

**Cinvestav**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**EL ESTRÉS OXIDANTE Y LA ALDOSTERONA REGULAN A LAS  
PROTEÍNAS DE LA UNIÓN ESTRECHA EN LA NEFROPATÍA  
DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

Que presenta:

**M. en C. EDUARDO MOLINA JIJÓN**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de tesis:

Dr. José Luis Reyes Sánchez

México, D.F.

julio de 2015

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Reyes Sánchez del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) en la unidad Zacatenco.

El comité tutorial que asesoró el presente proyecto estuvo conformado por:

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav.

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav.

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. José Pedraza Chaverri. Facultad de Química, UNAM.

Se agradece la asesoría técnica de los auxiliares de investigación: Dr. Rafael Rodríguez Muñoz y QFB. María del Carmen Namorado Tónix

Mis estudios de doctorado fueron apoyados con la beca 255413 otorgada por el Conacyt.

## Resumen

La nefropatía diabética (ND) constituye una de las principales complicaciones microvasculares de la diabetes. La unión estrecha (UE) regula la permeabilidad paracelular de los epitelios y se compone entre otras proteínas, por la claudinas, las cuales se expresan de manera diferencial a lo largo de la nefrona y funcionan como canales o barreras catiónicas y aniónicas, lo que determina la permeabilidad paracelular del epitelio renal. En la ND existen alteraciones en el manejo renal de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, se desconoce el papel de las claudinas en estas alteraciones en la diabetes. Por esta razón, se evaluó la expresión de las proteínas de la UE en un modelo murino de diabetes tipo 1 inducido con estreptozotocina. La evaluación de la función renal y el análisis molecular se realizó 3 semanas después de la inducción de diabetes. Se encontró que la hiperglucemia inducida por la diabetes disminuyó en los glomérulos y túbulos proximales la expresión de las claudinas-2 y -5 y de la ocludina de una manera dependiente del estrés oxidante inducido por el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y la activación de la NADPH oxidasa. La disminución de la claudina-2, la cual forma un canal paracelular de  $\text{Na}^+$ , se debió a un aumento en su nitración en residuos de tirosina y en su fosforilación en residuos de serina inducida por la cinasa de proteínas  $\text{PKC}\beta 2$ . Estas alteraciones se atenuaron con el antioxidante ácido retinoico *all-trans*, lo que demostró que el estrés oxidante disminuye la expresión de las proteínas de la UE en los glomérulos y túbulos proximales. Por lo contrario, en los túbulos distales se encontró que la diabetes aumentó el ARNm, la proteína y la fosforilación en residuos de treonina de las claudinas-4 y -8, las cuales forman un canal paracelular de  $\text{Cl}^-$  y una barrera de  $\text{Na}^+$ , y cuya fosforilación es mediada por las cinasas SGK1 y WNK4. Estas alteraciones disminuyeron con espironolactona, un inhibidor de las acciones de la aldosterona, lo que demostró que esta hormona regula a las claudinas-4 y -8 en la ND. Estos hallazgos demuestran que las alteraciones en la expresión de las proteínas de la UE juega un papel importante en las alteraciones en el manejo renal de iones, lo que sugiere que la UE puede ser un blanco terapéutico atractivo en la ND.

## **Abstract**

Diabetic nephropathy (DN) constitutes one of the main microvascular complications in diabetes. Tight junctions (TJ) regulate the paracellular permeability of epithelia and are composed of several proteins, including claudins, which are differentially expressed along the nephron segments where they function as barrier or pores for anions or cations, thus determining paracellular permeability of renal epithelia. Alterations in the renal handling of ions such as  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , in DN have been described. However, the role of claudins in these mechanisms under diabetic conditions is unknown. For this reason, the expression of TJ proteins was evaluated in a murine model of type-1 diabetes induced by the administration of streptozotocin. Assessment of renal function and molecular mechanisms were evaluated 3 weeks after diabetes induction. It was found that diabetes decreased the expression of claudins-2 and -5 and occludin in an oxidative stress dependent way induced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling and NADPH oxidase activation in glomeruli and proximal tubules. Decrement of claudin-2, which forms a paracellular  $\text{Na}^+$  pore, was associated with its increased tyrosine nitration and serine phosphorylation induced by  $\text{PKC}\beta 2$  under diabetic conditions. These alterations were ameliorated by the antioxidant *all-trans* retinoic acid, thus showing that oxidative stress decreases the expression of TJ proteins in glomeruli and proximal tubules. In contrast, in the distal tubules, diabetes increased mRNA, protein expression and threonine phosphorylation of claudins-4 and -8, which form a paracellular  $\text{Cl}^-$  pore and a  $\text{Na}^+$  barrier, whose phosphorylation is mediated by SGK1 and WNK4 kinases. The alterations described above were ameliorated by spironolactone, an inhibitor of aldosterone actions, therefore showing that aldosterone regulates claudins-4 and -8 in distal tubules under diabetic conditions. The findings described above demonstrate a pivotal role of alterations of TJ proteins in renal handling of ions in diabetes, which suggest that TJ proteins might be a potential therapeutic target in DN.

## Índice

<b>I. Introducción</b>	<b>Página</b>
1. Anatomía y fisiología renal.....	9
2. La unión estrecha en el riñón.....	15
3. La claudinas en la nefrona.....	17
4. Diabetes y nefropatía diabética.....	23
5. Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética.....	24
6. Modelo experimental de diabetes tipo 1 con estreptozotocina.....	26
7. Papel fisiológico del ácido retinoico all trans y su efecto nefroprotector.....	27
8. Papel fisiológico de la aldosterona.....	30
<b>II. Justificación.....</b>	<b>34</b>
<b>III. Hipótesis.....</b>	<b>35</b>
<b>IV. Objetivo general.....</b>	<b>35</b>
<b>V. Objetivos particulares.....</b>	<b>35</b>
<b>VI. Materiales y métodos.....</b>	<b>35</b>
1. Diseño experimental y reactivos.....	36
2. Evaluación de los parámetros fisiológicos y bioquímicos.....	38
3. Obtención de tejido renal.....	39
4. Aislamiento de glomérulos, túbulos proximales y distales mediante gradientes de Percoll.....	39
5. Extracción de proteínas totales, de la fracción soluble e insoluble.....	41
6. Western blot.....	42
7. Análisis de los dímeros y monómeros de la eNOS.....	43
8. Inmunoprecipitación.....	43
9. Inmunofluorescencia.....	43
10. Extracción del ARN, síntesis del ADNc y qRT-PCR.....	44
11. Evaluación del estrés oxidante.....	45
12. Análisis estadístico de datos.....	47
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>48</b>
1. La administración de estreptozotocina induce el modelo experimental de diabetes y disfunción renal.....	48
2. La diabetes induce la expresión de los transportadores de glucosa SGLT1, SGLT2 y GLUT2 y disminuye la expresión de GLUT1.....	50
3. La diabetes induce estrés oxidante mediante el aumento de la producción de anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) en glomérulos y túbulos proximales y en menor magnitud en túbulos distales a través de un mecanismo dependiente de la actividad de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).....	54

4. La diabetes altera de manera diferencial la expresión de las proteínas de la unión estrecha: claudina-5 en glomérulos, claudina-2 y ocludina en túbulos proximales y ZO-1 y claudinas-1, 4 y -8 en túbulos distales...	60
5. La disminución de la expresión de la claudina-2 se asocia con el aumento en su nitración en residuos de tirosina .....	64
6. El ácido retinoico <i>all-trans</i> (ARat) tiene efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes...	67
7. El efecto nefroprotector del ácido retinoico <i>all-trans</i> (ARat) se asocia con su capacidad antioxidante.....	70
8. El ácido retinoico <i>all-trans</i> (ARat) previene la pérdida de las proteínas de la UE en los glomérulos y los túbulos proximales.....	75
9. El ácido retinoico <i>all-trans</i> (ARat) atenua la pérdida de la claudina-2 al disminuir la nitración en residuos de tirosina, la fosforilación en residuos de serina mediada por PKC $\beta$ 2 y la SUMOilación de claudina-2.....	78
10. La espironolactona ejerce efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes.....	81
11. La aldosterona aumenta la expresión y co-localización en la UE de las claudinas-4 y -8 en los túbulos distales en condiciones diabéticas.....	84
12. La aldosterona induce la expresión de WNK4 y la interacción de WNK4 con las claudinas-4 y -8 lo que aumenta la fosforilación en residuos de treonina de las claudinas-4 y -8 y su localización en la UE.....	88
13. La aldosterona aumenta la expresión y actividad de WNK4 al disminuir su ubiquitinación mediada por CUL3 y aumenta su fosforilación en residuos de serina mediada por SGK1.....	93
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>97</b>
<b>IX. Conclusión.....</b>	<b>101</b>
<b>X. Referencias.....</b>	<b>102</b>
<b>XI. Publicaciones derivadas de la presente tesis.....</b>	<b>109</b>

## Lista de abreviaturas

<b>ADNc</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>ANOVA</b>	Ánalysis de varianza
<b>ARat</b>	Ácido retinoico <i>all-trans</i>
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ASND</b>	Nefrona distal sensible a aldosterona
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno butilado
<b>Cldn</b>	Claudina
<b>CT</b>	Control
<b>CUL3</b>	Culina 3
<b>DBT</b>	Diabetes
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	Diacetato de diclorofluoresceína
<b>DMPK</b>	Desmoplaquina
<b>DNPH</b>	Dinitrofenilhidrazina
<b>DppD</b>	Dipeptidilpeptidasa
<b>DPI</b>	Difeniliodonio
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>eNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico endotelial
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FeK</b>	Excreción fraccional de potasio
<b>FeNa</b>	Excreción fraccional de sodio
<b>GAPDH</b>	Deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>4-HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>HO-1</b>	Hemooxigenasa-1
<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico inducible
<b>KIM-1</b>	Kidney injury molecule-1
<b>L-arg</b>	L-arginina

<b>L-NAME</b>	Éster metílico de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>ND</b>	Nefropatía diabética
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitratos
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitritos
<b>NOS</b>	Sintasa de óxido nítrico
<b>nNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico neuronal
<b>Nrf2</b>	Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2
<b>3-NT</b>	3-nitrotirosina
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>Ocl</b>	Ocludina
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anión peroxinitrito
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKCβ2</b>	Proteína cinasa C beta 2
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>p-Ser</b>	Fosforilación en residuos de serina
<b>p-Thr</b>	Fosforilación en residuos de treonina
<b>RET</b>	Resistencia eléctrica transepitelial
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SGK1</b>	Cinasa-1 inducida por glucocorticoides (por sus siglas en inglés)
<b>SGLT</b>	Cotransportador de sodio-glucosa
<b>SPL</b>	Espironolactona
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>Suc</b>	Succinato
<b>SUMO-1</b>	Modificador pequeño parecido a ubiquitina (por sus siglas en inglés)
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>UE</b>	Unión estrecha

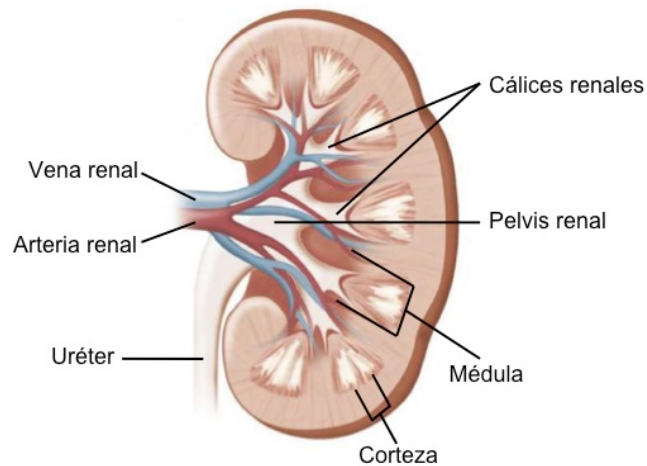


<b>VE-cad</b>	Cadherina endotelial-vascular
<b>WNK4</b>	Cinasa sin lisina (por sus siglas en inglés)
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens-1

## I. Introducción

### 1. Anatomía y fisiología renal

El órgano que se encarga del balance global de NaCl y agua en el organismo, es el riñón. En el cuerpo humano existen dos riñones localizados en el espacio retroperitoneal entre las vértebras torácicas, 8 y 12. Los riñones son órganos densos recubiertos por una fascia de tejido conectivo. Los riñones están conectados con el resto del organismo por el hilio renal, el cual constituye el sitio de entrada y salida de la arteria renal, la vena renal, el uretero y las terminales nerviosas que acompañan a los vasos sanguíneos (Esquema 1).

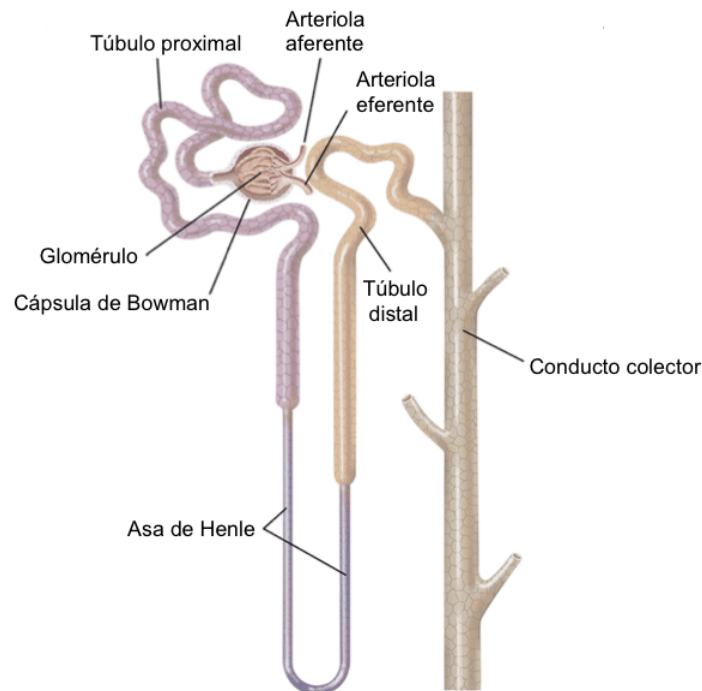


**Esquema 1.** El riñón. El punto de entrada y salida de la arteria y la vena renal, se conoce como el hilio renal. La pelvis renal es el sitio de donde nace el uretero. Histológicamente el riñón se divide en corteza y médula con base en diferencias de estirpes celulares, circulatorias y metabólicas.

