



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**Activación de células parietales de la cápsula de Bowman por  
disminución en la expresión de la proteína Gas1 en diabetes murina.**

**T E S I S**

Que presenta

**BRENDA IVONNE LUNA ANTONIO**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

**DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ**

**DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2014

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
por el apoyo económico recibido durante el desarrollo de esta tesis.**

## Resumen

La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones de la diabetes. Ésta induce la pérdida de podocitos, células importantes en el proceso de filtración glomerular que definen la evolución del daño renal. Se tiene evidencia de que en la cápsula de Bowman (CB) existe una población de células progenitoras con propiedades de auto-renovación y que posiblemente se diferencien a podocitos o células del túbulo proximal. Gas1 (Growth Arrest Specific protein 1) es una proteína que inhibe el ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase S, también se conoce su actividad como agente proapoptótico. Recientemente se ha descrito la expresión de Gas1 en células glomerulares renales y su papel como inhibidor endógeno de la proliferación celular. Por lo anterior, es posible que Gas1 tenga un papel importante en la activación de células progenitoras renales en etapas tempranas de la diabetes.

En este proyecto se describe la expresión de Gas1 en la CB. Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia muestran que la diabetes disminuye la expresión de Gas1 en la CB y aumenta la expresión de NCAM (marcador de células progenitoras) en esta misma estructura. El análisis por WB muestra que en diabetes hay un aumento en la expresión CD24 (marcador de células progenitoras renales). Se analizó la expresión de PAX2 en células de la CB en condiciones normales y diabéticas. También se evaluó la expresión de WT-1 en la CB, en el grupo control se observaron algunas células WT-1<sup>+</sup>. Sin embargo, en diabetes el número de células WT-1<sup>+</sup> aumenta.

Estos resultados sugieren que, la pérdida de GAS1 favorece la activación de células progenitoras renales de la CB y que estas, posiblemente se podrían diferenciar a podocitos, al adquirir marcadores específicos como WT-1.

## **Abstract**

Diabetic nephropathy is a common complication of diabetes. Diabetic nephropathy induces the loss and damage to podocytes, which are important cells in the glomerular filtration process. The loss of podocytes defines the evolution of kidney damage. There is evidence that in the Bowman's capsule exist a subpopulation of progenitor cells with self-renewal properties and possibly this cells can differentiate into podocytes or proximal tubule cells. Gas1 (Growth Arrest Specific protein 1 ) is a protein that inhibits cell cycle in the transition of the phase G0 to S and is a pro-apoptotic agent. Recently, it has been described GAS1 expression in renal glomerular cells and its role as an endogenous inhibitor of cell proliferation. Based on the findings described above, it is possible that Gas1 plays an important role in the activation of renal progenitor cells in early stages of diabetes.

In this study the expresión of Gas1 was described in the Bowman's capsule. Immunofluorescence results shows that diabetes decreased the expresion of Gas1 in the Bowman's capsule and increase the expresion of NCAM (a progenitor cell marker) in the same structure. Western Blot analysis show that diabetes increases the expresion of CD24 (a specific marker of renal progenitor cells). PAX2 expresion was analyzed on cells in the Bowman's capsule in normal and diabetic conditions. We also analyzed the expresion of WT-1 (a podocyte marker) into the Bowman's capsule, we found that in control conditions there are some WT-1<sup>+</sup> cells but under diabetes the number of WT-1<sup>+</sup> cells increases.

These results suggest that loss of Gas1 expresion in the Bowman's capsule favors progenitor cells activation in the Bowman's capsule showed by increased expresion of CD24 and NCAM and possibly these cells differentiate into podocytes as shown by increased number of WT-1<sup>+</sup> cells in the Bowman's capsule, all these in early stages of diabetes.

## Abreviaturas

AGE`s	Cuerpos avanzados de glicosilación.
AVC	Accidente vascular cerebral.
CB	Cápsula de Bowman
CD24	Clúster de diferenciación 24
Cldn1	Claudina 1
Cldn2	Claudina 2
CP	Células parietales
CPR	Células progenitoras renales
FOXO4	Proteína O4 forkhead box
Gas1	Growth arrest specific 1
IMF	Inmunofluorescencia
ISRC	Insuficiencia renal crónica
LEC	Líquido extra celular
MBG	Membrana basal glomerular
MEC	Membrana extracelular
NCAM	Neural cell adhesion molecule
OCCL	Ocludina
PAX2	Paired box gene 2
PKC	Proteína quinasa C
RAGE	Receptor de los AGE's
SALL1	Sal-like 1
SIX2	SIX homeobox 2
STZ	Estreptozotocina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
WB	Western blot
WT-1	Wilms tumor protein
ZO1	Zonula occludens 1

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Marco teórico</b> .....	2
2.1. El sistema renal .....	2
2.1.1. El riñón y la nefrona.....	2
2.1.2. El glomérulo .....	3
2.1.2.1. Los podocitos.....	4
2.1.2.2. Células parietales de la cápsula de Bowman.....	4
2.1.2.3. Células progenitoras de la cápsula de Bowman.....	5
2.2. Diabetes.....	7
2.2.1. Nefropatía diabética.....	7
2.2.2. Alteraciones glomerulares inducidas por la diabetes .....	8
2.2.3. Cuerpos avanzados de glicosilación: AGE's .....	10
2.2.4. Los AGE's y los podocitos.....	10
2.3. Gas1 .....	11
<b>3. Justificación</b> .....	13
<b>4. Hipótesis</b> .....	14
<b>5. Objetivos</b> .....	14
<b>6. Materiales y Reactivos</b> .....	15
6.1. Reactivos.....	15
6.1.1. Inducción de diabetes experimental.....	15
6.1.2. Cuantificación de proteínas por método de Lowry.....	15
6.1.3. Cuantificación de creatinina por el método de Jaffé.....	15
6.1.4. Anticuerpos Primarios.....	15
6.1.5. Anticuerpos secundarios.....	16
6.2. Materiales.....	16

<b>7. Metodología</b> .....	17
7.1. Animales experimentales.....	17
7.2. Cuantificación de proteínas urinarias por el método de Lowry.....	17
7.3. Cuantificación de creatinina por método de Jaffé.....	18
7.3.1. Cuantificación de creatinina en suero.....	18
7.3.2. Cuantificación de creatinina en orina.....	18
7.4. Tejido renal.....	18
7.5. Aislamiento de Glomérulos totales.....	19
7.6. Análisis por Western Blot.....	19
7.7. Criopreservación del Tejido.....	20
7.8. Inmunofluorescencia.....	20
7.8.1. Inmunofluorescencia por método de citrato de Sodio.....	20
7.8.2. Inmunofluorescencia por fijación con metanol.....	21
7.9. Análisis de datos.....	21
<b>8. Resultados</b> .....	22
8.1. Modelo de diabetes en ratas.....	22
8.2. Pruebas de función renal.....	23
8.3. Expresión de Gas1 y NCAM en las CP de la cápsula de Bowman.....	24
8.3.1. Expresión de Gas1 y NCAM por WB.....	25
8.4. Expresión de CD24 en la cápsula de Bowman.....	27
8.5. Reprogramación de células progenitoras renales.....	28
8.6. Expresión de WT-1 en células de la cápsula de Bowman.....	30
8.7. Posible papel de las células progenitoras de la cápsula de Bowman.....	31
<b>9. Discusión</b> .....	34
<b>10. Conclusiones</b> .....	39
<b>11. Perspectivas</b> .....	40
<b>12. Bibliografía</b> .....	41

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática de glomérulo	3
<b>Figura 2.</b>	Subpoblación de células progenitoras en la cápsula de Bowman	5
<b>Figura 3.</b>	Fotomicrografía representativa de CPR	6
<b>Figura 4.</b>	Representación esquemática de la población celular identificada en la cápsula de Bowman	7
<b>Figura 5.</b>	Cambios glomerulares característicos en diabetes	9
<b>Figura 6.</b>	Expresión de Gas1 y NCAM en células de la cápsula de Bowman	25
<b>Figura 7.</b>	Análisis de la expresión de Gas1 y NCAM por WB en glomérulos totales	26
<b>Figura 8.</b>	Expresión de CD24 por WB	27
<b>Figura 9.</b>	Expresión de PAX2 en células de cápsula de Bowman	28
<b>Figura 10.</b>	. Análisis por WB de PAX2.	29
<b>Figura 11.</b>	Expresión de Wt-1 en células de la cápsula de Bowman	30
<b>Figura 12.</b>	Inmunofluorescencia de Nefrina	31
<b>Figura 13.</b>	Análisis de la expresión Nefrina por WB en glomérulos totales	31
<b>Figura 14</b>	Análisis de expresión de Dendrina por WB en glomérulos totales	32

## Índice de gráficas.

<b>Gráfica 1.</b>	Niveles de glucosa en sangre del grupo control y de los grupos experimentales de 1, 2 y 3 semanas con diabetes	23
<b>Grafica 2.</b>	Depuración de creatinina	24
<b>Grafica 3.</b>	Proteinuria corregida con creatinina en orina	24

## 1. Introducción

En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes y se estima que para el 2030 será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial. En México la diabetes es una de las principales causas de muerte. En el 2011, de 100 mil defunciones el 70% fue por diabetes. Se sabe que de cada 100 mil ingresos hospitalarios por alguna complicación de diabetes, 24 mil son de tipo renal.

La nefropatía diabética, es una de las complicaciones severas de la diabetes. El daño renal inducido por diabetes origina alteraciones en la estructura renal, principalmente en el glomérulo. Estas alteraciones promueven la pérdida de podocitos, células epiteliales glomerulares importantes para el proceso de filtración renal. La evolución de la nefropatía diabética depende de la pérdida de podocitos y la alteración en la filtración renal, en casos severos se desarrolla insuficiencia renal crónica. Los podocitos son células altamente diferenciadas y que poseen una muy baja proliferación celular, es por esto que, frente a un insulto como la diabetes, los podocitos tengan un mecanismo deficiente para compensar su pérdida.

Debido a la importancia que representan los podocitos en el desarrollo de la nefropatía diabética, se han propuesto posibles mecanismos de compensación ante la pérdida de podocitos posterior a un insulto. Un mecanismo que se propone se relaciona con células progenitoras renales. Recientemente se ha descrito, que a nivel glomerular hay una subpoblación de células progenitoras renales, que posiblemente frente al daño o pérdida de los podocitos, se activan y diferencian a podocitos para compensar la pérdida inducida. Con todo esto, en este proyecto se analiza el papel que tienen estas células progenitoras renales en daño inducido por diabetes.

