste osservazioni suggeriscono che miostatina espressa e rilasciata a livello renale può influenzare e modulare l'attività delle cellule cambiandone il fenotipo e richiamando cellule infiltranti. Successivamente le cellule infiltranti instaureranno un processo iniziale di infiammazione che richiamerà altre cellule circolanti e successivamente daranno inizio ai processi di fibrosi.

L'espressione di miostatina da parte delle cellule renali potrebbe essere un segnale precoce nella patogenesi della nefropatia diabetica. L'espressione di miostatina da parte delle cellule infiltranti potrebbe invece essere un segnale più tardivo dal quale potrebbe iniziare il processo di fibrosi.

Miostatina viene clivata nella sua forma attiva e viene secreta nell'ambiente circostante rappresentando un fattore micro ambientale con ruolo sia paracrino

che autocrino. È stato visto che le cellule tubulari renali HK-2 se cresciute in ambiente simil-diabetico, come alto glucosio o albumina glicata, producono miostatina, di conseguenza sono stati studiati gli effetti di questo fattore su cellule renali umane HK-2.

I nostri risultati dimostrano che le cellule trattate con miostatina assumono un fenotipo pro-fibrotico e pro-infiammatorio. Infatti le cellule incubate con miostatina esprimono maggiori livelli di fibronectina tramite l'attivazione della via di segnale di Smad2/3. È noto che TGF- $\beta$ /Smad2/3 è la via di segnale attivata durante nefropatia diabetica e che induce fibrosi a livello renale.

Nelle stesse cellule aumenta la fosforilazione della subunità di NF- $\kappa$ B, p65 stimolando l'espressione di citochine pro-infiammatorie, nel nostro caso RANTES e MCP-1. L'aumento di queste citochine induce lo stato infiammatorio e richiama nel sito specifico cellule circolanti. Le quali a loro volta stimolate produrranno miostatina, MCP-1 sostenendo e promuovendo l'infiammazione iniziale e successivamente la fibrosi interstiziale.

Inoltre è stato visto che in cellule tubulari renali trattate con miostatina aumenta lo stress ossidativo dipendente dall'attivazione di p44/42 MAPK e di NOX4.

I risultati di questo lavoro dimostrano che gli effetti pro-fibrotici e pro-infiammatori che ne derivano dall'ambiente simil-diabetico dipendono da

miostatina. Infatti trasfettando le cellule con il siRNA di miostatina, l'espressione di fibronectina e di MCP-1 viene bloccata.

Quindi anche il rene produce miostatina e ne è anche bersaglio in corsi di diabete, miostatina può essere un'altra citochina coinvolta nella patogenesi della nefropatia diabetica.

Per questo motivo la miostatina potrebbe essere un possibile bersaglio nella terapia della nefropatia diabetica.

Miostatina appartiene alla famiglia del TGF- $\beta$ . Numerosi esperimenti in vitro e in vivo, hanno indicato che il TGF- $\beta$  ha un ruolo importante nella progressione della nefropatia diabetica. Il TGF- $\beta$  è up-regolato dal glucosio e induce la produzione di matrice extracellulare in cellule mesangiali (62) ed è espresso nelle cellule mesangiali di pazienti con nefropatia diabetica avanzata. (63). La neutralizzazione del TGF- $\beta$  tramite anticorpo specifico riduce la sclerosi e l'ipertrofia mesangiale in modelli animali (64). Nonostante i numerosi risultati positivi dell'inibizione di TGF- $\beta$ , tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali, sull'uomo l'uso di questo anticorpo non ha prodotto risultati. Infatti di recente un anticorpo sperimentale, noto con la sigla LY2382770, si è dimostrato sicuro e ben tollerato, ma non è riuscito a rallentare la progressione della malattia nei pazienti con nefropatia diabetica avanzata in uno studio di fase II.