Las principales funciones del riñón son:

- a) La excreción de productos de desecho y de sustancias exógenas.
- b) La regulación del balance de agua y electrolitos.
- c) El mantenimiento del equilibrio ácido-base.
- d) La regulación de la presión arterial.
- e) La gluconeogénesis.
- f) La producción de hormonas.

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Esquema 2). Esta consta de una combinación de elementos vasculares y epiteliales que forman el glomérulo que filtra el plasma, así como de los túbulos renales que mediante procesos de reabsorción y secreción convierten al ultrafiltrado del plasma en orina. En humanos, cada riñón contiene alrededor de 1 millón de nefronas que se encargan de filtrar alrededor de 180 L de plasma por día y producen aproximadamente 1 L de orina diariamente. Esto equivale a una tasa de reabsorción del 99.4% de lo que se filtra al nivel del glomérulo.



**Esquema 2.** La nefrona está formada por el glomérulo, la cápsula de Bowman, las arteriolas aferente y eferente, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el conducto colector.

Los diferentes segmentos de la nefrona dispuestos de proximal a distal son: el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa descendente de Henle, el asa ascendente delgada y ascendente gruesa de Henle, el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el ducto colector. Cada segmento tiene funciones específicas necesarias para poder llevar a cabo un filtrado adecuado del plasma y una regulación minuto a minuto de las concentraciones de los diferentes componentes del líquido extracelular. Se puede dividir a la nefrona en dos segmentos distintos desde el punto de vista de regulación:

a) Nefrona proximal. Compuesta por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, las asas de Henle y la mácula densa.

b) Nefrona distal. Compuesta por el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el ducto colector.

La organización histológica de las diferentes porciones de la nefrona son esenciales para las tres funciones básicas del riñón: filtración, reabsorción y secreción. La filtración es el proceso a través del cual los componentes plasmáticos se filtran a través del glomérulo. A este líquido se le conoce como ultrafiltrado glomerular. La formación del ultrafiltrado glomerular se da gracias a la disposición anatómica de los diferentes componentes glomerulares. El glomérulo está formado por la arteriola aferente, los capilares glomerulares, la arteriola eferente y la cápsula de Bowman. La filtración ocurre a través de los capilares glomerulares gracias a la alta diferencia de presión hidrostática que existe entre las arteriolas aferente y eferente, y a las fenestraciones de los capilares glomerulares. Eso permite que los componentes plasmáticos como  $H_2O$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y glucosa se encuentren a la misma concentración en el ultrafiltrado glomerular que en el plasma. Las proteínas sin embargo, no se filtran por su tamaño y por la concentración de cargas negativas que se encuentran tanto en la membrana basal del capilar glomerular como en los podocitos, los cuales son unas células especializadas que recubren a los capilares glomerulares dentro de la cápsula de Bowman. El filtrado a su vez es colectado en la cápsula de Bowman la cual conduce el líquido hacia los túbulos.

### ***Función de los túbulos renales***

La mayor parte del filtrado glomerular se reabsorbe por los túbulos renales, que son selectivos a la sustancia o al ión que se reabsorbe.

**Túbulo proximal.** La concentración de diversos iones y moléculas cambia a lo largo de este túbulo en relación con la reabsorción de agua, esto depende de su reabsorción o su secreción: La concentración de  $Na^+$  no varía a lo largo del túbulo porque su reabsorción se lleva a la par con la de agua; la concentración de  $Cl^-$  aumenta un poco y la de urea y creatinina se incrementa de manera considerable debido a que estas moléculas no se reabsorben en el túbulo proximal; la concentración de  $HCO_3^-$  disminuye hasta un 50%; la

glucosa y los aminoácidos desaparecen por completo, por que son reabsorbidos completamente en este segmento de la nefrona.

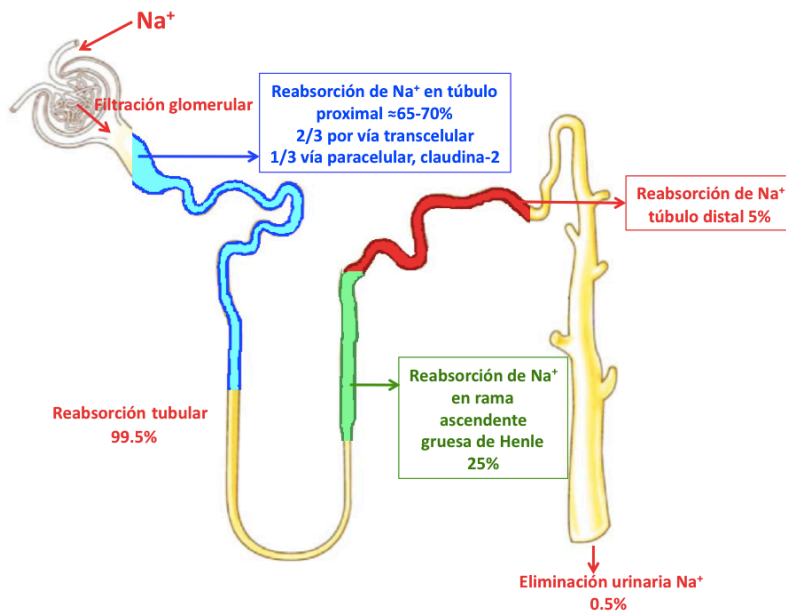
**Asa de Henle.** Esta porción tubular reabsorbe del 15 al 20% del filtrado glomerular. Esta es una estructura fundamental para la concentración/dilución de la orina. En el asa delgada se expresan abundantemente los canales de acuaporina-1, lo que permite la intensa absorción de agua. El asa ascendente gruesa es impermeable al agua y es fundamental para la reabsorción de NaCl a través del co-transportador  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ .

**Túbulo distal.** Esta porción se encarga de la reabsorción del 5 al 10% del filtrado glomerular. Este túbulo es la parte de la nefrona con mayor actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Se continúa reabsorbiendo NaCl a través del transportador de  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ .

**Túbulo colector.** Es la última región de la nefrona en la que se pueden reabsorber iones, moléculas o agua, antes de drenar la orina final a las vías urinarias. A diferencia de otras regiones de la nefrona, este túbulo recibe la afluencia de los túbulos distales de varias nefronas. En la médula renal, el túbulo colector también se encarga de la reabsorción de agua mediante la acuaporina-2 y la reabsorción de urea.

### ***Manejo renal de $\text{Na}^+$***

La mayor parte de la reabsorción de los componentes del ultrafiltrado glomerular ocurre en el túbulo proximal (90-95%). Con respecto al  $\text{Na}^+$ , este se reabsorbe en un 99.5% a lo largo de los túbulos renales, siendo su eliminación urinaria del 0.5%. En el túbulo contorneado proximal se reabsorbe del 65-70% del  $\text{Na}^+$  que se filtra a través del glomérulo, de los cuales dos terceras partes se da por la ruta transcelular mediada por los co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ ,  $\text{Na}^+/\text{fosfato}$  y el transportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Mientras que la una tercera parte restante se reabsorbe a través de la ruta paracelular mediada por claudina-2 [1]. Por otro lado, el 25% del  $\text{Na}^+$  filtrado se reabsorbe en la rama ascendente gruesa de Henle y solamente un 5% en la nefrona distal que en última instancia dicta el contenido urinario de NaCl (Esquema 3).



**Esquema 3.** Manejo renal de  $\text{Na}^+$  en el túbulo contorneado proximal, la rama ascendente gruesa de Henle y el túbulo distal.

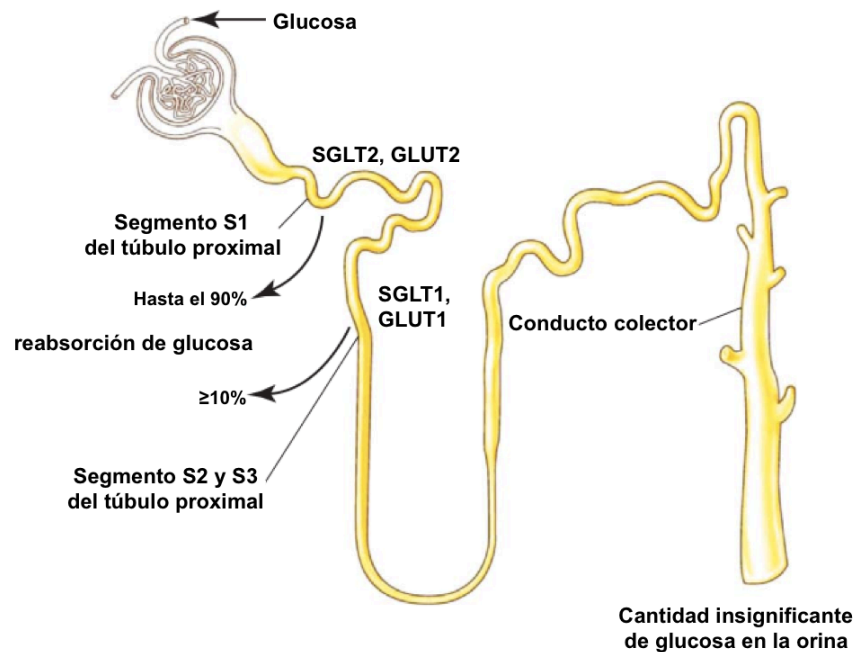
### ***Papel del riñón en el balance de la glucosa***

El riñón modula el nivel de glucosa circulante a través de la reabsorción tubular de la glucosa filtrada por el glomérulo. La reabsorción tubular de glucosa es un proceso constitutivo que depende de las concentraciones de glucosa y no es regulado por insulina. Se sabe que casi toda la glucosa que entra al glomérulo se filtra y posteriormente se reabsorbe a través de los túbulos proximales. Un individuo sano filtra aproximadamente 160-180 g de glucosa diariamente y el 100% se reabsorbe en el sistema tubular renal, de esta forma, la glucosa está ausente en la orina en condiciones normales. Las características del manejo renal de glucosa dependen principalmente de los cotransportadores de  $\text{Na}^+$ /glucosa (SGLTs) presentes en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal y de los transportadores de glucosa (GLUTs) localizados en la membrana basolateral de dichas células [2].

### ***Cotransportadores de $\text{Na}^+$ /glucosa (SGLTs)***

Las proteínas SGLTs se codifican por la subfamilia de genes acarreadores de solutos 5 (SLC5) simportadores de  $\text{Na}^+$ /sustrato. Los genes SCL5 codifican para varias proteínas (~75 kDa) entre las cuales SGLT1 y SGLT2 son las que mejor se han caracterizado.

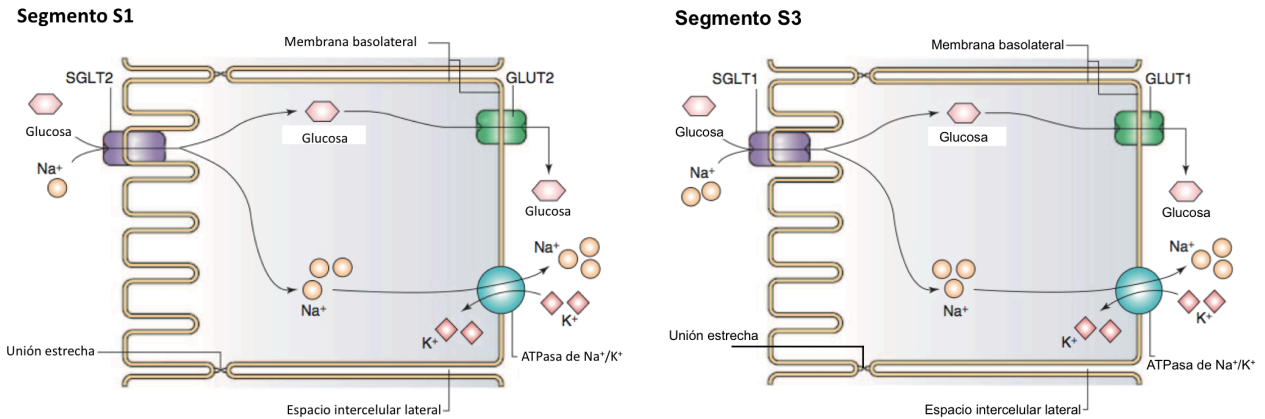
SGLT1 se expresa en los segmentos más distales del túbulo contorneado proximal (S2/S3) donde regula la absorción de la glucosa remanente del segmento S1 (~10%). Se ha reportado que SGLT2 se expresa mayoritariamente en el primer segmento del túbulo proximal (S1) en la corteza renal, donde se regula la reabsorción de ~90% de la glucosa filtrada (Esquema 4).



**Esquema 4.** Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal. En el segmento S1 del túbulo proximal, SGLT2 transporta glucosa desde la luz tubular hacia el interior de las células en contra de un gradiente de concentración en un mecanismo de cotransporte con  $\text{Na}^+$ . Un mecanismo similar opera con el cotransportador SGLT1 en el segmento S2/S3.