## 2. Marco teórico

### 2.1. El sistema renal

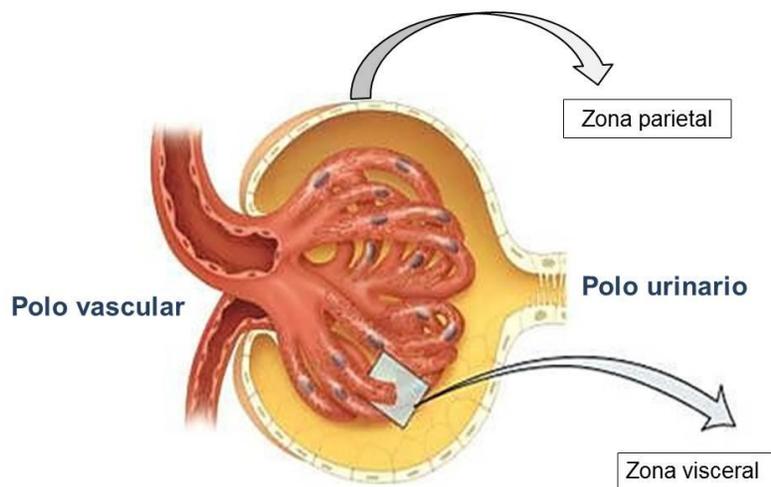
El sistema renal representa un eje importante y fundamental para el organismo. Está formado por órganos denominados riñones, localizados en la cavidad retroperitoneal, los cuales están en comunicación con la vejiga mediante estructuras conocidas como uréteres. Dentro de las funciones más importantes que lleva a cabo el sistema renal se encuentran el mantenimiento del equilibrio entre el volumen del líquido extracelular (LEC) y la osmolaridad existente entre los compartimentos fisiológicos. También tiene otras funciones como: la regulación del pH, el mantenimiento del balance de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), la excreción de sustancias de desecho (creatinina, urea, ácido úrico, fármacos, sustancias tóxicas entre otros), así también, la producción y secreción hormonal (renina y eritropoyetina).<sup>1</sup>

#### 2.1.1. El riñón y la nefrona.

El riñón se divide macroscópicamente en dos zonas, una zona externa denominada corteza y una zona interna denominada médula. Ambas zonas renales están conformadas por la nefrona, unidad funcional del riñón. La nefrona es una serie de túbulos perfectamente ordenada, que realiza los procesos de filtración, reabsorción y secreción. La nefrona está constituida por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle (ascendente delgada y descendente), el túbulo distal y los túbulos colectores. Un riñón humano contiene aproximadamente entre 1- 1.5 millones de nefronas.<sup>2</sup>

### 2.1.2. El glomérulo

El glomérulo es la única estructura esférica de la nefrona y es donde se lleva a cabo el proceso de filtración renal. El glomérulo tiene un polo urinario que lo conecta con el túbulo contorneado proximal y un polo vascular, donde se localizan las arteriolas, aferente y eferente. Al mismo tiempo, se destacan dos zonas glomerulares, una zona interna o visceral, formada por los capilares intraglomerulares, células mesangiales (que dan soporte a los capilares) y los podocitos, células epiteliales que rodean a los capilares glomerulares.<sup>3</sup> y una zona externa o parietal en el glomérulo (**Figura 1**). Esta zona está formada principalmente por la membrana basal de Bowman o cápsula de Bowman (laminina III y IV, colágeno IV, heparansulfato, proteoglicanos), adheridas a esta membrana hay una monocapa de células parietales o células de la cápsula de Bowman.



**Figura 1.** Representación esquemática del glomérulo.

#### 2.1.2.1. Los podocitos

Los podocitos están formados por un cuerpo celular primario del cual emergen prolongaciones (constituidas por filamentos de tubulina y actina) denominados procesos podálicos primarios y secundarios.<sup>4</sup> Los procesos podálicos secundarios se interdigitan con otros procesos podálicos, confiriéndoles a los podocitos mayor estabilidad, una nula motilidad y, lo más importante, formando el diafragma en hendidura.<sup>5</sup> En conjunto las células endoteliales de los capilares intraglomerulares, la membrana basal glomerular (formada por sialoproteínas y glicoproteínas) y el diafragma en hendidura forman la barrera de ultrafiltración, que juega un papel determinante en el proceso de filtración renal.<sup>6</sup>

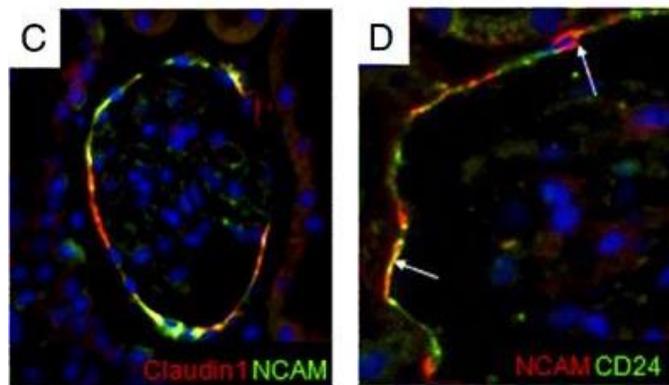
#### 2.1.2.2. Células parietales de la cápsula de Bowman.

Las células parietales (CP) son células epiteliales escamosas, con un grosor de 0.1-0.3  $\mu\text{m}$ . Son células poligonales, aplanadas y con escasas microvellosidades (0-2 por célula). En ellas se ha identificado a la proteína de filamentos intermedios citoqueratina 8. En las células epiteliales parietales Cldn1, Cldn2, Ocludina y ZO-1 se han descrito como proteínas de la unión estrecha.<sup>7</sup> Algunas funciones de este tipo celular son:

- Formar una barrera de permeabilidad selectiva.
- Captación de albúmina. Las CP capturan albúmina mediante endocitosis, en condiciones de alta concentración de albúmina (como en enfermedades nefróticas).
- Contractilidad.
- La CP poseen un cilio primario. Este cilio es responsable de inducir un incremento del calcio intracelular en la CP que modula la expresión de genes.<sup>8</sup>

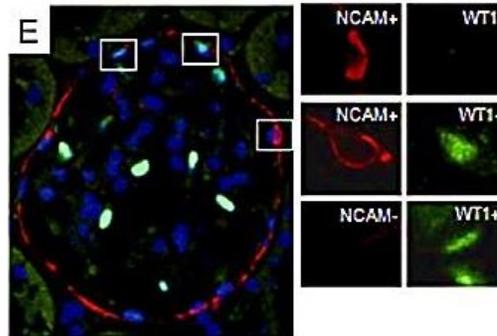
### 2.1.2.3. Células progenitoras de la cápsula de Bowman.

Recientemente se ha descrito que en la cápsula de Bowman, existe una subpoblación de CP que presentan características de células progenitoras, las cuales bajo ciertas condiciones fisiológicas, pierden gradualmente las características de células progenitoras para diferenciarse a podocitos.



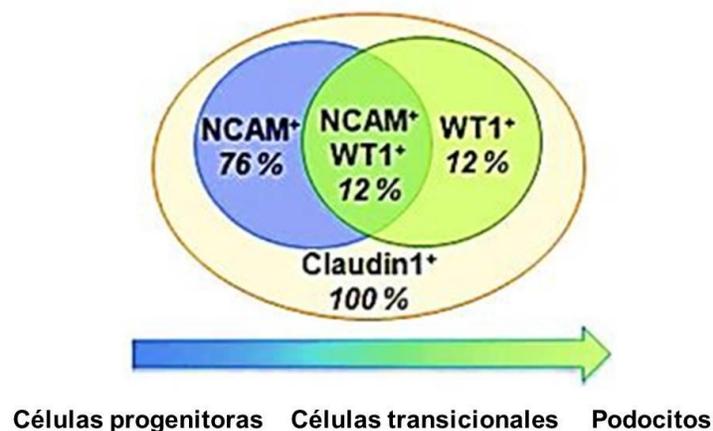
**Figura 2.** Subpoblación de células progenitoras en la cápsula de Bowman en ratas hembra Wistar. C) Inminofluorescencia de Cldn1 y NCAM. D) Inminofluorescencia de NCAM y CD24. Tomado de Remuzzi et al. (2011)<sup>9</sup>.

Remuzzi y colaboradores, evaluaron la expresión por inmunofluorescencia de Cldn1 (**Figura 2**), y de marcadores del fenotipo de células progenitoras, NCAM (proteína que se expresa en el mesénquima metanéfrico durante nefrogénesis) y CD24 (marcador de células progenitoras renales), y observaron que había coexpresión de estas proteínas, demostrando que en la cápsula de Bowman, existe una subpoblación de células progenitoras renales.



**Figura 3.** Fotomicrografía representativa de CPR. Se observan tres poblaciones distintas de células progenitoras en la cápsula de Bowman. Proteínas NCAM<sup>+</sup>, WT1<sup>+</sup>. Tomado de Remuzzi et al. (2011)<sup>9</sup>.

También se describió que en esta subpoblación de células progenitoras existen un tipo de células que únicamente expresan marcadores de células progenitoras (NCAM<sup>+</sup>), así como células progenitoras transitorias que coexpresan marcadores de células progenitoras y podocitos (NCAM<sup>+</sup> y WT1<sup>+</sup>) y células aún más diferenciadas, los podocitos parietales (WT1<sup>+</sup>).<sup>9</sup>



**Figura 4.** Representación esquemática de la población celular identificada en la cápsula de Bowman. Modificado de Remuzzi et al. (2011)<sup>9</sup>.

## 2.2. Diabetes

Existen patologías donde se afecta la estructura renal, una de ellas es la diabetes. La diabetes es un trastorno metabólico que se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre. Existen 3 tipos de diabetes:

- Diabetes tipo 1 conocida comúnmente como diabetes infantil, juvenil o insulino dependiente, donde existe una producción deficiente de insulina.
- Diabetes tipo 2 conocida como diabetes no insulino dependiente ó de la edad adulta, donde la insulina actúa ineficazmente.
- Diabetes gestacional, que es un estado hiperglucémico durante el embarazo. Debido a la resistencia a la insulina que provocan las hormonas del embarazo.

Se conoce que la diabetes incrementa el riesgo de padecer cardiopatía, accidente vascular cerebral, retinopatía, neuropatía de extremidades inferiores y daño renal.<sup>10</sup>

### 2.2.1. Nefropatía diabética

La nefropatía diabética, es una de las complicaciones de la diabetes. La nefropatía diabética es un síndrome caracterizado por la presencia de proteinuria y alteraciones en la tasa de filtración glomerular. La nefropatía diabética es una de las principales causas de insuficiencia renal crónica (IRC).