Pertanto, per questo motivo e alla luce di quanto riportato nella mia tesi, il blocco della miostatina potrebbe essere un nuovo bersaglio per inibire la

progressione del danno renale in corso di diabete. In letteratura sono riportati molecole che bloccano l'attività della miostatina impiegate principalmente nel trattamento di patologie degenerative del muscolo. In uno studio recente, è stata presentata una lista di nuovi farmaci, la maggior parte dei quali in fase sperimentale 2/3, inibitori del pathway della miostatina che agiscono in maniera selettiva sulla contrattilità, sull'associazione contrazione-eccitamento, sulla giunzione neuromuscolare. (65). Nella tabella 6 sono riportati i principali inibitori di miostatina utilizzati in studi clinici. Il futuro della ricerca presentata in questa tesi, potrebbe essere testare l'efficacia di queste molecole anche nel rallentare o bloccare la progressione del danno renale in corso dia diabete.

**Tabella 6.** Inibitori di miostatina utilizzati in studi clinici.

MOA	Drug	Sponsor	Indication	Status
Myostatin inhibitors	LY2495655	Lilly	Cancer cachexia	Phase 2
			Hip replacement recovery	
			Falls in the elderly	
	REGN-1033	Regeneron/Sanofi	Sarcopenia	Phase 2
	PF-06252616	Pfizer		Phase 1
	AMG745	Amgen		stopped

## Bibliografia

1. R.J. MacIsaac E.I. Ekinci, G. Jerums. **Markers of and Risk Factors for the Development and Progression of Diabetic Kidney Disease.** Am J Kidney Dis. 2014 63(2)(S2):S39-S62
2. Konstantinos Tziomalos, Vasilios G. Athyros. **Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis.** Rev Diabet Stud, 2015, 12(1-2):110-118.
3. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. **Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy.** N Engl J Med 2001 345: 861–869.
4. Ruggenti P, Cravedi P, Remuzzi G. **The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy.** Nat Rev Nephrol 2010 6: 319 –330.
5. Arora MK, Singh UK. **Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update.** VasculPharmacol. 2013 Apr;58(4):259-71.
6. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. **Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis.** Kidney Int. 1994 Mar;45(3):916-27.
7. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S. **Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys.** Lab Invest. 1993 Feb;68(2):154-63.
8. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. **Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 1;90(5):1814-8.
9. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K. **Quantification of glomerular TGF-beta 1 mRNA in patients with diabetes mellitus.** KidneyInt. 1996 Apr;49(4):1120-6.
10. Isono M, Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN. **Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells.** BiochemBiophys Res Commun. 2002 Sep 6;296(5):1356-65.
11. Fujimoto M, Maezawa Y, Yokote K, Joh K, Kobayashi K, Kawamura H, Nishimura M, Roberts AB, Saito Y, Mori S. **Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy.** BiochemBiophys Res Commun. 2003 Jun 13;305(4):1002-7.
12. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ, Lan HY. **Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease.** FASEB J. 2004 Jan;18(1):176-8. Epub 2003 Apr 22.
13. Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida C, Aoki M, Hosono M, Kitagawa M, Hishida A. **Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling.** Kidney Int. 2004 Jan;65(1):63-74.
14. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. **Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling.** J Biol Chem. 1997 Jan 17;272(3):1429-32.
15. Choi ME. **Mechanism of transforming growth factor-beta1 signaling.** KidneyIntSuppl. 2000 Sep;77:S53-8. Review.
16. Chin GS, Liu W, Peled Z, Lee TY, Steinbrech DS, Hsu M, Longaker MT. **Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts.** PlastReconstr Surg. 2001 Aug;108(2):423-9.

17. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. **Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis.** *Kidney Int* 1994;45:916–927.
18. Vaughan M, Howard E, Tomasek J. **Transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast.** *Exp Cell Res* 2000 257:180–189
19. Oda D, Gown AM, Vande Berg JS, Stern R. **The fibroblast-like nature of myofibroblasts.** *ExpMolPathol* 1988;49:316–329;
20. Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. **Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study.** *Am J Pathol* 1994;145:114–125.
21. Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ. **Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescentic glomerular injury.** *J Am Soc Nephrol* 1994 5:201–209
22. Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. **Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats.** *Kidney Int* 1998;54:864–876.
23. Liu Z, Li Y, Zhang J. **Modulatory effect of transforming growth factor-beta and Rhein on glucose transporter-1 in human glomerular mesangial cells.** 1999 Oct;79(10):780-3.
24. Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. **Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials.** *Nat Rev Drug Discov.* 2009 May;8(5):417-29.
25. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. **Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy.** *Diabetes.* 2006 Jan;55(1):225-33.
26. Gill PS, Wilcox CS. **NADPH oxidases in the kidney.** *Antioxid Redox Signal.* 2006 Sep-Oct;8(9-10):1597-607.
27. Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Sakamoto K, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y. **Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes.** *Antioxid Redox Signal.* 2007 Mar;9(3):355-66.
28. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. **Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney.** *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39616-26. Epub 2005 Aug 31.
29. Jha JC, Gray SP, Barit D, Okabe J, El-Osta A, Namikoshi T, Thallas-Bonke V, Wingler K, Szyndralewicz C, Heitz F, Touyz RM, Cooper ME, Schmidt HH, Jandeleit-Dahm KA. **Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy.** *J Am Soc Nephrol.* 2014 Jun;25(6):1237-54.
30. Jha JC, Thallas-Bonke V, Banal C, Gray SP, Chow BS, Ramm G, Quaggin SE, Cooper ME, Schmidt HH, Jandeleit-Dahm KA. **Podocyte-specific Nox4 deletion affords renoprotection in a mouse model of diabetic nephropathy.** *Diabetologia.* 2016 Feb;59(2):379-89.
31. Thallas-Bonke V, Jha JC, Gray SP, Barit D, Haller H, Schmidt HH, Coughlan MT, Cooper ME, Forbes JM, Jandeleit-Dahm KA. **Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- $\alpha$ -associated mechanisms in diabetic nephropathy.** *Physiol Rep.* 2014 Nov 3;2(11).
32. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. **Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney.** *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39616-26. Epub 2005 Aug 31.
33. Zhao B, Wall RJ, Yang J. **Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005 337: 248–255.

34. Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, et al. **Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity.** PLoS ONE 2009;4: e4937.
35. Wilkes JJ, Lloyd DJ, Gekakis N. **Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance.** Diabetes 2009;58: 1133–1143.
36. Claus Brandt, Anders R. Nielsen, Christian P. Fischer, Jakob Hansen, Bente K. Pedersen, Peter Plomgaard. **Plasma and Muscle Myostatin in Relation to Type 2 Diabetes.** PlosOne 2012.
37. Verzola D, Milanese S, Bertolotto M, Garibaldi S, Villaggio B, Brunelli C, Balbi M, Ameri P, Montecucco F, Palombo D, Ghigliotti G, Garibotto G, Lindeman JH, Barisione C. **Myostatin mediates abdominal aortic atherosclerosis progression by inducing vascular smooth muscle cell dysfunction and monocyte recruitment.** Sci Rep. 2017 Apr 13;7:46362. doi:10.1038/srep46362.
38. Rios, R., Fernandez-Nocelos, S., Carneiro, I. et al. **Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests that myostatin acts as an autocrine factor in vivo.** Endocrinology 2003;145, 2795–2803.
39. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$ superfamily member.** Nature. 1997 387,83–90.
40. Verzola D, Procopio V, Sofia A, Villaggio B, Tarroni A, Bonanni A, Mannucci I, De Cian F, Gianetta E, Saffioti S, Garibotto G. **Apoptosis and myostatin mRNA are upregulated in the skeletal muscle of patients with chronic kidney disease.** Kidney Int. 2011 Apr;79(7):773-82.
41. Jiao J1, Yuan T, Zhou Y, Xie W, Zhao Y, Zhao J, Ouyang H, Pang D. **Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues.** J Anim Sci. 2011 Oct;89(10):3099-106.
42. Biesemann N1, Mendler L, Kostin S, Wietelmann A, Borchardt T, Braun T. **Myostatin indices interstitial fibrosis in the heart via TAK1 and p38.** Cell Tissue Res. 2015 Sep;361(3):779-87.
43. Bo Li Z1, Zhang J, Wagner KR. **Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis.** J Cell Sci. 2012 Sep 1;125(Pt 17):3957-65
44. Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X, Du J, Mitch WE. **Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease.** FASEB J. 2011 May;25(5):1653-63.
45. .Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, Kambadur R, Sharma M. **Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- $\kappa$ B.** Aging Cell. 2011 Dec;10(6):931-48
46. Claus Brandt, Anders R. Nielsen, Christian P. Fischer, Jakob Hansen, Bente K. Pedersen, Peter Plomgaard. **Plasma and Muscle Myostatin in Relation to Type 2 Diabetes.** PLoS ONE 2012 | Volume 7 | Issue 5 | e37236.
47. Palsgaard J, Brøns C, Friedrichsen M, Dominguez H, Jensen M, Storgaard H, Spohr C, Torp-Pedersen C, Borup R, De Meyts P, Vaag A. **Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways.** PLoS One. 2009;4(8):e6575.
48. American Diabetes Association. **Standard of medical care in diabetes.** DIABETES, VOL. 58, JANUARY 2009. Diabetes Care 2009 Jan; 32(Supplement 1): S13-S61.