Los transportadores SGLT2 y SGLT1 poseen diferentes características de transporte. SGLT2 transporta glucosa y  $\text{Na}^+$  con una estequiometría 1:1, mientras que SGLT1 transporta una molécula de glucosa con dos iones de  $\text{Na}^+$  (estequiometría 1:2) (Esquema 5). SGLT2 es un transportador que posee baja afinidad y alta capacidad de transporte de glucosa. Posee un valor de  $K_{0.5}$  de ~2 mM para glucosa y 100  $\mu\text{M}$  para  $\text{Na}^+$ . Mientras que SGLT1 transporta glucosa con alta afinidad y baja capacidad. Los valores de  $K_{0.5}$  para glucosa son de ~0.4 mM y 3 mM para  $\text{Na}^+$ . Por lo tanto, SGLT2 en el segmento S1 es adecuado para la reabsorción de altas concentraciones de glucosa, mientras que SGLT1 es adecuado para la reabsorción de las concentraciones remanentes de glucosa no reabsorbida

por SGLT2 (Esquema 5). Una vez que la glucosa se encuentra dentro de la célula tubular, ésta se transporta hacia el espacio intersticial por los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 localizados en la membrana basolateral de la célula tubular.



**Esquema 5.** Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal por los cotransportadores SGLT1 y SGLT2. Cerca del 90% de la glucosa filtrada se reabsorbe en el segmento S1 del túbulo proximal por SGLT2 localizado en la membrana apical de las células tubulares. La glucosa remanente se reabsorbe en las porciones distales del túbulo proximal, en los segmentos S2/S3 por el cotransportador SGLT1. Una vez que la glucosa se encuentra dentro de la célula proximal, se transporta hacia el compartimento intersticial por los transportadores de glucosa GLUT2 y GLUT1 presentes en la membrana basolateral en los segmentos S1 y S2/S3 respectivamente.

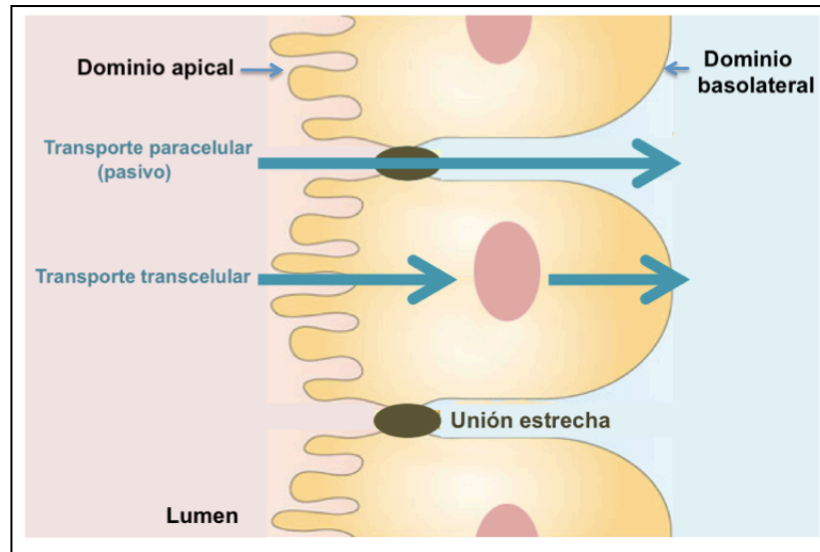
## 2. La unión estrecha en el riñón

### *Transporte a través del epitelio tubular renal*

La reabsorción y secreción de solutos a través del epitelio tubular renal constituye un aspecto fundamental de la fisiología celular del riñón. El transporte neto de solutos y H<sub>2</sub>O a través de este epitelio ocurre por medio de dos vías: la vía transcelular y la vía paracelular (Esquema 6). El transporte transcelular es el movimiento regulado de solutos y agua desde la membrana apical a través del citoplasma y cruzando la membrana basolateral. Este proceso ocurre por transportadores y canales que se encuentran tanto en la membrana apical como en la basolateral, mientras que el transporte a través de la vía paracelular se regula por las proteínas de la unión estrecha (UE) (Esquema 6).



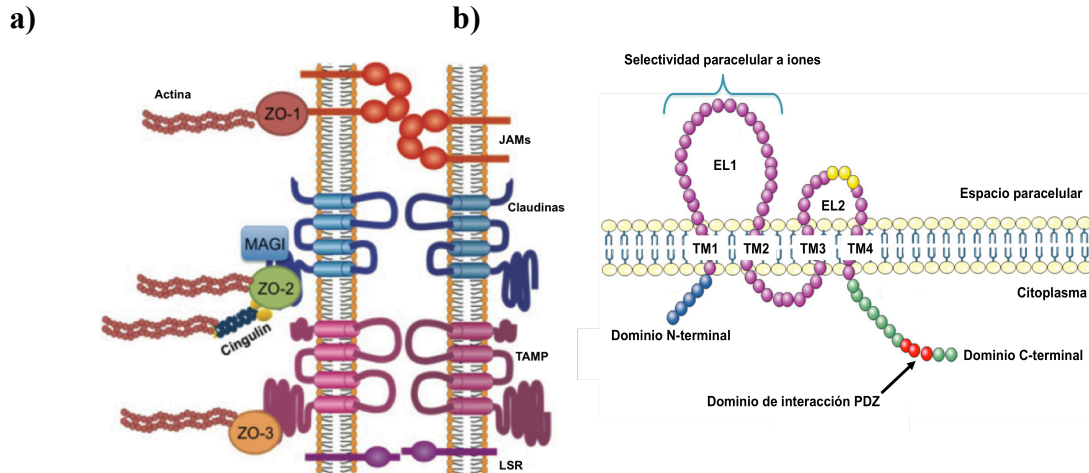
Las características de permeabilidad de las UEs varían en los diferentes tejidos del organismo. Esta variación se basa en la expresión diferencial de las claudinas, que son proteínas de la UE, las que forman barreras o poros paracelulares aniónicos y catiónicos [1].



**Esquema 6.** Representación esquemática del epitelio tubular renal y de las vías de transporte transcelular y paracelular.

### ***Estructura y función de la unión estrecha.***

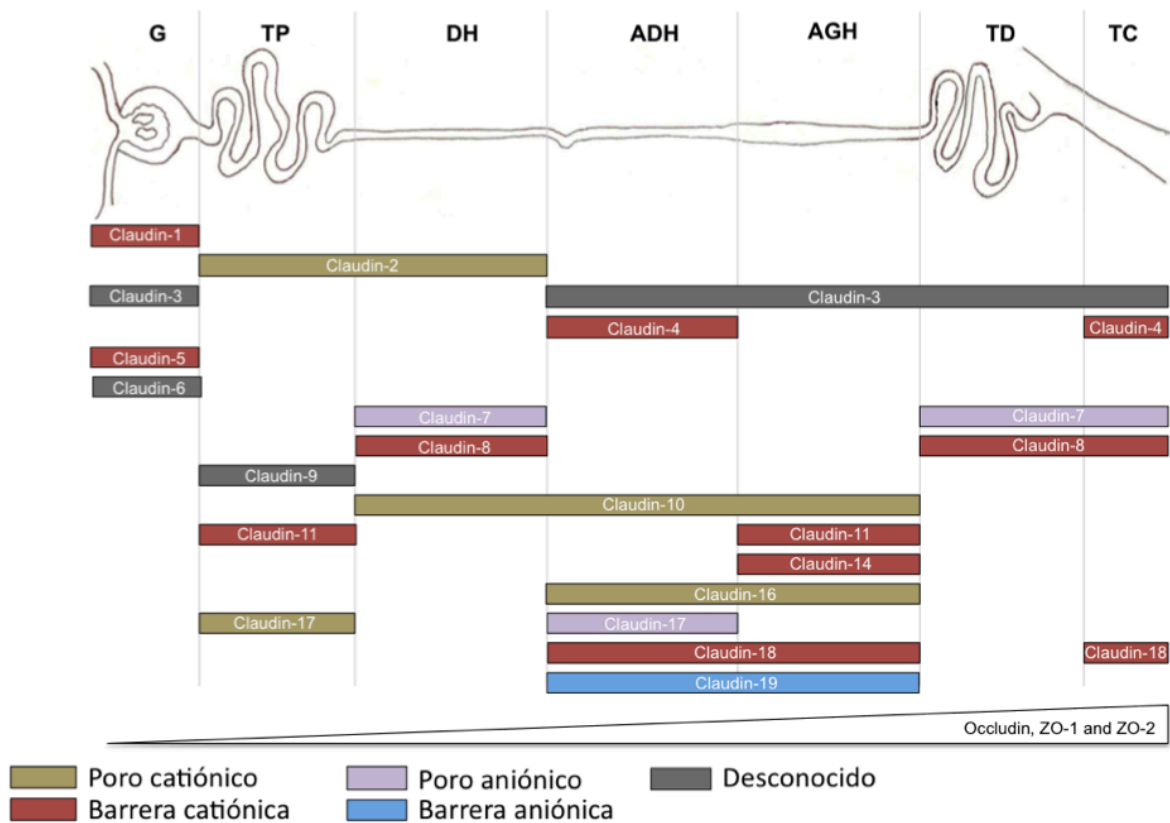
Las uniones estrechas son estructuras que se encuentran en el límite entre las membranas apical y basolateral de las células epiteliales [3]. Las uniones estrechas están constituidas por un conjunto complejo de proteínas. Las proteínas integrales comprenden a las claudinas, las proteínas JAMs, TAMP y LSR, las cuales establecen los contactos célula-célula en el espacio intercelular. Las proteínas periféricas zonula occludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3), actúan como un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina (Esquema 7) [3].



**Esquema 7. a)** Estructura de las uniones estrechas **b)** Representación esquemática de las claudinas. Las claudinas poseen cuatro dominios transmembranales (TM1, TM2, TM3 y TM4), dos asas extracelulares (EL1 y EL2) y los dominios citosólicos N- y C-terminal. El primer dominio extracelular determina la selectividad iónica del epitelio.

### 3. Las claudinas en la nefrona

La permeabilidad de la vía paracelular depende de la UE presente en los diferentes segmentos de la nefrona. Se ha observado que la conductancia del epitelio renal disminuye a lo largo de la nefrona desde el túbulo proximal, que es el segmento más permeable, hasta los conductos colectores papilares, que son los segmentos más herméticos. Existe transporte bidireccional de aniones y cationes en todos los segmentos de la nefrona a través de la vía paracelular. La mayoría de los segmentos de la nefrona son más permeables a cationes que a aniones, aunque la vía paracelular del asa ascendente delgada de Henle y del conducto colector presentan selectividad por aniones como el  $\text{Cl}^-$ . La expresión de diferentes claudinas en la nefrona determina las propiedades del transporte paracelular de la UE en los diferentes segmentos del riñón. Por ejemplo, en el glomérulo se expresan las claudinas-1 y -5, en el túbulo proximal y en el asa descendente delgada de Henle se expresan las claudinas-2 y -10, en el asa ascendente de Henle se expresan las claudinas-3, -16 y -19, en el túbulo contorneado distal se expresan las claudinas-7, -8 y -19 y en el conducto colector se expresan las claudinas-4, -7 y -8. La expresión de las proteínas ocludina, ZO-1 y ZO-2 aumenta desde el túbulo proximal hasta la nefrona distal (Esquema 8) [4].



**Esquema 8. Expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina, claudinas, ZO-1 y ZO-2 a lo largo de la nefrona.** Las claudinas forman poros o canales paracelulares catiónicos o aniónicos a lo largo de la nefrona. G, glomérulo; TP, túbulo proximal; DH, rama descendente delgada de Henle; ADH, rama ascendente delgada de Henle; AGH, rama ascendente gruesa de Henle; TD, túbulo distal y TC, túbulo colector.

En diversos estudios se ha demostrado que las claudinas son responsables de las propiedades de conductancia por tamaño y carga de la vía paracelular. La expresión de las claudinas en las células epiteliales en cultivo cambia la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de estas células, de esta forma, las claudinas se clasifican como poros o barreras con base en si su expresión aumenta o disminuye la TER. Por ejemplo, la sobreexpresión de la claudina-4 en células MDCK II de baja resistencia triplica la TER, de esta forma la claudina-4 se clasifica como una barrera [5]. Por otro lado, la expresión de una claudina de tipo poro, como la claudina-2, en las células MDCK I de alta resistencia, disminuye la TER 20 veces [6]. Con base en varios estudios de sobreexpresión se han clasificado a las claudinas-1, -4, -5, -6, -8, -9, -11, -15 y -19 como claudinas barrera [5,7-11]. Por lo contrario, las claudinas-2, -10 y -16 se han clasificado como claudinas poro [12-14].

Además, en la nefrona, las claudinas poro se expresan en los segmentos tubulares que poseen alta permeabilidad como el túbulo proximal, mientras que las claudinas barrera se expresan en los segmentos más herméticos como el túbulo distal. Por ejemplo, la claudina-2, una claudina poro, se expresa de manera abundante en el túbulo proximal [15], por otro lado, la claudina-8, una claudina barrera, se expresa en el túbulo distal [16].

Las claudinas pueden aumentar selectivamente la permeabilidad paracelular de cationes sobre aniones o viceversa. Por ejemplo, la expresión de la claudina-4 en las células MDCK II, disminuye la permeabilidad a sodio ( $P_{Na}$ ) preferentemente sobre  $Cl^-$  ( $P_{Cl}$ ). De manera inversa, la sobreexpresión de la claudina-2 en células MDCK I, aumenta la  $P_{Na}$  preferentemente sobre  $P_{Cl}$  [13,17,18]. En la tabla 1, se muestra un resumen del conocimiento actual sobre las propiedades de poro o barrera de las claudinas.