La nefropatía diabética es una de las complicaciones más severas de la diabetes, ya que las personas que la padecen no solo sufren daño renal, también desarrollan problemas cardiovasculares. Una vez que los pacientes diabéticos desarrollan IRC, se estima una sobrevida a 5 años (para aproximadamente el 50% de los pacientes).<sup>11</sup>

En el mundo existen alrededor de 347 millones de personas con diabetes, el 40 % desarrolla insuficiencia renal.<sup>10</sup> En México, de cada 100 ingresos hospitalarios por complicaciones de la diabetes, 24 son del tipo renal. Durante el 2011, de 100 mil defunciones el 70% fueron por diabetes, principalmente por complicaciones renales.<sup>12</sup>

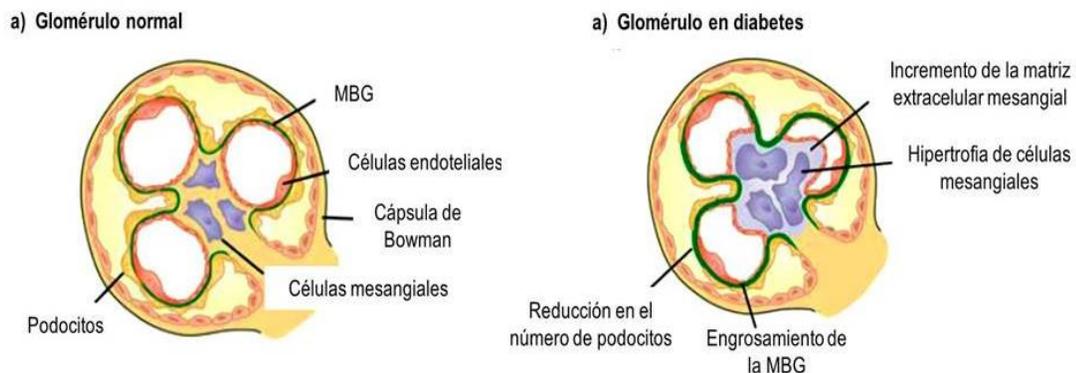
### 2.2.2. Alteraciones glomerulares inducidas por la diabetes

La diabetes induce alteraciones renales, principalmente a nivel glomerular como:

- Engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG). En diabetes, es el primer evento de daño glomerular que ocurre. La MBG está constituida por colágeno tipo IV, laminina 521 ( $\alpha 5\beta 21$ ) y heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs), sintetizados principalmente por podocitos. El engrosamiento de la MBG se induce principalmente por la disminución en la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz extracelular) y un aumento de sus inhibidores.
- Secundario al engrosamiento de la MBG, ocurre la expansión mesangial, que es el incremento de proteínas de la matriz extracelular de las células mesangiales (colágeno tipo IV, V y VI, lamininas y fibronectina), seguido de la hipertrofia celular.

- Por ultimo hay una disminución en el número de podocitos, que puede ser consecuencia de diferentes mecanismos, siendo los más importantes:
  - Inhabilidad de proliferar y restauración frente a un insulto.
  - Desprendimiento de los podocitos de la MBG y de los capilares intraglomerulares. Posiblemente por la pérdida de sus procesos podálicos.
  - Inducción de apoptosis.<sup>13</sup>

Estas alteraciones comprometen el proceso de filtración, que a su vez define la evolución del daño renal. El estrés oxidativo y la formación de cuerpos avanzados de glicosilación (AGE's), juegan un papel determinante en las alteraciones renales inducidas por diabetes.<sup>14</sup>



**Figura 5.** Cambios glomerulares característicos en diabetes. Modificado de Jefferson et al. (2008)<sup>14</sup>.

### 2.2.3. Cuerpos avanzados de glicosilación: AGE's

Los AGE's son macromoléculas formadas no enzimáticamente. En diabetes hay altas concentraciones de glucosa en sangre, permitiendo su interacción con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (se glicosilan) formando los AGE's. Los AGE's se forman extracelularmente por glucosa e intracelularmente por dicarbonilos. Los AGE's extracelularmente interaccionan con sus receptores RAGE, y con otras proteínas de unión como OST-48, 80k-H y galectina-3 e inducen varios eventos intracelulares.  
15, 16

### 2.2.4. Los AGE's y los podocitos.

En el podocito se ha descrito la expresión del RAGE. Una vez que los AGE's se unen a su receptor RAGE, se activan la NADPH oxidasa, PKC, factores de transcripción NF- $\kappa$ B, y hay aumento de la actividad de factores de crecimiento como TGF- $\beta$  entre otros. También promueve alteraciones en la expresión de matriz extracelular (MEC), principalmente de colágeno I y IV y la expresión de proteínas apoptóticas como FOXO4 y BIM. Todo esto induce el aumento en el estrés oxidativo y la expansión de la matriz extracelular de los podocitos generando el engrosamiento de MBG y el despegamiento y apoptosis del podocito. Esto tiene como consecuencia la reducción en el número de podocitos en el glomérulo y el desarrollo del daño renal.<sup>17,18</sup>

### 2.3. Gas1

Gas1 (Growth Arrest Specific protein 1) es una proteína de 37 kDa, que tiene 345 aminoácidos. Estructuralmente está conformada principalmente por  $\alpha$ -hélices. Algo característico es que en su dominio carboxilo terminal tiene una hoja  $\beta$ -plegada. Es una proteína de membrana extracelular (anclada a la membrana por su fracción glicosilfosfatidilinositol). Tiene una homología del 76% entre humano y murino. Se expresa en el sistema nervioso, el pulmón, el músculo esquelético, la glándula mamaria, la próstata, las células endoteliales y el riñón.

Gas1 participa en la inhibición del ciclo celular, principalmente en la transición de la fase G0 a la fase S. Se conoce su actividad como agente proapoptótico, especialmente en neuronas del hipocampo.<sup>19</sup> Se ha mostrado previamente que Gas1 actúa como co-receptor en la vía de Hedgehog (HH), por la cual inhibe la proliferación celular, al inhibir ciclinas D1 y D2 (mecanismo que aún no ha sido totalmente caracterizado).<sup>20</sup> Adicionalmente, se conoce que Gas1 interviene en la vía del GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de células Glíales), importante en la morfogénesis renal.<sup>21</sup>

Previamente se ha demostrado que Gas1 se expresa en células glomerulares, donde podría actuar como un inhibidor endógeno de la proliferación celular. Modelos experimentales de daño renal han demostrado una disminución de la expresión del mRNA de Gas1.<sup>22</sup>

Recientemente se describió la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman (Dr. Pablo Benito Bautista García, datos no publicados) y un hallazgo reciente de nuestro laboratorio mostró que durante las fases tempranas de un modelo de diabetes experimental en rata, disminuye la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman.

---

Es probable que la disminución de Gas1 en la CB favorezca la activación y diferenciación de células progenitoras renales, las cuales podrían participar en el reemplazo de los podocitos durante la evolución de la nefropatía diabética.

### 3. Justificación

La nefropatía diabética es una de las complicaciones de la diabetes. Produce una disfunción de la unidad de ultrafiltración glomerular conduciendo al desarrollo de albuminuria e insuficiencia renal crónica. La patogénesis renal en la diabetes es compleja y los mecanismos que intervienen están pocos dilucidados. Sin embargo, se ha descrito que induce despegamiento, hipertrofia, transformación epitelio-mesénquima y apoptosis de los podocitos.<sup>23-25</sup> La disfunción y apoptosis de los podocitos, definen la progresión del daño renal.<sup>4</sup>

El papel de GAS1 no ha sido descrito en el riñón. Sin embargo, se ha observado la expresión de GAS1 en la cápsula de Bowman y en túbulo distal (Dr. Pablo Benito Bautista García, datos no publicados).

Se tiene evidencia de que en el glomérulo, específicamente en la cápsula de Bowman, existe una sub-población de células progenitoras renales (CPR) con propiedades de auto-renovación y que posiblemente se diferencien en podocitos.<sup>9</sup> Se ha propuesto que frente a un insulto que induzca daño glomerular, caracterizado principalmente por la pérdida de podocitos, estas CPR se activan. No se sabe bajo qué mecanismos, estas células progenitoras de la cápsula de Bowman se activan y diferencian en podocitos.<sup>26</sup> Por lo tanto, en un modelo experimental de diabetes, la disminución de Gas1 en la cápsula de Bowman durante fases tempranas, podría favorecer la proliferación y/o activación de las células progenitoras, iniciando su diferenciación a podocitos para compensar la pérdida inducida por el daño renal.

#### 4. Hipótesis

Debido a que Gas1 podría inhibir la proliferación y diferenciación de las células progenitoras en la cápsula de Bowman, es posible que la disminución de la expresión de Gas1 durante las fases tempranas de la diabetes, favorezcan la activación de las células progenitoras, facilitando el reemplazo de podocitos perdidos durante la evolución de la nefropatía diabética.

#### 5. Objetivos

##### 5.1 Objetivo general.

Evaluar si la disminución en la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman favorece la activación de células progenitoras epiteliales glomerulares en un modelo de rata diabética.

##### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar si la disminución en los niveles de expresión de Gas1 favorece la aparición de CD24 y NCAM, marcadores de células progenitoras en la cápsula de Bowman.
- Evaluar si la disminución en los niveles de Gas1 favorece la expresión de proteínas embrionarias renales en la cápsula de Bowman como PAX2.
- Evaluar si la disminución de Gas1 inhibe la pérdida de podocitos en un modelo de diabetes experimental murina.

## 6. Materiales y Reactivos

### 6.1. Reactivos.

#### 6.1.1. Inducción de diabetes experimental.

- Estreptozotocina Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Citrato de Sodio No. catálogo 3646 J.T. BAKER (Center Valley, PA, U.S.A).

#### 6.1.2. Cuantificación de proteínas por método de Lowry

- DC Protein Assay Reagent S No. Catálogo #500-0115 BIO-RAD (México, D.F).
- DC Protein Assay Reagent A No. Catálogo #500-0113 BIO-RAD (México, D.F).
- DC Protein Assay Reagent B No. Catálogo #500-0114 BIO-RAD (México, D.F).

#### 6.1.3. Cuantificación de creatinina por el método de Jaffé.

- Solución Estándar de creatinina.
- Solución de NaOH 0.75 N
- Solución de Ac. Pícrico al 0.04 M
- Solución de Ac. Tricloroacético (TCA) al 35%.

#### 6.1.4. Anticuerpos Primarios

- PAX2 anti-conejo No. Catálogo 71-600 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- NCAM anti-cabra No. Catálogo Sc-1507 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

- WT-1 anti-conejo No. Catálogo Sc-192 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Gas1 anti-conejo ProSci (Poway, CA, USA).
- Ac-Histona H4 anti-conejo No. catálogo Sc-34263 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Dendrina anti-cabra No. catálogo Sc-167616 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- CD24 anti-ratón No. catálogo 551133 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
- Nefrina anti-cabra Sc-19000 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

#### 6.1.5. Anticuerpos secundarios.

- Alexa Fluor 594 pollo anti-conejo Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Alexa Fluor 488 burro anti-cabra. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### 6.2. Materiales.