49. Yano S, Nagai A, Isomura M, Yamasaki M, Kijima T, Takeda M, Hamano T, Nabika T. **Collection 2015. Relationship between Blood Myostatin Levels and Kidney Function: ShimaneCoHRE Study.** PLoS One. 2015 Oct 26;10(10):e0141035
50. Jiao J, Yuan T, Zhou Y, Xie W, Zhao Y, Zhao J, Ouyang H, Pang D. **Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues.** J Anim Sci. 2011 Oct;89(10):3099-106.
51. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F et al. **Apoptosis in the kidneys of patients with type diabetic nephropathy.** Kidney Int 2007;72:1262–1272.
52. Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G et al. **Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy.** Am J Physiol Renal Physiol 2008; 295: F1563–F1573.
53. Tervaertm TWC, Mooyaart AL, Amann Ket al. **Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy.** J Am Soc Nephrol 2010;4: 556–563.
54. Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B et al. **Taurine prevents apoptosis induced by high ambient glucose in human tubule renal cells.** J Invest Med 2002;50 443–451.
55. McCroskery et al. **Myostatin induces interstitial fibrosis in the heart via TAK1 and p38.** Cell Tissue Res. 2015 Sep;361(3):779-87.
56. Mendias, C. L., K. I. Bakhurin, and J. A. Faulkner. **Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular.** Proc. Natl. Acad. Sci. 2008 USA 105:388–393.
57. Manickam, R., R. N. Pena, and C. B. a. Whitelaw. **Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression.** Mol. Reprod. Dev. 2008. 75:1783–1788.
58. Taketa, Y., Y. Nagai, H. Ogasawara, S. Hayashi, M. Miyake, S. Tanaka, K. Watanabe, S. Ohwada, H. Aso, and T. Yamaguchi. **Differential expression of myostatin and its receptor in the porcine anterior pituitary gland.** Anim. Sci. J. 2008 79:382–390.
59. Allen, D. L., Cleary, A. S., Speaker, K. J., Lindsay, S. F., Uyenishi, J., et al. **Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2008 294, E918–E927.
60. Jiao J, Yuan T, Zhou Y, Xie W, Zhao Y, Zhao J, Ouyang H, Pang D. **Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues.** J Anim Sci. 2011 89(10):3099-106.
61. Brandt C1, Nielsen AR, Fischer CP, Hansen J, Pedersen BK, Plomgaard P. **Plasma and muscle myostatin in relation to type 2 diabetes.** PLoS One. 2012;7(5):e37236.
62. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, and Wolf G. **Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor.** J Clin Invest 93: 536–542, 1994.
63. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, and Border WA. **Expression of transforming growth factor is elevated in human and experimental diabetic nephropathy.** Proc Natl Acad Sci USA 90: 1814–1818, 1993.
64. Sharma K, Jin Y, Guo J, and Ziyadeh FN. **Neutralization of TGF- $\beta$  by anti-TGF- $\beta$  antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice.** Diabetes 45: 522–530, 1996.
65. Meriggioli MN, Roubenoff R. **Prospect for pharmacological therapies to treat skeletal muscle dysfunction.** Calcif Tissue Inter 2015 Mar; 96:234-242)