Las bases moleculares de la selectividad por carga de las claudinas está codificada en el primer dominio extracelular de las claudinas (EL1, Esquema 7b). Las claudinas con un EL1 cargado negativamente (claudinas-2, -15 y 10a), son selectivas para cationes, mientras que las claudinas con una carga neta positiva (claudinas-10b y 17) son selectivas para aniones [19].

### ***Localización, función y regulación de las claudinas en el riñón***

Una gran variedad de claudinas se expresan a lo largo del riñón (Esquema 8). A continuación se explicará de manera resumida la función y regulación de las claudinas en los diferentes segmentos de la nefrona.

#### **Glomérulo**

El epitelio parietal que reviste a la cápsula de Bowman actúa como una barrera para las macromoléculas [20]. Se ha descrito que la claudina-1 se expresa solamente en la UE de las células del epitelio parietal [21,22]. *In vitro*, la claudina-1 funciona como una barrera que disminuye la conductancia iónica [23], lo que sugiere que esta claudina podría ser la responsable de la función de barrera de la cápsula de Bowman. En el glomérulo adulto, las células del epitelio visceral (podocitos) forman una unión intercelular especializada llamada diafragma en hendidura. La claudina-5 se expresa a lo largo de la membrana plasmática de

los podocitos [24], mientras que la claudina-6 se expresa en la membrana basal y en la base del diafragma en hendidura [25].

### **Túbulo proximal**

El túbulo proximal es un epitelio con alta permeabilidad iónica y reabsorbe hasta dos terceras partes de la carga de  $\text{Cl}^-$  filtrado, así como dos terceras partes del volumen del ultrafiltrado glomerular. Casi la mitad del  $\text{NaCl}$  se reabsorbe a través de la vía paracelular. La claudina-2, que actúa como un poro paracelular catiónico [17], se expresa de manera abundante en este segmento de la nefrona, así como en el segmento inicial de la rama descendente delgada del asa de Henle donde transporta  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y agua [18]. En el túbulo proximal también se expresan las claudinas-10a, -12 y -17, las cuales funcionan como poros con selectividad aniónica que pueden reabsorber  $\text{Cl}^-$  en este segmento de la nefrona.

### **Rama ascendente gruesa de Henle**

Este segmento de la nefrona transporta de manera activa  $\text{NaCl}$  por la ruta transcelular, lo que provee la reabsorción selectiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  por la vía paracelular [26]. Las bases moleculares de la importancia de la reabsorción de iones divalentes por la vía paracelular se descubrieron en pacientes con hipomagnesemia e hipercalcemia familiar con nefrocalcinosis (FHHNC), un desorden renal autosómico recesivo, en los cuales se encuentran mutados los genes de las claudinas-16 y -19. La FHHNC se caracteriza por excesiva pérdida urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  debida a un defecto de las claudinas-16 y -19.

### **Nefrona distal sensible a aldosterona**

La nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN) comprende al túbulo contorneado distal, túbulo conector y ducto colector. En este segmento de la nefrona, se absorbe aproximadamente el 10% del  $\text{NaCl}$  filtrado, lo que juega un papel importante en la regulación del volumen del fluido extracelular y el control de la presión arterial [27,28]. El papel funcional de las claudinas en el túbulo contorneado distal se desconoce. Varias claudinas, como las claudinas-3, -4, -7 y -8 se expresan en el túbulo conector y en el ducto colector. La primera claudina que se investigó de manera funcional en el ducto colector fue

la claudina-4, la cual se transfectó en células MDCK II y disminuyó la  $P_{Na}$  [5]. En estudios en los cuales se silenció la expresión de la claudina-4, se encontró una disminución en la permeabilidad paracelular aniónica, incluyendo la  $P_{Cl}$ , en células del conducto colector, además, la aldosterona fosforiló a la claudina-4 y aumentó la conductancia paracelular del  $Cl^-$  en células del conducto colector cortical de ratas [29]. Por otro lado, la claudina-8 juega un papel importante en la  $P_{Cl}$  en ducto colector. En células M-1 y mIMCD3, el silenciamiento de la claudina-8 disminuye la  $P_{Cl}$  [30]. Se encontró que el efecto de la claudina-8 depende de su interacción en *cis* con la claudina-4. Se ha reportado que la claudina-8 interacciona con la claudina-4 de acuerdo con diversos criterios: (a) un ensayo de doble híbrido positivo entre ambas proteínas, (b) la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en células epiteliales, (c) el co-tráfico y la co-localización de ambas proteínas en células epiteliales y (d) el reclutamiento de la claudina-4 por la claudina-8 hacia la unión estrecha [30]. En ausencia de la claudina-8, la claudina-4 se retiene en el retículo endoplásmico y en el complejo de Golgi, lo que sugiere que su asociación con la claudina-8 es necesaria para que la claudina-4 pase el punto de control de calidad en el retículo endoplásmico.

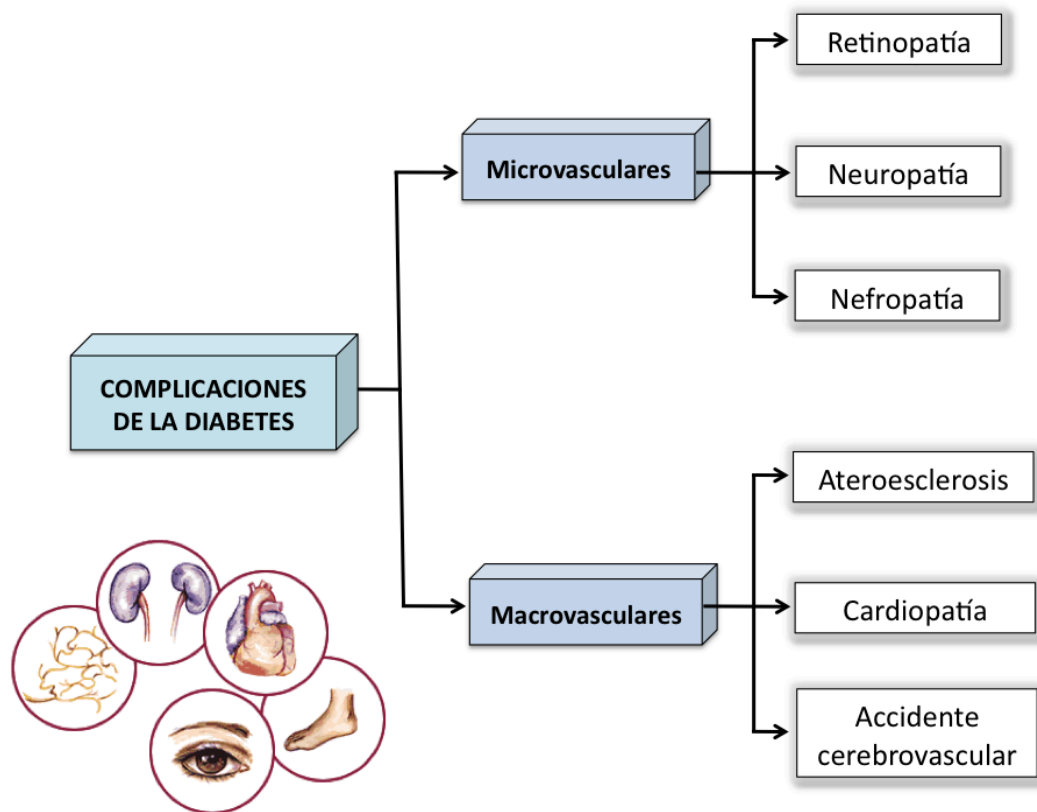
Tabla 1. Selectividad y permeabilidad iónica de las claudinas.

<b>CLAUDINA</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Claudinas con selectividad catiónica</b>	
<i>Forman de manera predominante poros catiónicos</i>	
Claudina-2	[13,17,18]
Claudina-10b	[31]
Claudina-16	[12,14]
<i>Forman de manera predominante barreras aniónicas</i>	
Claudina-7	[32]
Claudina-19	[33]
<i>Potencial para formar un poro catiónico o una barrera aniónica</i>	
Claudina-15	[34]
<b>Claudinas con selectividad aniónica</b>	
<i>Forman de manera predominante poros aniónicos</i>	
Claudina-7 <sup>a</sup>	[35]
Claudina-10 <sup>a</sup>	[31]
Claudina-17	[36]
<i>Forman de manera predominante barreras catiónicas</i>	
Claudina-1	[7,23]
Claudina-3	[37]
Claudina-5	[8]
Claudina-6	[38]
Claudina-9	[38]
Claudina-14	[39]
Claudina-18	[40]
Claudina-19	[11]
<i>Potencial para formar un poro aniónico o una barrera catiónica</i>	
Claudina-4	[5,30,35]
Claudina-8	[11,16]
Claudina-11	[39]

Tabla modificada de [1]. En esta tabla se asume que la permeabilidad y la selectividad son propiedades intrínsecas de cada una de las claudinas de manera individual. Las claudinas que forman poro disminuyen la TER o aumentan la permeabilidad de los solutos, mientras que las claudinas que forman barreras aumentan la TER o disminuyen la permeabilidad de los solutos. <sup>a</sup>Las propiedades de la claudina-7 son controvesiales debido a que varios estudios están en desacuerdo con respecto a sus propiedades de permeabilidad y selectividad.

#### 4. Diabetes y nefropatía diabética

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica asociada a factores genéticos y ambientales, que se ha incrementado considerablemente en los últimos años y actualmente se considera una epidemia mundial. La OMS clasifica la diabetes en tres tipos principalmente: 1) la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la pérdida de las células  $\beta$  pancreáticas y en consecuencia la disminución en la producción de insulina, 2) la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) asociada con la resistencia progresiva a la insulina debido al sobrepeso y obesidad y a la disfunción de las células  $\beta$  y 3) la diabetes gestacional que se presenta como consecuencia de la resistencia a la insulina durante el embarazo y que aumenta el riesgo de la madre y el hijo de padecer DMT2 en años posteriores. Tanto la DMT1 y la DMT2 están asociadas con un aumento en la tasa de complicaciones microvasculares como la nefropatía, neuropatía y retinopatía y con complicaciones macrovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión y el infarto cardiaco (Esquema 9).



**Esquema 9. Principales complicaciones en la diabetes.** Las complicaciones de la diabetes se agrupan en dos tipos principalmente: microvasculares y macrovasculares.



La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones asociadas a la DMT1 y DMT2, que eventualmente progresa a un estado de enfermedad renal en fase terminal (ERT). En diversos estudios epidemiológicos, se ha encontrado que aproximadamente el 30% de los pacientes diabéticos manifiestan nefropatía y que a nivel mundial la nefropatía diabética es la principal causa de enfermedad renal crónica y de fase terminal, y constituye uno de los factores de predicción de la mortalidad más fuertes en pacientes con diabetes.

La descripción clásica de la historia natural de la diabetes indica que en pacientes con DMT1, la enfermedad renal comienza aproximadamente 10 años después de la aparición de la enfermedad. Dentro de las manifestaciones clínicas iniciales se encuentran la microalbuminuria (mayor a 30 mg/día), que eventualmente progresa a macroalbuminuria (mayor a 300 mg/día) y disminución de la tasa de filtración glomerular (VFG). A nivel funcional, los pacientes con DMT1 desarrollan hiperfiltración glomerular seguida de un periodo prolongado de disminución en la función glomerular que culmina en ERT.

Durante el curso de la nefropatía diabética, se han descrito diversos procesos patológicos en varias células renales, incluyendo las células mesangiales, el podocito y las células tubulares renales. Dentro de las principales alteraciones morfológicas y funcionales que suceden en etapas iniciales de la nefropatía diabética se encuentran: la proteinuria, la disfunción glomerular, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, la expansión mesangial, la hipertrofia glomerular y tubular y la acumulación de la matriz extracelular (MEC) que origina fibrosis renal.

### **5. Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética**

Dentro de los principales procesos intracelulares que se activan en las células renales en respuesta a la hiperglucemia destacan (Esquema 10):

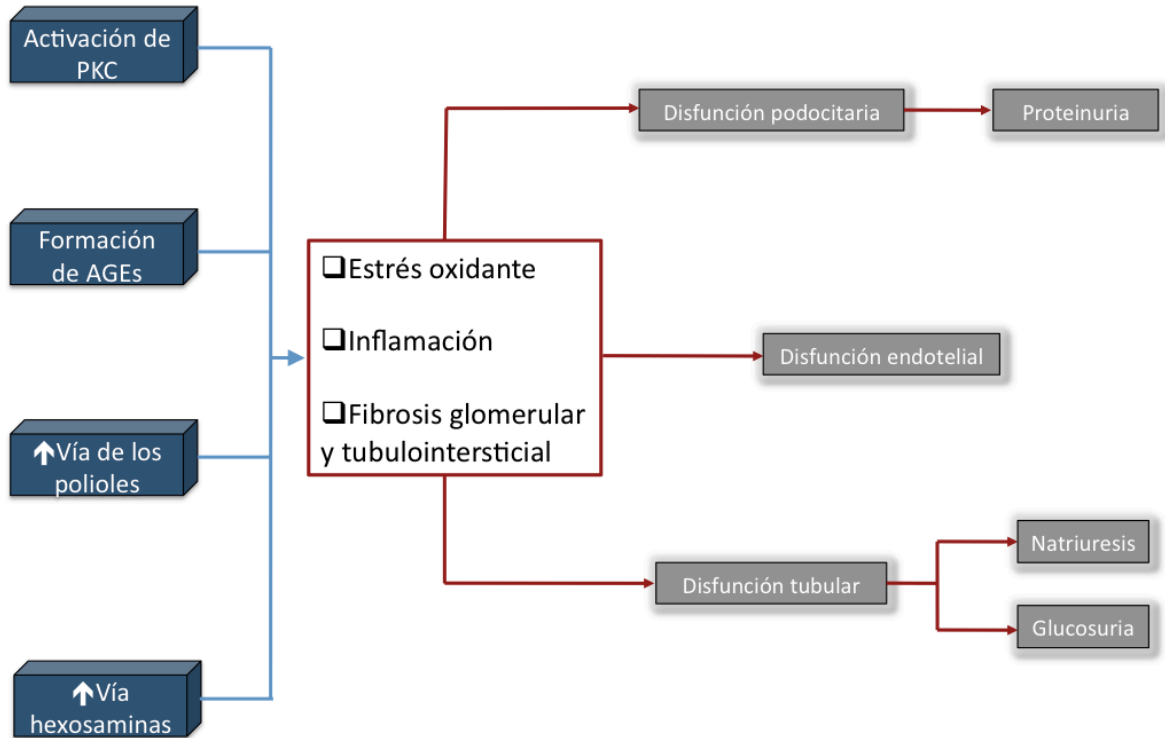
1. Alteración en la producción de la energía celular
2. Activación de diferentes enzimas como la aldosa reductasa y la PKCs
3. Aumento en el flujo de polioles y la vía de las hexosaminas
4. Generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs)
5. Producción de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante

El aumento en la expresión de los transportadores de glucosa en las células epiteliales renales se ha asociado al desarrollo de las complicaciones en la nefropatía diabética

[41,42]. Además, la expresión de la enzima hexocinasa, que está involucrada en el transporte de glucosa en las células, se regula por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la cual presenta cambios significativos en los sitios en los cuales existen complicaciones diabéticas. Por lo tanto, el proceso de producción de energía en las células se encuentra descontrolado en la diabetes como resultado del exceso de sustrato energético, en particular de la glucosa.