- Centrifuga No. Catálogo 541712 Eppendorf
- Centrifuga G5-GR BECKMANK
- Mini-trans Blot cell No. Catálogo 153BR BIO-RAT
- Fuente de poder para WB Power Pat 200 BIO-RAT.
- Potenciómetro No. 41 BECKMANK
- Agitador No. Catálogo 65904 MagMix
- Vortex M16715 Barstead Thermolyne International.
- Cubre y portaobjetos Carnin
- Jaula metabolica y de diuresis 3700M022 TECNIPLAST

## 7. Metodología

### 7.1. Animales experimentales.

Se utilizaron ratas hembras Wistar (n=20) con peso de 200-250g, que se mantuvieron con ciclos de 12/12 h luz/oscuridad a una temperatura de  $22 \pm 1$  °C y  $50 \pm 5\%$  de humedad. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum*. Se dividieron en dos grupos: grupo control (n=5) y grupo experimental (n=15). Al grupo experimental se le indujo diabetes tipo 1, mediante la administración intravenosa de estreptozotocina (STZ) en una dosis de 60 mg/Kg<sup>27,28</sup>, diluida en amortiguador de citrato de sodio (pH 6.0). Al grupo control únicamente se le administró por vía intravenosa citrato de sodio. Después de 3 días, se midió la concentración de glucosa en sangre con el glucómetro OneTouch Ultra (Milpitas, CA, USA), para confirmar la inducción de diabetes. Los grupos experimentales, posterior a la inducción de diabetes, fueron sacrificados a la primera, segunda y tercera semana respectivamente.

### 7.2. Cuantificación de proteínas urinarias por el método de Lowry.

Los animales se aislaron en jaulas metabólicas por 24 h, antes de su sacrificio para obtener muestras de orina. En una caja multipozos, se depositaron 10 µl de muestra de orina de cada grupo (dilución 1:10), más 25 µl del reactivo A+S y 200 µl del reactivo B. Para el desarrollo de color, las muestras se incubaron por 15 minutos, al resguardo de la luz. La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose , CA, USA) a 650-750 nm.

### 7.3. Cuantificación de creatinina por método de Jaffé.

#### 7.3.1. Cuantificación de creatinina en suero.

Preparación de muestras de suero (precipitación de proteínas). En un tubo Eppendorf de 0.6 ml, se adicionaron 20 µl de suero (grupo control y experimental.), 260 µl de agua desionizada, 20 µl de TCA al 35%, se agitan y se centrifugan a 3500 rpm por 10 minutos, se recupera el sobrenadante. Para el desarrollo de color, se ocupó una caja multipozos y se adicionan 125 µl de muestra (sobrenadante), 50 µl de Ác. pícrico y 50 µl de NaOH. Se deja reposar 20 minutos (evitando contacto con la luz). La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose , CA, USA) a 650-750 nm.

#### 7.3.2. Cuantificación de creatinina en orina.

En una caja multipozos, se depositaron 250 µl de muestra de orina de cada grupo (dilución 1:100) y se adicionan 100 µl de Ác. pícrico y 100 µl del NAOH. Para el desarrollo de color, las muestras se incubaron por 20 minutos, al resguardo de la luz. La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose , CA, USA) a 520 nm.

### 7.4. Tejido renal.

Se obtuvieron los riñones de los grupos control y diabéticos. Los riñones se decapsular y se removió la corteza. La corteza renal se depositó en solución Ringer-Krebs Bicarbonato.

### 7.5. Aislamiento de Glomérulos totales.

Una vez que se obtuvo la corteza renal, se realizó un homogenado. El homogenado se tamizó por una malla de No. 120 y se lavó con Ringer Krebs bicarbonato frío, la suspensión obtenida se tamizó por una malla de No. 220, los residuos que quedaron en la malla se lavaron con Riger Krebs, obteniéndose la suspensión glomerular. Esta suspensión se centrifugó por 15 minutos (menor a 1000 RPM). Se remueve el sobrenadante y se resuspenden los glomérulos con RIPA por 30 min. Previamente se sónica y se centrifuga por 15 minutos (14000 RPM), se recupera el sobrenadante y se almacena a -70°C.

### 7.6. Análisis por Western Blot.

El análisis por WB se realizó como se ha descrito previamente.<sup>29</sup> Las muestras de glomérulos totales de los grupos control y diabéticos fueron preparadas en una dilución de 1:5 en Laemmli 5X con urea (5M). Cada muestra contenía 80 µg de proteína. Se desnaturalizaron las muestras mediante ebullición por 12 min. Las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% y se corrieron a 70 V por 3 h. El Estándar de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, -USA), se corrió en paralelo. Las proteínas fueron transferidas a membrana de fluoruro de polivinilideno (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Para bloquear la unión inespecífica de las proteínas, se incubaron las membranas con caseína 3X (VECTOR, sp-5020; Burlingame, CA, USA) 1h, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario NCAM, Gas1, histona H4, dendrina, nefrina, CD24 y PAX2 (dilución 1:500). Respectivamente dendrina, nefrina, histona H4 y CD24 fueron incubadas con HRP anti-cabra, conejo y ratón por 1 h y Gas1, NCAM y PAX2 se incubaron

con biotinilado anti-conejo y anti-cabra por 20 minutos, posteriormente a los lavados se utilizaron los reactivos para detección de WB ECL (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La quimioluminiscencia se detectó en el sistema de imagen EC3 (UVP, Bioluminescence Systems, Cambridge, UK). La densidad de las banda de cada proteína se cuantificó por transmitancia densitométrica (UVP Bioluminescence Systems Software).

#### 7.7. Criopreservación del Tejido.

Las muestras de riñón se prepararon para inmunofluorescencia como se ha descrito previamente <sup>29</sup>. Se realizaron rebandas de 0.5-0.7 cm de ancho inmediatamente se incubaron en 2-metilbutano (Aldrich M3, 263-1; Milwaukee, WI, US) por 1 minuto a temperatura ambiente y 5 minutos en nitrógeno líquido. Las rebanadas se guardaron en papel aluminio perfectamente etiquetado y se almacenaron en nitrógeno líquido (las muestras son viables hasta por 6 meses).

#### 7.8. Inmunofluorescencia

De las muestras de riñón criopreservadas, se realizaron rebandas de 8 µm de grosor en el criostato Leica CM150 (Wetzlar, Germany) y se montaron en portaobjetos gelatinizados y se almacenaron a -70°C.

##### 7.8.1. Inmunofluorescencia por método de citrato de Sodio.

Los cortes se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron 20 minutos en citrato de sodio 10 mM pH 6.0 a temperatura de 80-90°C durante 20 minutos y 20 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizó con PBS+ TWEEN 20 1X (Sigma- Aldrich, p-7949; St. Louis, MO, USA) por 10 minutos y se bloqueó

con albumina libre de IgG (Research Organics, 1331-A; Cleveland, OH, USA) por 1h a temperatura ambiente. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti GAS1, NCAM, dendrina (dilución 1:50). Se usaron anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 pollo anti-conejo y Alexa Fluor 488 burro anti-cabra.(dilución 1:100). La inmunofluorescencia se evaluó usando el microscopio confocal (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Alemania).

#### 7.8.2. Inmunofluorescencia por fijación con metanol.

Los cortes de fijaron con metanol durante 10 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se permeabilizó con 1% de Triton 100-X por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se bloqueó con albumina libre de IgG (Research Organics, 1331-A; Cleveland, OH, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario NCAM, PAX2 y WT1 (dilución 1:50). Se usaron anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 pollo anti-conejo y Alexa Fluor 488 burro anti-cabra (dilución 1:100). La inmunofluorescencia se evaluó usando el microscopio confocal (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Alemania).

#### 7.9. Análisis de datos

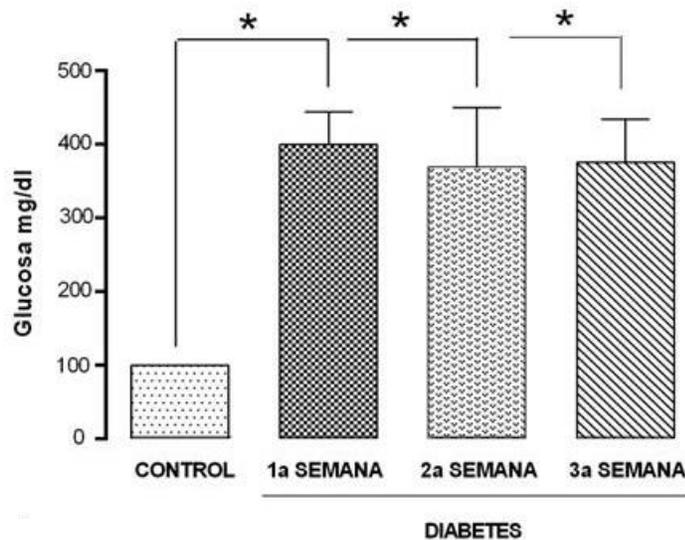
Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Para la comparación de grupos múltiples se empleó el análisis de varianza (ANOVA). Una  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa. La prueba de Dunnett se empleó como prueba post-hoc.

## 8. Resultados

### 8.1. Modelo de diabetes en ratas.

En este proyecto se utilizaron ratas diabéticas inducidas por la administración de STZ. Para comprobar si los grupos experimentales mantenían altas concentraciones de glucosa, se evaluaron índices glucémicos tanto del grupo control como de los grupos experimentales.

Los grupos experimentales de 1, 2 y 3 semanas con diabetes, mantienen índices hiperglucémicos en promedio de 400 mg/dL en comparación con el grupo control (**Gráfica 1**).

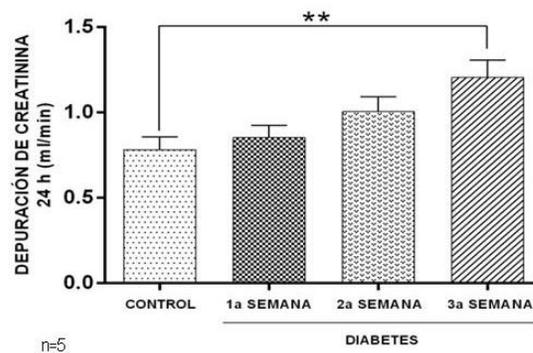


**Gráfica 1.** Niveles de glucosa en sangre del grupo control y de los grupos experimentales de 1, 2 y 3 semanas con diabetes. Grupo control (administración de amortiguador de citrato de Sodio 500  $\mu$ l i.v.). Grupo experimental (administración de STZ 60 mg/kg + citrato de sodio 500  $\mu$ l i.v.). n=5, \* p<0.05

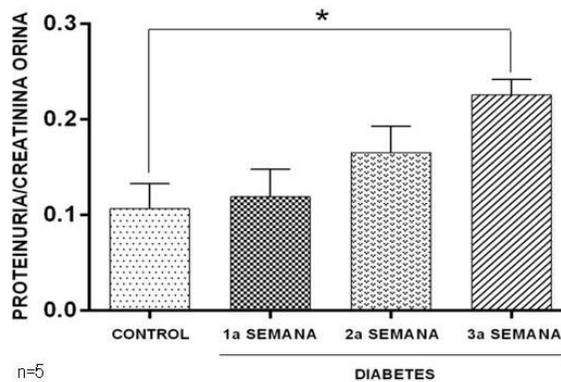
## 8.2. Pruebas de función renal.