Una vez que la glucosa ingresa a la célula se metaboliza vía glucólisis hasta llegar a la producción de glucosa 3-fosfato, un precursor del diacilglicerol (DAG) que es una molécula responsable del reclutamiento y activación de las cinasas PKC. Diversas isoformas de las PKC se expresan en el riñón y se activan en condiciones diabéticas, especialmente la PKC $\beta$ 2, la cual se activa por múltiples estímulos incluyendo, DAG, la vía de los polioles y los AGEs. La activación de las PKCs tiene influencia en un gran número de vías de señalización como la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), la endotelina-1 (ET-1), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ 1), la NADPH oxidasa y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), lo que resulta en modificaciones patológicas que alteran el flujo sanguíneo renal, la permeabilidad capilar epitelial y la producción de proteínas de matriz extracelular [43].

Por otro lado, uno de los mecanismos patológicos que participan de manera importante en el desarrollo de las complicaciones en la nefropatía diabética es el estrés oxidante. Las anormalidades metabólicas que surgen como consecuencia del aumento en la reabsorción de glucosa por las células renales causan una sobreproducción del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) por la mitocondria y por la formación del complejo activo de la NADPH oxidasa. El aumento en la producción de  $O_2^-$  activa las 5 principales vías involucradas en la patogénesis de la nefropatía diabética: el aumento en la vía de los polioles, el aumento en la formación de los AGEs, el aumento en la expresión del receptor de los AGEs (RAGEs), la activación de diversas isoformas de las PKCs y la sobreactivación de la vía de las hexosaminas (Esquema 10). [43].



**Esquema 10. Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética.** Dentro de las características iniciales del daño renal se encuentran la inducción de proteinuria, natriuresis y glucosuria.

## 6. Modelo experimental de diabetes tipo 1 con estreptozotocina

En esta tesis se utilizó la estreptozotocina (STZ) para inducir diabetes experimental. La STZ es un compuesto natural producido por la bacteria *Streptomyces achromogenes*, que exhibe un espectro amplio de actividad antibacteriana [44] y además es un análogo de glucosa que produce citotoxicidad. Rakieten y cols, reportaron por primera vez las propiedades diabetogénicas de la STZ en 1963 [45], y desde entonces se ha utilizado como un agente químico que induce diabetes, esto debido a que induce la muerte celular específica de las células  $\beta$  pancreáticas. La selectividad del daño a las células  $\beta$  pancreáticas se debe al motivo de unión al transportador de glucosa GLUT2 que se encuentra dentro de la estructura de la STZ. GLUT2 se expresa de manera abundante en las células  $\beta$  pancreáticas y de esta forma la STZ mata principalmente a estas células. Además, dado que las células  $\beta$  pancreáticas poseen una alta dependencia de glucosa como fuente de

energía, esto las hace más susceptibles al daño por la STZ. Se han descrito tres mecanismos principales a través de los cuales la STZ induce daño en las células  $\beta$  pancreáticas:

1. La metilación del ADN, que resulta en la activación de la enzima nuclear poli ADP-ribosa sintasa como parte de los mecanismos de reparación celular que como consecuencia disminuye el contenido celular de  $\text{NAD}^+$ .
2. La producción de óxido nítrico.
3. La generación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno.

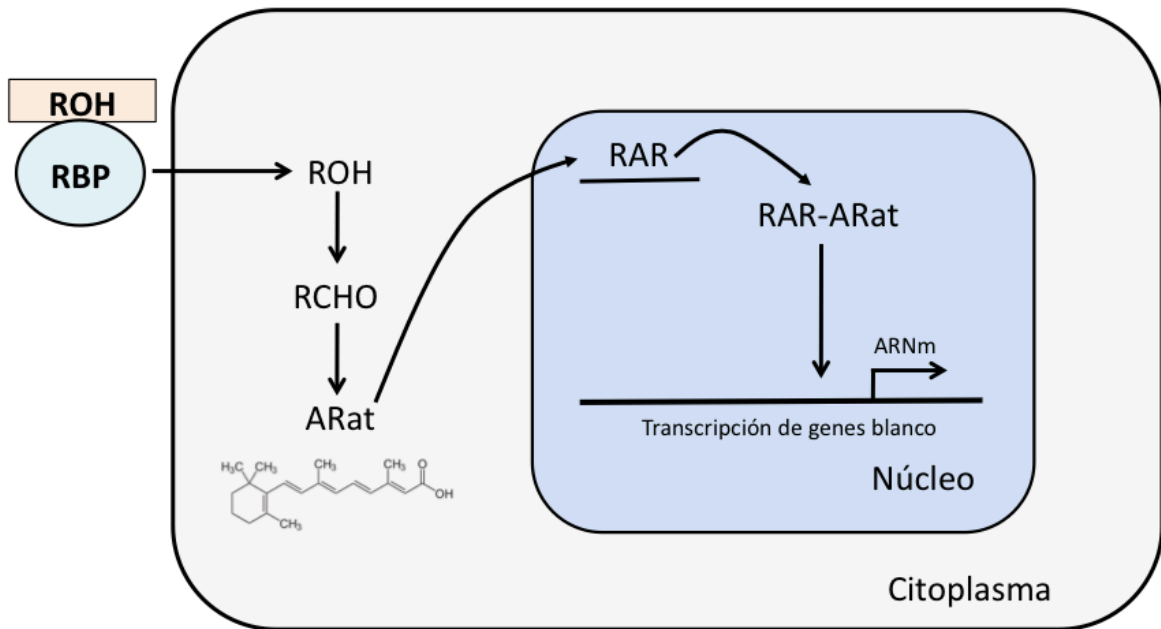
Se ha postulado que el modelo de diabetes que induce la administración de STZ en modelos murinos corresponde a la diabetes tipo I, ya que esta enfermedad se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, bajo esta condición, la ausencia de insulina favorece el aumento en la concentración sanguínea de glucosa o hiperglucemia.

## **7. Papel fisiológico del ácido retinoico all trans (ARat) y su efecto nefroprotector**

### ***Importancia fisiológica del ácido retinoico***

Han pasado más de tres décadas desde que se describió por primera vez la importancia de los retinoides, derivados sintéticos de la vitamina A (retinol), en la fisiología del ser humano [46]. La vitamina A es esencial para diversos procesos celulares, incluyendo el desarrollo del riñón, la diferenciación de las células epiteliales y la inhibición de los procesos inflamatorios y de proliferación celular [46-50]. El amplio uso de la vitamina A en la clínica se ha limitado debido a su toxicidad, ya que las dosis terapéuticas usadas frecuentemente, inducen complicaciones como el síndrome de hipervitaminosis [46]. Sin embargo, la síntesis de la primera generación de derivados del ácido retinoico, como el ácido retinoico all-trans (ARat), mostró una mejoría en la eficacia terapéutica con menor toxicidad [46]. En la vía canónica de la síntesis del ácido retinoico, el retinol se une a la proteína de unión al retinol (RBP) en sangre, lo que permite su transporte y su migración intracelular, donde se metaboliza a retinal por las enzimas deshidrogenasas de retinol (RDHs). Posteriormente se oxida a retinaldehído por las enzimas deshidrogenasas de retinaldehído (RALDHs), con su eventual oxidación a ácido retinoico (Esquema 11) [51]. Posteriormente, el ácido retinoico ejerce sus efectos cuando se une a los receptores citoplasmáticos de ácido retinoico (RARs), los cuales heterodimerizan con los receptores a

retinoides X (RXRs), permitiendo la activación de los elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs) en los genes blanco (Esquema 11). En los últimos 20 años, las acciones diversas y críticas del ácido retinoico se han esclarecido en varios procesos patológicos, desde la biología del cáncer hasta el tratamiento de enfermedades de la piel y el riñón [48-50].



**Esquema 11. Mecanismo de acción del ácido retinoico en la célula.** El retinol entra en la célula y después se oxida a retinal y a ácido retinoico al trans (ARat). El ARat se une al receptor de ácido retinoico (RAR), y posteriormente a los elementos de respuesta a ácido retinoico promoviendo la transcripción de genes blanco. RBP, proteína de unión al retinol; ROH, retinol; RCHO, retinaldehído.

### ***Papel del ácido retinoico en el desarrollo renal***

Durante la etapa fetal, el número final de nefronas se determina por la ramificación de la yema uretérica, a partir de la cual se desarrolla el sistema colector renal completo. En diversos estudios se ha demostrado que la señalización inducida por el ácido retinoico es crítica para esta ramificación en la nefrogénesis y el establecimiento del número final de nefronas durante el desarrollo renal [52-54]. Batourina et al., demostraron que el ácido retinoico regula la expresión del receptor de cinasas de tirosina, ret, en la yema uretérica

durante el desarrollo renal [54]. La alteración de la señalización del ácido retinoico limita la ramificación de la yema uretérica obstaculizando de esta forma el desarrollo de los túbulos colectores [54]. Además, en los ratones la carencia de la enzima Raldh2, la cual se requiere para la oxidación irreversible del retinaldehído a ácido retinoico, es letal debido al bajo nivel de ácido retinoico y a fallas en la organogénesis [55,56]. La evidencia descrita anteriormente, revela el papel esencial del ácido retinoico en el desarrollo renal.

#### *Ácido retinoico all trans (ARat) en la diabetes*

El ARat es un compuesto derivado de la vitamina A biológicamente activo y se ha demostrado que es esencial en diversos procesos fisiológicos, por que participa en la regulación de la expresión de cerca de 530 genes [57,58]. El ARat se produce a partir del retinol mediante dos pasos de oxidación: en el primero, el retinol se oxida a retinaldehído y posteriormente el retinaldehído se oxida a ARat. En diversos estudios se ha demostrado que el ARat actúa como una molécula señalizadora importante en las interacciones epitelio/mesénquima durante el desarrollo del riñón, pulmón, sistema nervioso central e intestino [54,59-61]. Además, se han considerado a los retinoides como factores insulinoatrópicos [62,63] y su deficiencia se relaciona con la diabetes tipo 1 [64,65]. Existe información escasa acerca del metabolismo del ARat en la diabetes, incluyendo la nefropatía diabética. Starkey et al., (2010) describieron que existen alteraciones en el metabolismo del ARat en condiciones diabéticas, que conllevan a una disminución en la concentración renal de ARat y sugirieron que esto sucede de manera frecuente en pacientes con diabetes tipo 2 que manifiestan daño renal [66]. Además, se ha encontrado que existe una disminución en la concentraciones plasmática y renal de la proteína RBP en las ratas tratadas con estreptozotocina, lo que disminuye la biodisponibilidad de ARat circulante [67]. Estos hallazgos sugieren que la administración exógena de ARat podría ejercer un efecto terapéutico en el daño renal inducido por la diabetes, lo que concuerda con los hallazgos de Han et al., (2004), quienes describieron que el tratamiento con ARat disminuye la expresión renal y la excreción del péptido quimioatractivo de monocitos (MCP)-1 y la proteinuria en el modelo experimental de diabetes inducida con STZ. Además, en los podocitos cultivados a altas concentraciones de glucosa, el ARat disminuye la expresión del ARNm y de la proteína de MCP-1. Estos hallazgos sugieren que el ARat

ejerce efecto antiinflamatorio en la etapas iniciales de la nefropatía diabética. Además se ha descrito que el ARat ejerce efecto antioxidante ya que disminuye la lipoperoxidación en la diabetes inducida por STZ [68]. Por otro lado se cree que el ARat es un componente obligatorio en la diferenciación de las células epiteliales que lleva al establecimiento de la integridad epitelial, ya que se ha descrito que el ARat aumenta la expresión de ZO-1 y ocludina en las células del epitelio pigmentario de la retina humana [69]. Con base en los hallazgos previamente descritos, se utilizó el ARat para evaluar su efecto sobre el daño renal y el estrés oxidante inducido por la diabetes, así como sobre la expresión de las proteínas de la UE.

## **8. Papel fisiológico de la aldosterona**

Dado que se ha sugerido que la aldosterona además de regular la ruta de transporte transcelular de iones, también puede regular la vía paracelular a través de la regulación de la expresión y fosforilación de las claudinas en la nefrona distal, a continuación se describen los mecanismos fisiológicos clásicos de la aldosterona y finalmente se menciona la evidencia *in vitro* que se tiene sobre la regulación de las claudinas por esta hormona.