Para evaluar el efecto de la diabetes sobre la función renal, realizamos pruebas como depuración de creatinina y proteinuria.

Al realizar ambas pruebas, se observó que en el grupo experimental de 3 semanas con diabetes, aumenta la depuración de creatinina y la proteinuria en comparación con el grupo control (**Gráficas 2 y 3**), sugiriendo que la diabetes induce disfunción renal a la tercera semana de la administración de STZ.



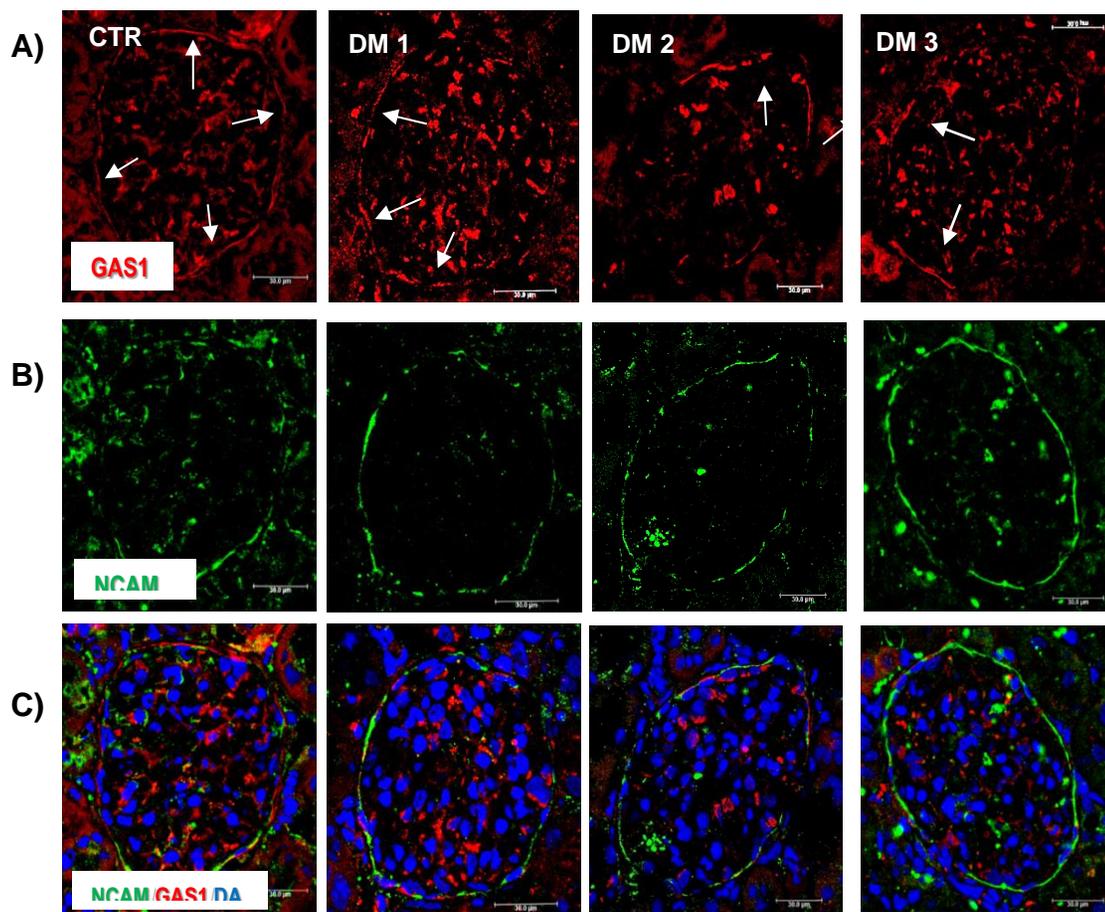
**Gráfica 2.** Depuración de creatinina. n=5, \*\*p<0.01.



**Gráfica 3.** Proteinuria corregida con creatinina en orina. n=5, \*p<0.05.

### 8.3. Expresión de Gas1 y NCAM en las CP de la cápsula de Bowman.

Se evaluó la expresión de Gas1 y NCAM mediante IMF en las CP de la cápsula de Bowman.



**Figura 6.** Expresión de Gas1 y NCAM en células de la cápsula de Bowman. **A)** Expresión de Gas1 (rojo) en grupo control, 1 ,2 y 3 semanas con diabetes en la cápsula de Bowman. Flechas blancas indican la expresión de Gas1 en la Cápsula de Bowman.. **B)** Expresión de NCAM (verde) en grupo control, 1 ,2 y 3 semanas con diabetes en la cápsula de Bowman. **C)** Merge. Gas1 (rojo) + NCAM (verde) + DAPI (azul, núcleos).

NCAM es una proteína de 130 KDa que se expresa en el sistema nervioso central (SNC) y en el riñón. En el SNC, NCAM induce la diferenciación neuronal entre otras funciones.<sup>30</sup> Recientemente se ha descrito su expresión en el glomérulo y se ha postulado como marcador de células progenitoras.<sup>9</sup> Además, NCAM participa en el desarrollo renal.<sup>31</sup>

Gas1 se expresa homogéneamente en la CB en el grupo control pero su expresión disminuye gradualmente en las células de la CB en los grupos experimentales de 1, 2 y 3 semanas con diabetes (**Figura 6-A**). Se observó expresión de Gas1 en la parte visceral del glomérulo. En contraste la expresión de NCAM en el grupo control es heterogénea en la CB pero hay un aumento progresivo en su expresión en la CB en la primera, segunda y tercera semana de diabetes (**Figura 6-B**).

### 8.3.1. Expresión de Gas1 y NCAM por WB.

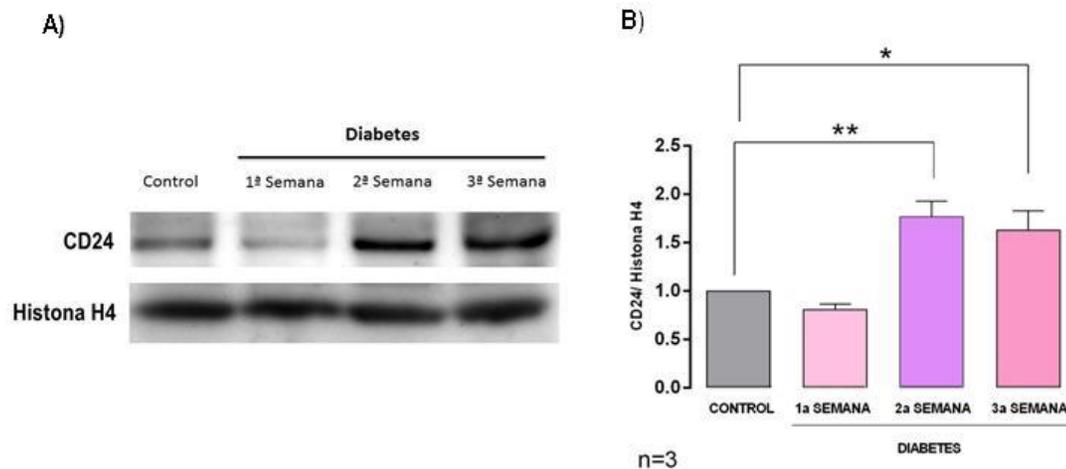
Se analizó la expresión de Gas1 y NCAM por WB en glomérulos totales (Figura 7). Gas1 disminuye su expresión en la primera semana, se restablece en la segunda semana y aumenta en la tercera semana. Por otro lado NCAM, disminuye su expresión en el grupo de primera y segunda semana con diabetes y se restablece en la tercera semana. En este experimento se analiza la expresión de ambas proteínas no solo en células de la CB, sino en las demás células que constituyen al glomérulo.



#### 8.4. Expresión de CD24 en la cápsula de Bowman.

Se evaluó la expresión por WB de CD24, marcador de células progenitoras renales,<sup>32</sup> en glomérulos totales.

CD24 se expresa en el grupo control, en el grupo diabético de una semana hay una tendencia a la disminución de la expresión CD24, por el contrario en los grupos experimentales de dos y tres semanas con diabetes, CD24 se observa la sobreexpresión de CD24.



**Figura 8.** Expresión de CD24 por WB. **A)** Imagen representativa del WB de CD24. **B)** Densitometría de WB de CD24. n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

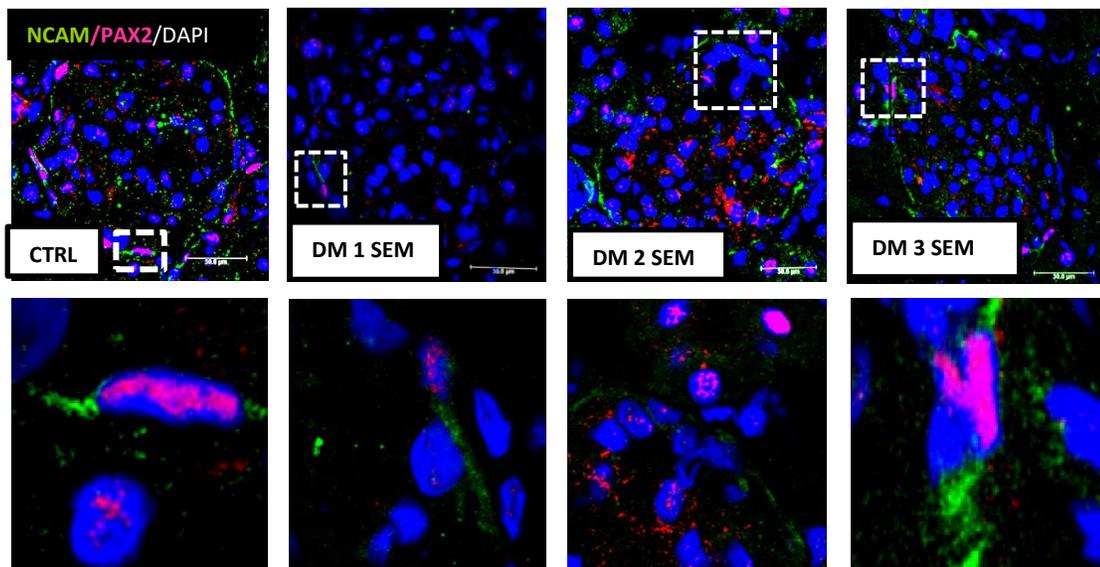
Estos resultados sugieren que, la diabetes favorece la disminución de la expresión de Gas1 en células de la cápsula de Bowman y que esta disminución de Gas1 favorece la activación de las células progenitoras de la CB, al haber un aumento en la expresión de NCAM y CD24.