La aldosterona es una hormona mineralocorticoide involucrada en la regulación y homeostasis del agua y de los electrolitos al estimular el transporte de iones en la nefrona distal [70]. La aldosterona se sintetiza en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales y su síntesis parte del colesterol. Dentro de las principales enzimas que participan en la síntesis de aldosterona se encuentran la colesterol desmolasa (enzima limitante) y la sintasa de aldosterona. Una vez que la aldosterona se secreta, cerca del 37% permanece en circulación y el resto se une a proteínas (principalmente la albúmina). Para que la aldosterona no sea blanco de la enzima deshidrogenasa de 11 $\beta$ -hidroxiesteroides (11 $\beta$ HSD2), el grupo aldehído se cicla con el grupo hidroxilo en el carbono 11 para formar la estructura hemiacetal. La secreción de la aldosterona por las células de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal es independiente de la regulación del cortisol y los andrógenos y existen al menos tres mecanismos que la controlan:

1. *El sistema renina-angiotensina.* La angiotensina II es el principal secretagogo de la síntesis de aldosterona. Esta hormona se une a sus receptores de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>) expresados en la membrana de las células de la zona glomerulosa. Este

receptor se encuentra acoplado a las proteínas Gq lo que ocasiona un aumento en el nivel de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) lo que genera un aumento en el nivel de calcio citosólico y finalmente a la vasoconstricción. El aumento en el nivel de calcio en la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal inducen la secreción de aldosterona.

2. *La concentración de potasio sérico.* El ión potasio estimula directamente la secreción de aldosterona. Además activa localmente al sistema renina-angiotensina en la capa glomerulosa de la corteza suprarrenal. Un aumento muy pequeño en la concentración de potasio sérico de 0.1 mEq/L estimula el aumento en el nivel de aldosterona plasmática.
3. *La concentración de la hormona adenocorticotrópica (ACTH).* Cantidades fisiológicas de la ACTH estimulan la secreción de aldosterona.

El nivel sérico normal de la aldosterona en humanos es alrededor de 50-100 ng/mL. Esta hormona se metaboliza principalmente en el hígado, se elimina por bilis y orina, y a nivel hepático se produce una conjugación de grupos sulfato y glucorónicos lo que aumenta su solubilidad.

#### *Acciones genómicas de la aldosterona*

Debido a su liposolubilidad, la aldosterona difunde fácilmente al interior de las células donde interactúa con el receptor de mineralocorticoides, acción que se conoce como efecto genómico de la aldosterona (Esquema 12). La mayoría de las acciones conocidas de esta hormona ocurren a través de la activación de los receptores de mineralocorticoides (RM), que regulan la transcripción de diversos genes. Una vez que se forma el complejo aldosterona-receptor en las células de la nefrona distal (que comprende el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el ducto colector), este se traslada al núcleo donde se une a regiones promotoras de diversos genes que contienen elementos de respuesta a mineralocorticoides. Los genes más conocidos son los que codifican para el transportador de NaCl, para la subunidad alfa del canal epitelial de sodio (ENaC), el canal epitelial de potasio (ROMK) y la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> localizados en el túbulo distal y en el túbulo colector [71-73]. (Esquema 12). El aumento en la expresión de estas proteínas produce la

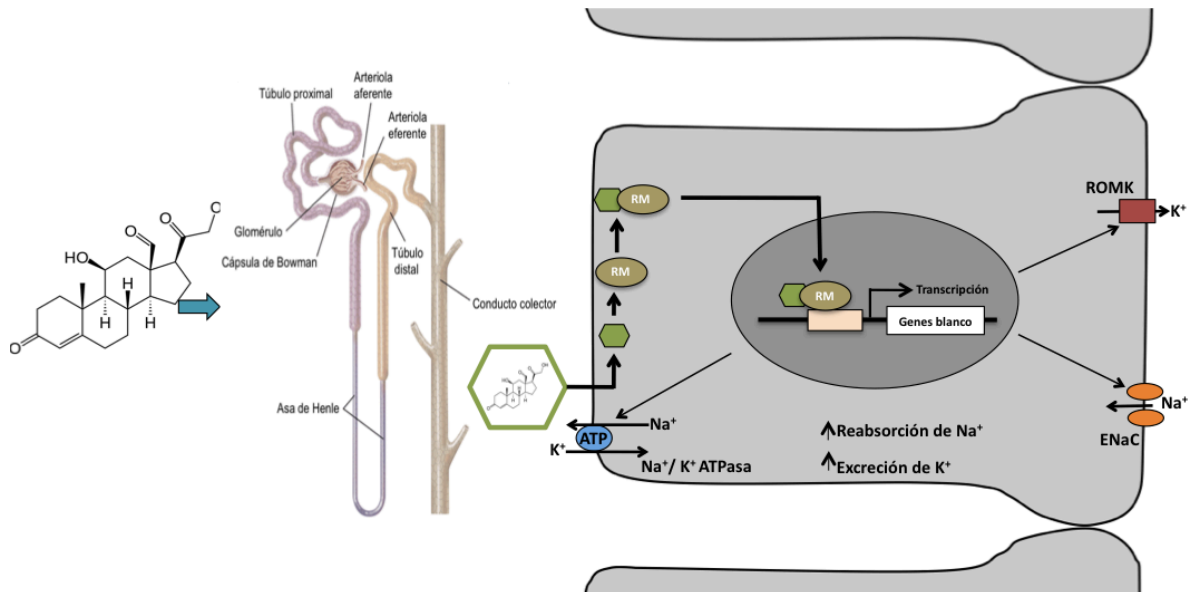


acción clásica conocida de esta hormona que es aumentar la reabsorción de sodio y la secreción de potasio.

***Espironolactona: antagonista de los receptores de mineralocorticoides***

La espironolactona es un diurético que se une al receptor de mineralocorticoides y se utiliza en el tratamiento de la hipertensión esencial, la insuficiencia cardiaca, la cirrosis hepática, el síndrome nefrótico y la diabetes. La espironolactona se absorbe por el tracto digestivo en un 70 al 90% después de su administración vía oral y se metaboliza principalmente en el hígado. Su vía de eliminación es principalmente urinaria y solo un pequeño porcentaje se elimina por la vía biliar. La espironolactona inhibe de modo competitivo la unión de la aldosterona a su receptor de mineralocorticoides presente principalmente en el túbulo distal y colector de la nefrona. Actúa como un diurético que causa un aumento en la excreción de sodio y agua, pero preserva al potasio y el magnesio.

En la diabetes existe un aumento en la activación del sistema renina-angiotensina y en la producción de aldosterona, esta última se ha descrito que contribuye de manera importante en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética [74,75]. Además de su papel fisiológico en la regulación del transporte iónico en la nefrona distal, se ha descrito que en circunstancias de hiperaldosteronismo, la aldosterona promueve la inflamación, el remodelaje y la fibrosis en diversos tejidos [76,77], mientras que la inhibición en la producción de aldosterona inducida por los agentes antihipertensivos amilodiptina y aliskeren, disminuye el estrés oxidante en ratas diabéticas [78]. Existe también evidencia de que el bloqueo de las acciones de la aldosterona mediante el uso de la espironolactona tiene un efecto protector en la nefropatía diabética al disminuir el estrés oxidante, la inflamación, la apoptosis y la fibrosis de las células renales [79-84].



**Esquema 12. Mecanismo de acción de la aldosterona en la nefrona distal.** La aldosterona entra por difusión en las células de la nefrona distal (que comprende el túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector), donde se une al receptor de mineralocorticoides (RM) y promueve la transcripción de genes blanco como el canal de potasio ROMK, el canal epitelial de sodio ENaC y la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

En la ruta de transporte paracelular de iones, se ha sugerido que la aldosterona promueve la fosforilación *in vitro* de la claudina-4 y en consecuencia la estabilización de la proteína en la UE y el aumento en la conductancia paracelular de  $\text{Cl}^-$  en las células del conducto colector cortical de rata [29]. Las cinasas WNK1 y WNK4, codificadas por dos genes asociados a un desorden hipertensivo heredado llamado pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAII), fosforilan a las claudinas 1-4 y -7 e inducen un aumento en la permeabilidad paracelular de  $\text{Cl}^-$  en los cultivos de células epiteliales [85,86]. Como la aldosterona aumenta la transcripción de la claudina-8 en el colon distal [87], se sugiere que se regula de manera similar en la nefrona distal.

## **II. Justificación**

La incidencia mundial de la diabetes se ha incrementado de manera alarmante en los últimos años. Esta enfermedad crónico-degenerativa afecta a cerca del 7.3% de la población mundial. Con el fin de diseñar estrategias terapéuticas para su control se han desarrollado diversos estudios de la fisiopatología de la diabetes. Una de las características importantes en esta patología es la hiperglucemia, que ocasiona complicaciones severas en diversos órganos del cuerpo. La nefropatía diabética es la principal causa de la enfermedad renal terminal y según reportes de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) cerca del 20-40% de los pacientes diabéticos desarrollan insuficiencia renal terminal. Las repercusiones de la insuficiencia renal en el organismo son diversas ya que bajo esta circunstancia el riñón es incapaz de eliminar a los compuestos tóxicos, de regular la presión arterial y de controlar el balance de agua y electrolitos en el cuerpo. Se han descrito diversos mecanismos fisiopatológicos para explicar el origen y la progresión de la insuficiencia renal en la nefropatía diabética. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios que describan alteraciones en las proteínas de la unión estrecha claudinas, ocludina y ZO<sub>s</sub> a lo largo de la nefrona. Estas proteínas están involucradas en el transporte paracelular de agua y solutos como Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el riñón, lo que constituye un aspecto importante en el mantenimiento renal de la homeostasis corporal. Es por esta razón que la búsqueda de alteraciones tempranas en estos procesos constituye un aspecto importante para la detección y tratamiento oportuno de la enfermedad renal antes del establecimiento de la nefropatía diabética irreversible. Por otro lado, se ha descrito que el estrés oxidante es una condición celular común en la diabetes y se ha establecido una relación directa entre este proceso y la progresión del daño celular y tisular sistémico. Por esta razón en este estudio se explora el estado oxidante del riñón con la finalidad de establecer una relación entre el estrés oxidante y las alteraciones en las proteínas de la unión estrecha en el epitelio tubular renal.

### **III. Hipótesis**

Como en la diabetes existe una disminución en la reabsorción renal de Na<sup>+</sup> y un aumento en la reabsorción de Cl<sup>-</sup>, y las claudinas funcionan como poros paracelulares iónicos, se espera que en condiciones diabéticas disminuya la expresión de la claudina-2 en el túbulo proximal y aumente la expresión de las claudinas-4 y -8 en el túbulo distal.

### **IV. Objetivo general**

Estudiar las alteraciones en la expresión y localización de las proteínas de la unión estrecha, de los transportadores de glucosa y el estrés oxidante en las etapas iniciales de la nefropatía diabética.

### **V. Objetivos particulares**

1. Evaluar la función renal en ratas con 3 semanas de diabetes.
2. Evaluar la expresión de los transportadores de glucosa: SGLTs 1 y 2 y GLUTs 1 y 2 en el túbulo proximal.
3. Evaluar el impacto de la hiperglucemia inducida por la diabetes sobre la expresión de las proteínas de la unión estrecha (UE): claudinas-1, 2, -4, -5 y -8, ocludina y ZO-1.
4. Evaluar el estrés oxidante mediante el ensayo de producción de anión superóxido en glomérulos y túbulos proximales y distales.
5. Evaluar el efecto del ácido retinoico *all trans* (ARat) sobre la expresión de las proteínas de la UE y la disfunción renal inducida por la diabetes.
6. Evaluar el papel de la aldosterona mediante el tratamiento con su inhibidor, la espironolactona, sobre la regulación de las proteínas de la UE en el túbulo distal y en la disfunción renal inducida por la diabetes.

## **VI. Materiales y métodos**

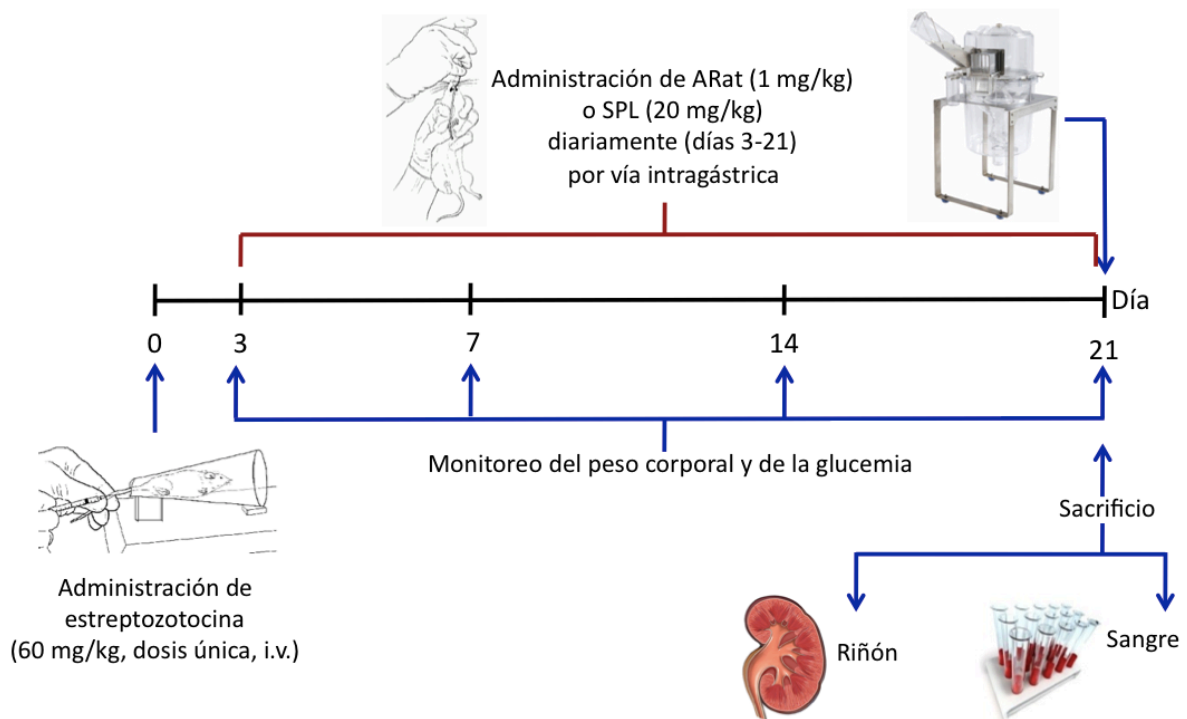
### **1. Diseño experimental y reactivos**

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se aprobaron por la Unidad Institucional de Producción y Experimentación con Animales de Laboratorio (UPEAL, protocolo # 491). Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar con un peso corporal entre 200-250 g. Las ratas se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) a  $22\pm 1$  °C de temperatura ambiente y  $50\pm 5\%$  de humedad ambiental. Los animales se mantuvieron con acceso libre a agua y alimento. La diabetes se indujo mediante la administración intravenosa de una dosis única de STZ (60 mg/kg de peso corporal) diluída en amortiguador de citratos, pH 6.0. Las ratas controles (no diabéticas) se inyectaron vía intravenosa con amortiguador de citratos, pH 6.0. Tres días después de la administración de STZ, se midió el nivel de glucemia con un glucómetro de la marca OneTouch Ultra® (Milpitas, CA, USA), las ratas se consideraron diabéticas cuando los niveles de glucemia superaron 300 mg/dL. El ARat y la SPL se administraron diariamente a las dosis de 1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal, respectivamente a partir del día 3 hasta el día 21 después de la administración de STZ (Esquema 13). El ARat se disolvió en aceite de cacahuete, mientras que la SPL se disolvió en carboximetilcelulosa al 0.2%, ambos compuestos se administraron vía intragástrica en un volumen de 250  $\mu$ L. En ambos casos se generaron 4 grupos experimentales: grupo control, se administró el vehículo de la STZ y del ARat o SPL; grupo DBT (diabetes), se administró STZ y el vehículo del ARat o SPL; grupo DBT+ARat o SPL, se administró STZ y ARat o SPL diariamente y grupo ARat o SPL, se administró el vehículo de la STZ y ARat o SPL. Las ratas se sacrificaron 21 días después de la administración de STZ (Esquema 13). Los reactivos empleados se adquirieron en su mayoría de Sigma-Aldrich Co., a menos que se especifique la compañía. Se muestra la lista de anticuerpos, así como la dilución que se usó en los ensayos de Western blot, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación y la casa comercial de donde se adquirieron (Tabla 2).

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados para Western blot (WB), inmunofluorescencia (IF) e inmunoprecipitación (IP).

Anticuerpo (especie)	Dilución	Casa comercial	No. Catálogo
Alexa-flúor 488 (conejo)	1:300 (IF)	Invitrogen	A21206
Alexa-flúor 488 (cabra)	1:300 (IF)	Invitrogen	A11055
Alexa-flúor 594 (ratón)	1:300 (IF)	Invitrogen	A21203
$\alpha$ -ATPasa (conejo)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-48345
Claudina-1 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	37-4900
Claudina-2 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	32-5600
Claudina-2 (ratón)	1:1000 (WB); 10 $\mu$ g (IP)	Invitrogen	51-6100
Claudina-4 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	36-4800
Claudina-4 (ratón)	1:1000 (WB); 10 $\mu$ g (IP)	Invitrogen	32-9400
Claudina-5 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	34-1600
Claudina-8 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	40-2600
Claudina-8 (cabra)	1:1000 (WB); 10 $\mu$ g (IP)	Santa Cruz Biotech.	sc-33065
$\beta$ -dístroglicano (ratón)	10 $\mu$ g (IP)	Santa Cruz Biotech.	sc-33702
CD4 (cabra)	10 $\mu$ g (IP)	Santa Cruz Biotech.	sc-1140
CUL3 (conejo)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	C0871
DMPK (ratón)	1:100 (IF)	MP Biomedicals	IC695421
DppD (ratón)	1:300 (IF)	AbD Serotec	MCA924
eNOS (conejo)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-654
GAPDH (ratón)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-47724
GLUT1 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Millipore Corp	PM408AA
GLUT2 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Millipore Corp	07-1402
gp91 <sup>phox</sup> (cabra)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-5827
HO-1 (conejo)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	H4535
iNOS (conejo)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-651
KIM-1 (cabra)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	R&D Systems	AF3689
nNOS (conejo)	1:1000 (WB)	BD Trans-Lab	610310
Nrf2 (conejo)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	SAB45011984
3-NT (ratón)	1:1000 (WB)	Millipore Corp.	06-284
Ocludina (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	71-1500
Ocludina (ratón)	10 $\mu$ g (IP)	Invitrogen	33-1500
Peroxidasa-conjugado (conejo)	1:10000 (WB)	Invitrogen	65-6120
Peroxidasa-conjugado (ratón)	1:10000 (WB)	Invitrogen	62-6520
Peroxidasa-conjugado (cabra)	1:10000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-2020
PKC $\beta$ 2 (conejo)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	SAB1306182
Poliubiquitina (ratón)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-16655
pSer (conejo)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich	SAB5200086
pSer (ratón)	1:1000 (WB)	Millipore Corp.	05-1050
pThr (ratón)	1:1000 (WB)	Millipore Corp.	525286
p47 <sup>phox</sup> (cabra)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-7660
SGLT1 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Millipore Corp	07-1417
SGLT2 (cabra)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	sc-20583
SGK1 (conejo)	1:1000 (WB)	Millipore Corp.	36-002
SUMO-1 (conejo)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	sc-9060
$\alpha$ -tubulina (ratón)	1:1000 (WB)	Abcam	Ab7291
VE-cadherina (ratón)	1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	sc-6458
WNK4 (cabra)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	sc-20475
ZO-1 (conejo)	1:1000 (WB); 1:100 (IF)	Invitrogen	61-7300

$\alpha$ -ATPasa (subunidad alfa de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>); CUL3 (culina3); GLUT (transportador de glucosa); DMPK (desmoplaquina); DppD (dipeptidilpeptidasa); GAPDH (deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato); HO-1 (Hemo Oxigenasa-1); KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1); NOS (sintasa de óxido nítrico); Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2); 3-NT (3-nitrotirosina); PKC $\beta$ 2 (proteína cinasa C beta 2); SGLT (cotransportador de sodio-glucosa); SGK1 (Serum and Glucocorticoid-induced Kinase-1); SUMO-1 (Small Ubiquitin-related MOdifier-1); WNK4 (With No-Lysine Kinase-4) y ZO-1 (Zonula Ocludens-1).



**Esquema 13.** Esquema de la administración de estreptozotocina, ácido retinoico *all-trans* (ARat) y espironolactona (SPL) y de la obtención de las muestras biológicas.

## 2. Evaluación de los parámetros fisiológicos y bioquímicos

Se monitoreó la glucemia, el consumo de agua y de alimento en condiciones previas a la administración de STZ y cada 7 días después de la inducción de la diabetes. Para medir el consumo de agua y alimento, se adicionaron a la caja metabólica 500 mL de agua purificada y 100 g de alimento (PMI, 5008, Purina, Alief City, TX, USA) y se pesaron las cantidades remanentes 24 h después para determinar la cantidad consumida por día. Para recolectar las muestras urinarias de 24 h, las ratas se metieron en jaulas metabólicas 24 h previas al sacrificio y se midió el volumen urinario (Esquema 13). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital de sodio (30 mg/kg vía intraperitoneal) y se recolectó la sangre antes del sacrificio por punción cardiaca (Esquema 13). La sangre se centrifugó (800 x g durante 10 min) para obtener el suero. Para evaluar la función renal se midió la proteinuria, la natriuresis, la FeNa y la FeK. La proteinuria se midió mediante el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La creatinina urinaria y sérica se midió mediante el método de Jaffé como se describió previamente [88]. Debido a que las ratas diabéticas presentan poliuria, la proteinuria se corrigió por la cantidad urinaria de creatinina ya que esto podría sobreestimar la proteinuria en el grupo diabético.

Por esta razón, se calculó el cociente proteinuria/creatinina y ambos parámetros se expresaron en unidades de mg/dL. Para evaluar la función tubular se midió la natriuresis, el nivel sérico de potasio, la excreción fraccional de sodio (FeNa) y de potasio (FeK), estas dos últimas se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

Excreción fraccional (%) = (depuración de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> / depuración de creatinina) x 100.

Depuración = ([Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o creatinina]orina / [Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o creatinina]suero)\*flujo urinario en 24 h (mL/min)

Las concentraciones séricas y urinarias de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se midieron por espectrofotometría de absorción atómica (PerkinElmer 3100 con una flama de aire-acetileno, Norwalk, CT, USA). La glucosa urinaria se midió con un estuche comercial que se basa en el método de la hexocinasa (Randox Laboratories, San Diego, CA, USA). La excreción urinaria de nitratos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitritos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se midió con un estuche colorimétrico (BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA). La aldosterona se midió con un estuche de Elisa (BioVendor, Asheville, NC, USA).

### **3. Obtención de tejido renal**

Los riñones obtenidos de los diferentes grupos experimentales se perfundieron con solución salina isotónica (SSI, 0.9% NaCl), se descapsularon, se pesaron, se aisló la corteza y se mantuvieron en SSI a 4°C. Posteriormente se criopreservaron, para ello se sumergieron en 2-metilbutano a 4°C y finalmente se conservaron en nitrógeno líquido hasta el día de los experimentos.

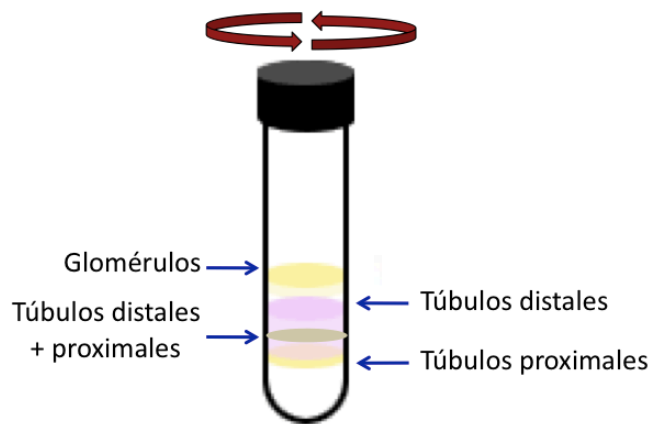
### **4. Aislamiento de glomérulos, túbulos proximales y distales mediante gradientes de Percoll**

Los glomérulos se aislaron de la manera descrita previamente [89]. En resumen, la corteza renal se homogeneizó manualmente y se pasó a través de una malla de acero inoxidable con un tamaño de poro de 117 µm (Cat. No. 8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA.) aplicando presión con el fondo de un matraz. El tejido obtenido se lavó varias veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se transfirió a una segunda malla con un tamaño de poro de 74 µm (Cat. No. 8321A58; Thomas Scientific). Después de varios lavados con PBS frío, se recuperó el tejido de la parte superior de la malla, el cual contenía



los glomérulos aislados, y se centrifugó en PBS frío durante 10 min a 20 000 x g. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el botón final.

Los túbulos proximales y distales se aislaron mediante gradientes de Percoll de la manera descrita previamente [4]. En resumen, se aisló la corteza renal de una mezcla de 3 ratas por grupo experimental, esto debido a que el rendimiento del aislamiento es escaso. Las cortezas se lavaron en solución de Ringer-Krebs-Bicarbonato (RKB) que contenía, en mM: 110 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 0.7 MgSO<sub>4</sub>, 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 acetato de sodio, 5.5 glucosa, 5 alanina, y 0.5 g/L de albúmina sérica bovina (ASB), pH 7.4 y osmolaridad de 290 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O. Las cortezas se lavaron 3 veces y se resuspendieron en 3 mL de RKB con 15 mg de colagenasa tipo II (de *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich Co.) y 0.5 mL de ASB al 10%. Las muestras se gasificaron durante 20 min con 95% de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico en un baño de agua con agitación vigorosa a 37°C. Después de la agitación, se adicionaron 20 mL de RKB frío que contenía cocktail de inhibidores de proteasas (Complete 1x; Boehringer Mannheim, Alemania) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 20 g/mL), la mezcla se agitó vigorosamente para dispersar los fragmentos de tejido. La suspensión se filtró para remover las fibras de colágeno y se centrifugó (18 x g/10 min). El botón se resuspendió en 10 mL de RKB frío que contenía un cocktail de inhibidores de proteasas y se centrifugó nuevamente (18 x g/10 min). Este procedimiento de lavado se repitió una vez más. Finalmente, el botón se resuspendió en 5 mL de ASB al 5% con un cocktail de inhibidores de proteasas y se incubó durante 5 min a 4 °C, posteriormente se centrifugó (18 x g/10 min) y el botón se resuspendió en una mezcla de 30 mL de solución de Percoll fría y RKB (1:1, v/v). Finalmente, la suspensión se centrifugó (1071 x g/35 min) y después se obtuvieron 4 bandas. La primera banda enriquecida en glomérulos, la segunda banda contenía túbulos distales, la tercera banda contenía una mezcla de túbulos distales y proximales y la cuarta banda contenía túbulos proximales (Esquema 14). El contenido de cada banda se confirmó mediante observación en un microscopio de luz. Es importante mencionar que aunque mediante los gradientes de Percoll se obtienen glomérulos en la primera banda, estos se aíslan en una cantidad escasa, por esta razón el aislamiento de glomérulos se realizó mediante mallas de acero inoxidable de diferente poro como se describió previamente.