### 8.5. Reprogramación de células progenitoras renales.

Una vez que las células progenitoras renales se activan, sufren un proceso de desdiferenciación, en el cual las CPR adquieren un fenotipo embrionario (mesenquimal), para posteriormente diferenciarse a determinado tipo celular, en este caso a podocitos.<sup>33</sup>

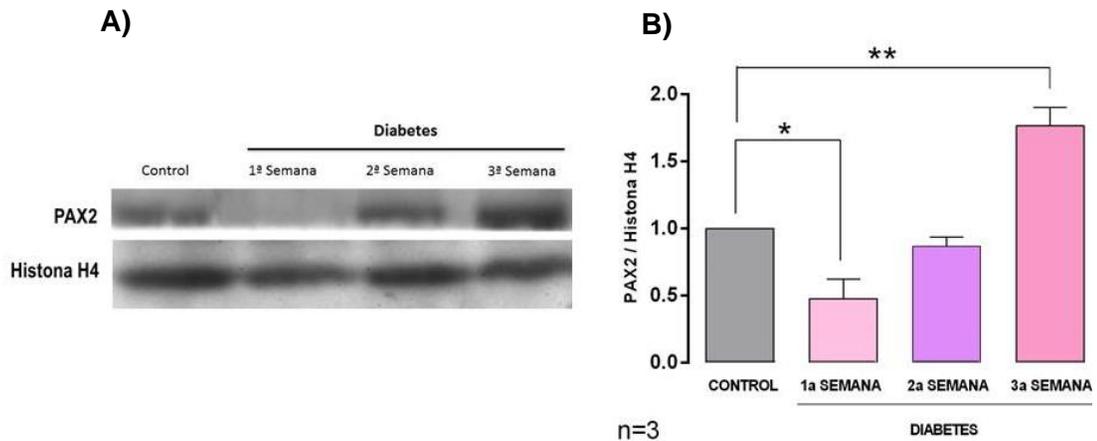
Por tal motivo, evaluamos la expresión de PAX2, una proteína nuclear,<sup>34</sup> que se expresa en las células parietales de la cápsula de Bowman<sup>7</sup> y que se expresa durante la nefrogénesis.<sup>35</sup> Analizamos su expresión por IMF y WB.

En la IMF, observamos en el grupo control algunas células parietales de la cápsula de Bowman PAX2<sup>+</sup>, en la primera semana con diabetes PAX2 disminuye su expresión y en la segunda y tercera semana con diabetes la expresión se restablece (**Figura 9**).



**Figura 9.** Expresión de PAX2 en células de cápsula de Bowman. PAX2 (rosa) + NCAM (verde) + DAPI (azul) en grupo control, y grupos diabéticos de 1, 2 y 3 semanas. Recuadros blancos indican acercamientos.

En WB, en el grupo control hay expresión de PAX2, en la primera semana de diabetes disminuye y en la segunda semana de diabetes se restablece su expresión y en la tercera semana aumenta la expresión de PAX2.



**Figura 10.** Análisis por WB de PAX2. **A)** Imagen representativa del WB de Pax2. **B)** Densitometría de WB de PAX2. n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

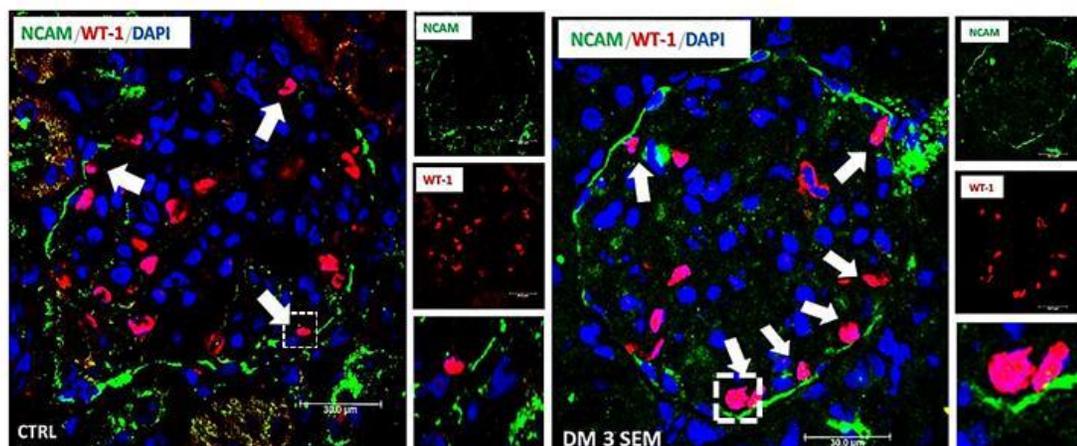
Estos resultados sugieren que la diabetes favorece la activación de CPR y que estas se reprograman embrionariamente para después diferenciarse posiblemente a podocitos.

### 8.6. Expresión de WT-1 en células de la cápsula de Bowman.

Para poder conocer si hay CPR que se están diferenciando a podocito, analizamos la expresión de WT-1. WT-1 es una proteína nuclear específica del podocito, es un factor de transcripción importante durante el desarrollo del riñón. Regula positivamente la expresión de nefrina. Aunque es una proteína nuclear se puede observar en el citoplasma en un 10-25% de las células.<sup>36</sup>

Evaluamos la expresión de WT-1 en ratas control y en ratas diabéticas de 3 semanas. En el grupo control, se observan algunas células parietales de la cápsula de Bowman WT-1<sup>+</sup> pero en el grupo de diabetes de 3 semanas, se observa un número mayor de células parietales WT-1<sup>+</sup> en comparación con el control (**Figura 11**).

Estos resultados sugieren que la diabetes favorece la disminución de la expresión de Gas1 y la activación y diferenciación de células progenitoras renales a podocitos.



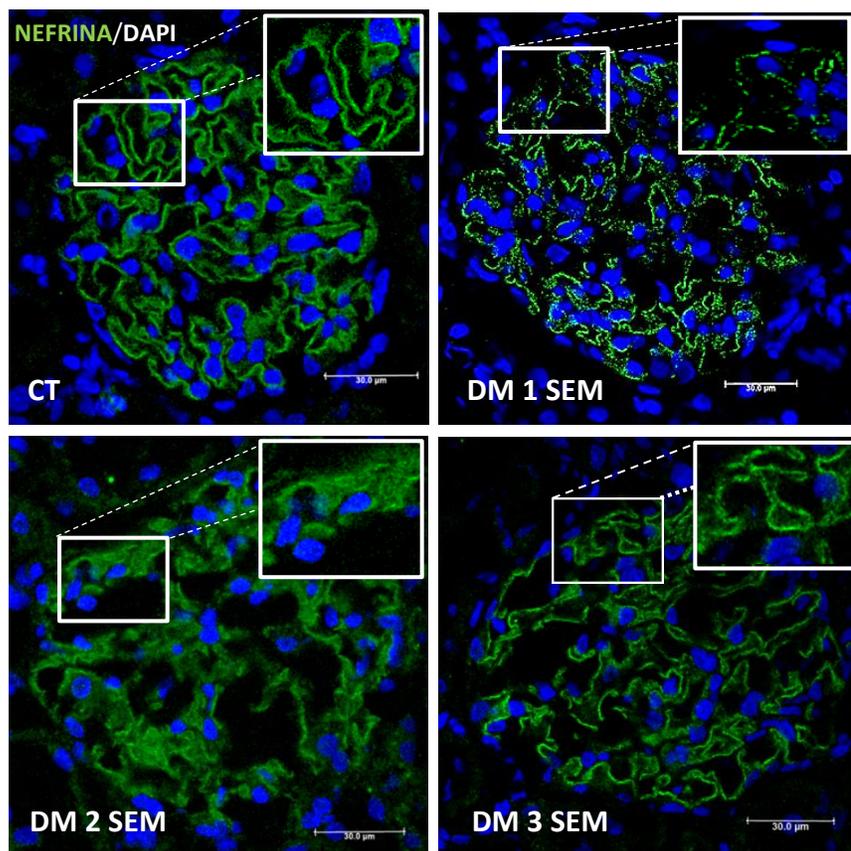
**Figura 11.** Expresión de Wt-1 en células de la cápsula de Bowman. **A)** Grupo control. NCAM (verde) + Wt-1 (rojo) + DAPI (azul). **B)** Grupo de 3 semanas con diabetes. NCAM (verde) + Wt-1 (rojo) + DAPI (azul).

### 8.7. Posible papel de las células progenitoras de la cápsula de Bowman.

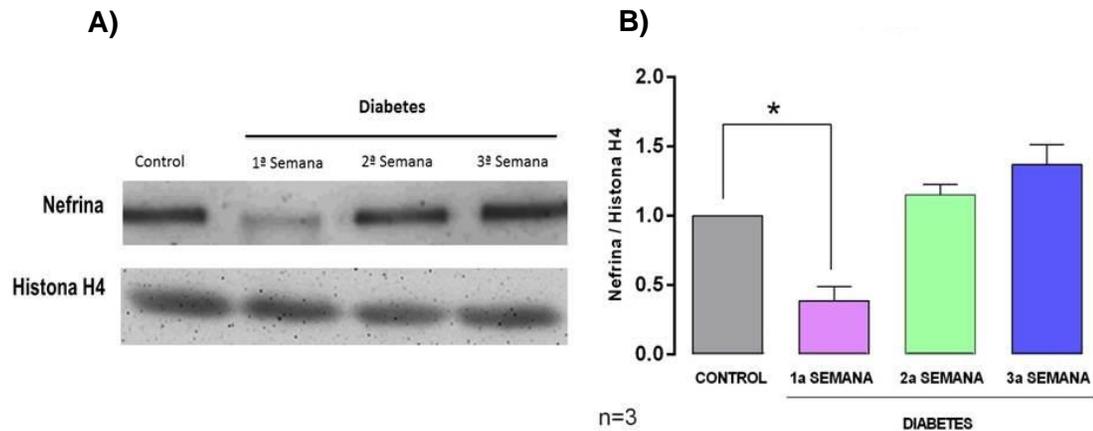
Analizamos la expresión de nefrina por WB e IMF. Nefrina es una proteína transmembranal de 180 KDa, localizada en los procesos podálicos de los podocitos. Es el mayor componente del diafragma en hendidura. Nefrina se expresa también en el sistema nervioso central y en el páncreas.

37

En la primera semana con diabetes hay una disminución de la expresión de nefrina tanto en WB como en IMF, en la segunda y tercera semana se restablece la expresión de nefrina (**Figura 12 y 13**).



**Figura 12.** Inmunofluorescencia de nefrina. Expresión de Nefrina en control y en 1, 2 y 3 semanas con diabetes. nefrina (verde) + DAPI (azul).

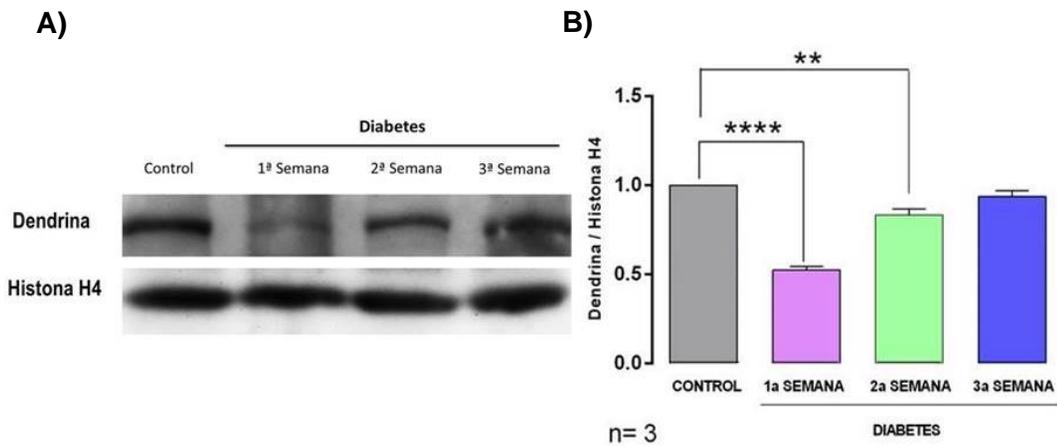


**Figura 13.** Análisis de la expresión nefrina por WB en glomérulos totales. **A)** Imagen representativa de WB. **B)** Densitometría de WB. n=3, \*p<0.05.

También se analizó la expresión por WB de dendrina. Dendrina es una proteína citosólica de 81 KDa, se ha descrito su expresión en cerebro (telencéfalo) y en riñón. En el riñón, dendrina se expresa en los podocitos e interactúa directamente con Nephrina, CD2AP y  $\alpha$ -actina, proteínas importantes para el mantenimiento del diafragma en hendidura y los procesos podocíticos de los podocitos.<sup>38</sup>

Por análisis de WB se observa que, en la primera semana de diabetes la expresión de dendrina disminuye. En la segunda semana de diabetes comienza a restablecerse y en la tercera semana la expresión de dendrina es igual que el control (**Figura 14**).

La disminución de la expresión de dendrina y nefrina en la primera semana de diabetes, se puede asociar a la pérdida de podocitos inducida por la hiperglucemia; en la segunda y tercera semana vemos que la expresión de ambas proteínas se restablece, sugiriendo que, posiblemente las CPR de la cápsula de Bowman que se activaron y se diferenciaron a podocitos, migran de la CB a la parte visceral para poder compensar la pérdida de podocitos inducida en la primera semana de diabetes.



**Figura 14.** Análisis de expresión de dendrina por WB en glomérulos totales. La dendrina es una proteína específica del podocito. **A)** Imagen representativa de WB. **B)** Densitometría de WB. n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

## 9. Discusión

La diabetes es un desorden metabólico crónico, caracterizado por altas concentraciones de glucosa en sangre. Los índices hiperglucémicos crónicos inducen daño en tejido ocular, renal, nervioso y endotelial.<sup>39</sup> La nefropatía diabética es una de las complicaciones de la diabetes, que se caracteriza por presentar alteraciones en la nefrona, principalmente en el glomérulo.<sup>40</sup> A nivel glomerular la diabetes induce la pérdida de podocitos, células epiteliales importantes para el proceso de filtración glomerular. La pérdida de podocitos define la evolución de la nefropatía diabética.<sup>41,42</sup> Recientemente se han descrito células que expresan CD133<sup>+</sup> (marcador de células progenitoras) y CD24<sup>+</sup> (marcador de células progenitoras renales) en la cápsula de Bowman.<sup>43</sup> Estos resultados demostraron que existe una subpoblación de células progenitoras renales en la cápsula de Bowman<sup>9</sup> y se ha propuesto que frente a un insulto que induzca el daño o la pérdida de podocitos, estas células progenitoras pueden activarse y diferenciarse a podocitos para compensar la pérdida inducida por el daño.<sup>26,44</sup>

Se han descrito células de la cápsula de Bowman que únicamente tienen marca de CPR (CD24<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>), así como, células transitorias que expresan marcadores de células progenitoras y proteínas específicas del podocito (CD133<sup>+</sup> y podocalixina<sup>+</sup>) y “podocitos parietales”, células que únicamente expresan proteínas específicas del podocito (podocalixina<sup>+</sup>), estos resultados sugieren que las CPR de la cápsula Bowman tienen la capacidad de diferenciarse a podocitos.<sup>45</sup> Con todo esto, se cree que la diferenciación de células progenitoras renales (CPR) de la cápsula de Bowman a podocitos, puede ser un mecanismo de compensación frente al daño inducido por la diabetes en las etapas iniciales de la nefropatía diabética.

Uno de los cuestionamientos más relevantes sobre lo propuesto anteriormente, es conocer que es lo que activa a estas CPR de la cápsula de Bowman. Gas1 es una proteína que se expresa abundantemente en SNC,<sup>46</sup> así como en glándula mamaria, próstata y musculo esquelético, donde induce la muerte celular e inhibe la proliferación. Recientemente se ha descrito la expresión de Gas1 en tejido renal, principalmente en el glomérulo, en células mesangiales y en podocitos.<sup>22</sup> Sin embargo aún no se ha definido su función. En este proyecto se describe por primera vez la expresión de Gas1 en las células de la cápsula de Bowman. Estos hallazgos sugieren que posiblemente Gas1 participa en la activación de las CPR de la cápsula de Bowman.

Para evaluar si existe una relación entre Gas1 y las CPR, se analizó la expresión de NCAM y Gas1 por IMF. NCAM, es una proteína que se expresa durante la nefrogénesis y en etapas post natales en las células parietales de la cápsula de Bowman e interviene en procesos de diferenciación.<sup>31</sup> Estudios en el 2013, demuestran que las CPR expresan NCAM y que esta proteína interviene en la transición epitelio-mesénquima de las células, al favorecer la expresión de PAX2, SALL1, y SIX2.<sup>47</sup> Es por ello que analizamos la expresión de NCAM como marcador de células progenitoras. Se observó que, en la diabetes, la expresión de Gas1 disminuye y la expresión de NCAM aumenta en la cápsula de Bowman. La disminución de la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman puede asociarse a la expresión de miR-34a y del PDGF, pues se ha descrito que en células mesangiales en condiciones de hiperglucemia, el aumento de ambas proteínas se relaciona con la disminución de Gas1.<sup>48,22</sup>

También se evaluó por WB la expresión del marcador específico de CPR, CD24. Se ha descrito que CD24 se expresa en riñón adulto únicamente

en células de la cápsula de Bowman.<sup>9</sup> Se encontró que en la diabetes (segunda y tercera semana) aumenta la expresión de CD24 en comparación con el control. Estos resultados sugieren que la diabetes induce la disminución de la expresión de Gas1 en células de la cápsula de Bowman y que esta disminución de Gas1 favorece la activación de las células progenitoras de la CB, al aumentar la expresión de NCAM y CD24.

Se ha descrito que en el daño renal existen mecanismos de reparación como la proliferación y desdiferenciación de las CPR.<sup>33</sup> En este trabajo se analizó si las CPR sufren el proceso de desdiferenciación, es decir, si adquieren un fenotipo embrionario (mesenquimal), para posteriormente transdiferenciarse a podocito. Por tal motivo, evaluamos la expresión de PAX2, una proteína que se expresa durante el desarrollo renal.<sup>49</sup> También evaluamos la expresión de NCAM ya que su expresión favorece la transición epitelio-mesénquima y la expresión de diversos marcadores mesenquimales renales como PAX2.<sup>47</sup> Tanto en el WB como en la IMF, se observó expresión de PAX2 en condiciones normales, pero en grupos diabéticos de 2 y 3 semanas la expresión de PAX2 se restablece y aumenta respectivamente. Algo interesante y que apoya lo descrito por Dekel y colaboradores, es que las células de la cápsula de Bowman PAX2<sup>+</sup> también expresan NCAM, sugiriendo que en la diabetes la expresión de NCAM en las CPR favorece la transición epitelio- mesénquima. Con estos resultados se sugiere que Gas1 posiblemente mantiene en un estado quiescente a las CPR de la cápsula de Bowman, cuando hay una disminución de la expresión de Gas1 inducido por diabetes, estas CPR se activan y expresan NCAM, que no sólo es un marcador de células progenitoras, sino que también induce que las CPR se reprogramen embrionariamente y expresen PAX2, para posteriormente diferenciarse a podocitos.

Durante la nefropatía diabética hay pérdida de podocitos,<sup>50</sup> la cual representa un punto clave en la evolución del daño renal. Los podocitos tienen una capacidad muy limitada para dividirse *in situ*,<sup>51</sup> una pregunta que ha surgido es ¿Cómo pueden ser reemplazados los podocitos? Un mecanismo potencial para el reemplazo de podocitos, es la migración de células progenitoras de la médula ósea a través de la vía sanguínea hacia el riñón.<sup>52</sup> En este proyecto se propone que las CPR de la cápsula de Bowman son un mecanismo de compensación ante la pérdida de podocitos en la diabetes. Por tal motivo evaluamos la expresión de WT-1 (proteína específica del podocito) en la cápsula de Bowman. Encontramos que en condiciones normales hay algunas células de la cápsula de Bowman WT-1<sup>+</sup> pero en diabetes hay un número mayor de células WT-1<sup>+</sup>. Esto sugiere que la diabetes, favorece la diferenciación de CPR de la cápsula de Bowman a podocitos, para compensar la pérdida de podocitos que se presenta en esta condición.

Para conocer si la CPR son un mecanismo compensatorio ante la pérdida podocitaria, evaluamos la expresión de dendrina y nefrina, ambas proteínas del podocito, que forman parte del diafragma en hendidura, estructura importante para el proceso de filtración.<sup>53</sup> Observamos que ambas proteínas disminuyen su expresión en la primera semana de diabetes, en la segunda semana de diabetes comienza a restablecerse y en la tercera semana la expresión de ambas proteínas es igual que el control, esto sugiere, que posiblemente la disminución en la expresión de dendrina y nefrina en la 1ª semana se asocia a la pérdida de podocitos inducida por diabetes. El restablecimiento de la expresión de ambas proteínas en la segunda y tercera semana de diabetes puede sugerir que las CPR que se han diferenciado a podocitos migran de la cápsula de Bowman hacia la parte visceral del glomérulo para compensar la pérdida de podocitos.

Se ha descrito que durante el daño al podocito, este presenta un estado de “adaptación” o acondicionamiento que subsecuentemente termina en un estado de “descompensación” caracterizado por pérdida glomerular de estas células.<sup>54</sup> Para poder descartar la idea de que el fenómeno que observamos no es más que adaptación del podocito frente al daño inducido por diabetes, es importante determinar si en la primera semana de diabetes hay pérdida de podocitos o estos están en apoptosis. No se descarta la idea de que posiblemente estén ocurriendo ambos procesos, es decir, que haya pérdida de podocitos y una compensación por parte de las CPR de la cápsula de Bowman o que algunos podocitos desarrollen un estado adaptativo en condiciones diabéticas y esto se refleje en el restablecimiento en la expresión de dendrina y nefrina.

En las pruebas de proteinuria y depuración de creatinina, consideradas como una medida de la función renal, se observó un incremento gradual en los niveles de proteinuria y de creatinina, respectivamente, durante la primera y segunda semana de diabetes; sin embargo, en la tercera semana ambos parámetros aumentaron significativamente en comparación con el control. Estos resultados se relacionan con estudios previos, en donde se describe que la nefropatía diabética se caracteriza por el aumento en la excreción urinaria de proteínas y el desarrollo de hiperfiltración, factores importantes en el daño renal en etapas tempranas.<sup>14, 55,56</sup>

## 10. Conclusiones

En este estudio se describió la expresión de Gas1 en la cápsula Bowman. La hiperglucemia favorece la disminución de la expresión de Gas1 y la activación de células progenitoras parietales (aumento de la expresión de NCAM<sup>+</sup> y CD24<sup>+</sup>), así como, la expresión de células WT1<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman.

Estos resultados sugieren que la pérdida de Gas1 favorece la activación de células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman y que éstas, posiblemente se podrían diferenciar a podocitos, al adquirir marcadores específicos (WT1<sup>+</sup>) de estas células glomerulares.

## 11. Perspectivas

- Evaluar la expresión de Gas1, NCAM, CD24, PAX2 y WT1 en las células de la cápsula de Bowman, en grupos de 4, 5 y 6 semanas con diabetes.
- Evaluar si la disminución en los niveles de Gas1 favorece la expresión de componentes de la vía GDNF/Ret en células de la cápsula de Bowman.
- Determinar si las células de la cápsula de Bowman están proliferando, específicamente las células progenitoras renales.
- Conocer el mecanismo por el cual disminuye la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman.
  - Posiblemente sea a través de la expresión de microRNA (mir34a) en diabetes.
  - Mediante la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, PDGF, por platelet derived growth factor) en diabetes.
- Determinar que los podocitos que se observan en diabetes son de nueva generación (ensayos BrdU).

## 12. Bibliografía

1. Gal Iglesias, B. Fisiología renal. En: B. Gal Iglesias, M. López Gallardo, M. I. Martín Velasco, & J. Prieto Montalvo. Bases de la Fisiología. Ed. Tébar, 2007. Págs. 320-356.
2. Kidney Health Care (KHC). Mangusan D. The Nephron - Structure and Function of the Nephron. Recuperado de <http://www.kidneyhealthcare.com/2010/12/nephron-structure-function-nephron.html> el 12 de Octubre del 2014
3. Arévalo Gómez, M. A. El riñon normal: Anatomía e Histología. En: L. Hernando Avendaño, P. Aljama García, M. Arias Rodríguez, C. Caramelo Díaz, J. Egido de los Rios, & S. Lamas Peláez. Nefrología Clínica. Editorial Medica Panamericana, 2008. Págs. 6-8.
4. Reiser J, Server S. Podocyte Biology and Pathogenesis of Kidney Disease. Annu. Rev. Med. 2013; 64: 357-366.
5. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. Physiol Rev. 2003;83: 253–307.
6. Gordillo Paniagua, G., Exeni, R., & de la Cruz, J. (2009). Nefrología pediátrica. Barcelona, España.:ELSEVIER.
7. Shankland SJ, Andersb HJ, Romagnani P. Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2013; 22(3):302-309.

8. Onse T, Pippin W, Chang AM, Krofft RD, Miner JH, Vaughan MR, Shankland SJ. The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review, *Kidney International*. 2009; 76:1225-1238.
9. Benigni A, Morigi M, Rizzo P, Gagliardini E, Rota C, Abbate M, Ghezzi S, Remuzzi A, Remuzzi G. Inhibiting Angiotensin-Converting Enzyme Promotes Renal Repair by Limiting Progenitor Cell Proliferation and Restoring the Glomerular Architecture. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(2):628-637
10. Organización Mundial de la Salud (OMS). Diabetes. Nota descriptiva N° 132. Octubre 2013. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> el 16 de Octubre del 2014.
11. González-Chávez A. Nefropatía diabética. Hospital general de México.
12. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2013/diabetes0.pdf> el 16 de Octubre de 2014.
13. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte Biology and Response to Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:3005–3015.
14. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint. *Kidney International*. 2008;74:22-36.

15. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. Diabetic nephropathy: Mechanisms of renal disease progression. *Experimental Biology and Medicine*. 2008; 233(1):4-11.
16. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289:645–659.
17. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'agati V. Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 200;11:1656–1666.
18. D'Agati V, Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: Roles in podocytes and endothelial cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009;21(1):50-56.
19. Domínguez-Monzón G, González-Ramírez R, Segovia J. Molecular Mechanisms of Action of Gas1 and its Possible Therapeutic Applications. *Current Signal Transduction Therapy* 2011; 6: 106-112.
20. Martinelli D. C, Fan Chen-Ming. The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle* 2007; 6: 21, 2650-2655.
21. Costantini, F, Shakya R. GDFN/Ret signaling and the development of the kidney. *BioEssays* 2006; 28: 117-127.

- 
22. Van Roeyen CRC, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayam Y, Fleckenstein S, Cohen CD, Eitner F, Grone JH, Ostendorf T, Ludwig A, Floege J. Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney International*. 2013; 83:251–263.
23. Menini S, Iacobini C, Oddi G, Ricci C, Simonelli P, Fallucca S et al. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rat with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia* 2007; 50: 2591-2599.
24. Reidy K, Susztak K. Epithelial-mesenchymal transition and podocyte loss in diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 590-593. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D et al. Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 653-664.
25. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D et al. Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 653-664.
26. Romagnani P, Lasagni L. Glomerular Epithelial Stem Cells: The Good, The Bad, and The Ugly. *J Am Soc Nephrol* 2012; 2: 1612-1619.
27. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, Mofidian SMA and Rad BL. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2007;22(2):60-64.

- 
28. Szkudelski T. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B cells of the Rat Pancreas. *Physiol.* 2001;50:536-546.
29. Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martín D, Namorado MC, Calderón-Salinas JV, Reyes JL. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol. Lett.* 2009;191:279-288.
30. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E. NCAM-Induced Intracellular Signaling Revisited. *Journal of Neuroscience Research.* 2008; 86(4):727–743.
31. Abbate M, Brown D, Bonventre JV. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol.* 1999;277(3 ):454-463.
32. Challen GA, Martinez G, Davis MJ, Taylor DF, Crowe M, Teasdale RD, Grimmond SM, Little MH. Identifying the Molecular Phenotype of Renal Progenitor Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2344–2357.
33. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet.* 2010; 375:1310–17.
34. Dressler GR, Woolf AS. Pax2 in development and renal disease. *Int. J. Dev. Biol.* 1999; 43:463-468.
35. Vainio S, Yanfeng Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3: 533-543.

- 
36. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(2):196-201.
37. Sekulic M, Sekulic SP. A Compendium of Urinary Biomarkers Indicative of Glomerular Podocytopathy. *Pathology Research International*. 2013;2013):1-18.
38. Dunér F, Patrakka J, Xiao Z, Larsson J, Vlamis-Gardikas A, Pettersson E, Tryggvason K, Hultenby K, Wernerson A. Dendrin expression in glomerulogenesis and in human minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 2504–2511.
39. Owolabi OJ, Omogbai EKI. Effect of Metformin on Potassium-adapted and Nonadapted. Diabetic Rats. *Trop J Pharm Res*. 2012; 11(5): 747-752.
40. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature clinical practice ENDOCRINOLOGY & METABOLISM*. 2008; 4 (8):444-452.
41. Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P. Is Podocyte Injury Relevant in Diabetic Nephropathy? Studies in Patients With Type 2 Diabetes. *DIABETES*. 2003;52:1031-1035.
42. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte Loss and Progressive Glomerular Injury in Type II Diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;99 (2):342–348.

- 
43. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17: 2443–2456.
44. Grahammer F, Wanner N, Huber TB. Podocyte Regeneration Who Can Become a Podocyte? *The American Journal of Pathology.* 2013; 183(2):333-335.
45. Smeets B, Angelotti ML, Rizzo P, Dijkman H, Lazzeri E, Mooren F, Ballerini L, Parente E, Sagrinati C, Mazzinghi B, Ronconi E, Becherucci F, Benigni A, Steenbergen E, Lasagni L, Remuzzi G, Wetzels J, Romagnani P. Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(12):2593-603.
46. Zarco N, Bautista B, Cuéllar M, Vergara P, Flores-Rodríguez P, Aguilar-Roblero R, Segovia J. Growth Arrest Specific 1 (GAS1) Is Abundantly Expressed in the Adult Mouse Central Nervous System. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2013;61(10):731–748.
47. Buzhor E, Omer D, Harari-Steinberg O, Dotan Z, Vax E, Pri-Chen S, Metsuyanin S, O Pleniceanu, Goldstein RS, Dekel B. Reactivation of NCAM1 Defines a Subpopulation of Human Adult Kidney Epithelial Cells with Clonogenic and Stem/Progenitor Properties. *The American Journal of Pathology.* 2013;183(5):1621-1633.

- 
48. Zhang L, He S, Guo S, Xie W, Xin R, Yu H, Yang F, Qiu J, Zhang D1, Zhou S, Zhang K. Down-regulation of miR-34a alleviates mesangial proliferation in vitro and glomerular hypertrophy in early diabetic nephropathy mice by targeting GAS1. *J Diabetes Complications*. 2014; 28(3):259-264.
49. Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, French Ma, Tsai RWS. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int. J. Dev. Biol*. 2002;46: 535-544.
50. Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, Kim JJ, Yoo TH, Ryu DR, Han SH, Choi HY, Lee JE, Moon SJ, Kim DK, Han DS, Kang SW. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2007;72:36–42.
51. Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18( 6):8–13.
52. Vigneau C, Zheng F, Polgar K et al. Stem cells and kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15: 238–244.
53. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International*. 2006;69: 2131–2147.
54. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney International*. 2007; 71:1205–1214.
55. Ruth C, Campbell MD, Piero Ruggenenti MD, Giuseppe Remuzzi MD. Proteinuria in diabetic nephropathy: Treatment and evolution. *Current Diabetes Reports* 2003; 3:6:497-504.
-

56. Meeme A, Kasozi H. Effect of glycaemic control on glomerular filtration rate in Diabetes Mellitus patients. *African Health Sciences*. 2009;9(1):23-26.