**Esquema 14.** Aislamiento de glomérulos, túbulos proximales y distales mediante gradientes de Percoll.

### 5. Extracción de proteínas totales y de las fracciones soluble e insoluble

Para realizar la extracción de las proteínas totales, la corteza renal de 3 ratas por cada grupo experimental, se lavó tres veces con RKB frío y se resuspendió en 10 mL de RKB con 15 mg de colagenasa tipo II. Las muestras se gasificaron durante 20 min con 95% de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico en un baño de agua a 37°C con agitación vigorosa. Después de la agitación, se adicionaron 20 mL de RKB frío que contenía al cocktail de inhibidores de proteasas (Complete 1x; Boehringer Mannheim, Alemania) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 20 g/mL) para inactivar la colagenasa. La suspensión se filtró para remover las fibras de colágeno y se centrifugó (18 x g/10 min). El botón se resuspendió en 10 mL de RKB frío que contenía un cocktail de inhibidores de proteasas y se centrifugó nuevamente (18 x g/10 min). Este procedimiento de lavado se repitió una vez más. El botón final se resuspendió en 300 µL de amortiguador de extracción RIPA, que contenía, en mM: 40 Tris-HCl, 150 NaCl, 2 EDTA, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio y 0.2% de dodecil sulfato de sodio (SDS) a pH 7.6 y se incubó durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se sonicaron 3 veces durante 30 s cada vez en un sonicador ultrasónico de alta intensidad (Vibra Cell; Sonic & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) y se centrifugaron a 20 000 x g a 4°C durante 40 min. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes los cuales contenían las proteínas totales de corteza renal.

Las fracciones de proteínas solubles (citoplasmática) e insolubles (membranal) se obtuvieron de la manera descrita previamente [90]. En resumen, el método fue similar al de extracción de las proteínas totales descrito previamente, hasta el paso de lavado de la colagenasa tipo II. Posteriormente, el botón se resuspendió en amortiguador MBL, que

contenía, en mM: 50 Tris-HCl, 100 NaCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 CaCl<sub>2</sub>, 1% de Tritón X-100 y 1% de Nonidet P-40 con un cocktail de inhibidores de proteasas y PMSF (20 µg/mL) a pH 7.4. Las muestras se centrifugaron a 20 000 x g a 4 °C durante 10 min y finalmente se recolectó el sobrenadante (fracción soluble). El botón (fracción insoluble) se lisó con amortiguador de RIPA durante 30 min a 4 °C y se sonicó 3 veces durante 30 s cada vez en un sonicador ultrasónico de intensidad alta (Vibra Cell; Sonic & Materials, Inc., Danbury, CT, USA). Finalmente, se centrifugó a 20 000 x g a 4°C durante 40 min y se recolectó el sobrenadante el cual contenía las proteínas de la fracción insoluble (membranal). La cuantificación de las proteínas totales y de las fracciones soluble e insoluble se realizó mediante el estuche Micro BCA-protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

## **6. Western blot**

El análisis de la expresión de las proteínas mediante Western blot se realizó de la manera descrita previamente [90]. En resumen, las muestras se diluyeron (1:5) en amortiguador de Laemmli con urea (5 M) y se desnaturalizaron por calentamiento durante 12 min. Las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 12%. En paralelo con las muestras se cargaron marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) para la identificación correcta de las proteínas a analizar. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). Las uniones no específicas se bloquearon con una disolución de leche baja en grasa al 5% disuelta en PBS con 0.05 % de Tween 20. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios mostrados en la tabla 2. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 10 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios mencionados en la tabla 2. Después de tres lavados (con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 10 min), las membranas se revelaron con el reactivo de detección ECL Prime Western blotting (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La quimioluminiscencia se detectó mediante el sistema EC3 imaging system (UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK). La densitometría de las bandas se cuantificó mediante transmitancia (UVP BioImaging Systems software).

## **7. Análisis de los dímeros y monómeros de la eNOS**

El análisis mediante Western blot de los monómeros y dímeros de la eNOS se realizó en condiciones no desnaturalizantes a baja temperatura como se describió previamente. En resumen, las proteínas totales de homogenados de corteza renal sin hervir se mezclaron con el amortiguador de carga Laemmli 5X y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12 %. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol). Los geles y los amortiguadores se mantuvieron a 4 °C durante todo el proceso. Los anticuerpos primario y secundario se mencionan en la tabla 2.

## **8. Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación de la claudina-2 y la ocludina se realizó a partir de túbulos proximales aislados y la de las claudinas-4 y -8 y WNK4 se realizó a partir de túbulos distales aislados. Los anticuerpos y la cantidad empleada para inmunoprecipitar a las proteínas se mencionan en la tabla 2. La inmunoprecipitación se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 mg de proteínas totales se pre-clarificó con 20  $\mu$ L de proteína G-agarosa recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 16 h a 4 °C. Las perlas de proteína G-agarosa se removieron mediante centrifugación (16 000 x g a 4 °C durante 10 min) y los extractos pre-clarificados se incubaron durante 16 h a 4 °C con las cantidades mencionadas de anticuerpos precipitantes mencionados en la tabla 2, los cuales se unieron previamente con la proteína G-agarosa recombinante (durante 16 h a 4 °C). Como control negativo se realizaron en paralelo inmunoprecipitaciones inespecíficas con los anticuerpos no relacionados: anti- $\beta$ -dístroglicano (para las claudinas-2, -4 y -8), anti-VE-cadherina (para la ocludina) y anti-CD4 (para la WNK4). Finalmente, los complejos inmunes se recolectaron mediante centrifugación (16 000 x g a 4 °C durante 10 min) y se lavaron tres veces con amortiguador de RIPA (16 000 x g a 4 °C durante 10 min) y después se sometieron a SDS-PAGE en geles al 12% como se describió anteriormente.

## **9. Inmunofluorescencia**

Las muestras de riñón se prepararon para inmunofluorescencia como se describió previamente [90]. En resumen, se cortaron rebanadas transversales de riñón de aproximadamente 0.5 cm de espesor y se sumergieron durante 5 min en 2-metilbutano a 4

°C para congelarlas posteriormente en nitrógeno líquido. Se cortaron rebanadas de 8 µm de espesor en un crióstato (Leica CM 1510 Cryostat, Wetzlar, Alemania) y se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina que se conservaron a -70 °C hasta el día de los experimentos. Para los experimentos de inmunofluorescencia, los cortes se fijaron en metanol (10 min a 4 °C) y después se re-hidrataron con PBS con Ca<sup>2+</sup> 1 mM (5 min a temperatura ambiente) y se permeabilizaron con PBS con 1% Tritón X-100 (durante 5 min a temperatura ambiente) y se lavaron tres veces (PBS con Ca<sup>2+</sup> 1 mM). Las muestras se bloquearon (1 h a temperatura ambiente) con 1% (v/v) de ASB libre de IgGs (1331-A, Research Oraganics, Cleveland, OH, USA) y se incubaron con los anticuerpos primarios mencionados en la tabla 2 (16 h a 4 °C). Los glomérulos se marcaron con VE-cadherina y los túbulos proximales y distales con DppD y DMPK, respectivamente. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos. Los anticuerpos secundarios (mencionados en la tabla 2), se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS con Ca<sup>2+</sup> 1 mM (durante 10 min a temperatura ambiente) y finalmente se montaron las preparaciones con Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA). Las inmunofluorescencias se analizaron con un microscopio confocal invertido (TCS-SP8, Leica, Heidelberg, Alemania). Los experimentos se realizaron de manera independiente al menos tres veces en tres animales diferentes por grupo. Como control negativo, las laminillas se marcaron de manera específica en ausencia de los anticuerpos primarios.

#### **10. Extracción del ARN, síntesis del ADNc y qRT-PCR**

La extracción de ARN total se realizó a partir de corteza renal empleando el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ARN se midió con el espectrofotómetro Genesis 10 uv (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) y la integridad se determinó mediante electroforesis en gel. La síntesis de ADNc se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 5 µg de ARN total se mezclaron con 1X de amortiguador First-Strand (que contiene, en mM: 250 Tris-HCl, 375 KCl, 15 MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3), 10 mM DTT y 0.5 mM de cada desoxinucleótido trifosfatado, 150 ng de cebadores y 200 U de M-MLV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron durante 50 min a 37 °C. Posteriormente se inactivaron a 70 °C durante 15 min. La RT-PCR se realizó empleando el sistema SDS 7500 (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA) con el sistema de detección SYBR Green. La reacción se llevó a cabo en un volumen de reacción final de 12.5  $\mu$ L que contenía 7.5  $\mu$ L de Maxima SYBR Green 2X/ROX qRT-PCR Master Mix, 0.5  $\mu$ M de cada cebador (sentido y antisentido) y 5  $\mu$ L de soluciones de ADNc. El perfil térmico para la RT-PCR fue: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y a 60 °C durante 60 s. La expresión de los genes individuales se normalizó con la expresión del gen de la GAPDH y el nivel de ARNm se midió por el método Ct comparativo. En la tabla 3, se menciona la secuencia sentido y antisentido de los cebadores empleados y la longitud de los segmentos amplificados.

Tabla 3. Cebadores empleados en el ensayo de qRT-PCR

Gen	Secuencia 5' $\rightarrow$ 3'	Longitud del producto ampliado
Claudina-4	Sentido: GCCAGCAACTATGTGTAAG	75
	Antisentido: GCCGTTATGAGTTCAATCC	
Claudina-8	Sentido: CCGAGCATATACTCCAAA	154
	Antisentido: GTACGAGGCAGTTAAGAA	
GAPDH	Sentido: CTTGGGCTACACTGAGGACC	100
	Antisentido: CTGTTGCTGTAGCCGTATTC	
WNK4	Sentido: TAGACTGGCACCCATATC	76
	Antisentido: TGGTTCCTTGGATGAAGT	

GAPDH (deshidrogenasas del gliceraldehído 3-fosfato) y WNK4 (With No-Lysine Kinase 4).

## 11. Evaluación del estrés oxidante

La producción de ERO, la lipoperoxidación (marcador de daño a lípidos), la oxidación de proteínas (marcador de daño a proteínas) y el contenido celular de GSH se midieron en homogenados de corteza renal de los diferentes grupos experimentales como se describió previamente [91]. Para ello, la corteza renal se homogeneizó en un politrón (Modelo PT 2000; Brinkmann, Westbury, NY, USA) durante 10 s en PBS (50 mM) que contenía 0.1% de Tritón X-100, BHT (0.5 M), leupeptina (5  $\mu$ g/mL), pepstatina (7  $\mu$ g/mL) y aprotinina (5  $\mu$ g/mL) a pH 7.0. Los homogenados se centrifugaron a 19 000 x g a 4 °C durante 30 min y el sobrenadante se separó para cuantificar las proteínas totales mediante el método de Lowry y los marcadores de estrés oxidante.

La producción de ERO se midió de acuerdo con lo reportado previamente [91]. En resumen, se incubaron alícuotas de 1.5 mL de homogenados de corteza renal (50 mg) con 0.5 mL de DCFH-DA (5  $\mu$ M) a 37 °C durante 1 h. Se midió la fluorescencia al final de la incubación a una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 525 nm en un lector de fluorescencia Synergy HT multimode microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Se empleó una curva estándar con concentraciones crecientes de DCF, la cual se incubó en paralelo con las muestras. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF)/mg de proteínas totales.

La lipoperoxidación se midió mediante la cuantificación de MDA y 4-HNE usando una curva estándar de tetrametoxipropano como se describió previamente [91]. Para ello, se mezcló una solución de 1-metil-2-fenilindol en una mezcla de acetonitrilo:metanol (3:1) con las muestras, y se inició la reacción adicionando 37% de HCl. La densidad óptica se midió a 586 nm después de 1 h de incubación a 45 °C. Los datos se expresaron como nmol de MDA+4-HNE /mg de proteínas totales.

La oxidación de proteínas se midió mediante la cuantificación de los grupos carbonilo en las muestras de corteza renal. Las muestras se incubaron durante 16 h con sulfato de estreptomina para remover los ácidos nucleicos. Posteriormente, los homogenados se trataron con dinitrofenilhidrazina (DNPH) y HCl y finalmente con hidrocloreuro de guanidina. El fundamento de la cuantificación se basa en la reacción de los complejos proteína-hidrazona debido a la reacción de los grupos carbonilo con la DNPH. La absorbancia se midió a 370 nm. El contenido de grupos carbonilo se expresó como nmol/mg de proteína.

El contenido celular de GSH se midió empleando monoclorobimano, de la manera descrita previamente [91]. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 385 nm y de emisión de 478 nm en un lector de placas Synergy HT multimode microplate (Biotek Instruments). El nivel intracelular de GSH se expresó como  $\mu$ mol/mg de proteína.

La producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) se evaluó en glomérulos y túbulos proximales y distales aislados como se describió previamente por el método de quimioluminiscencia con lucigenina [92]. El fundamento se basa en que la lucigenina reacciona con el  $O_2^-$  y emite luz, la cual se detecta mediante luminiscencia. En resumen, las secciones de la nefrona se homogeneizaron en amortiguador PBS empleando un homogeneizador de tipo Dounce (100

golpes en hielo). Los homogenados se centrifugaron a baja velocidad (800 x g, a 4 °C durante 10 min) para remover los restos celulares. Los sobrenadantes se utilizaron inmediatamente. Para iniciar el ensayo, se mezclaron 100 µL de homogenados con 900 µL de PBS 50 mM pH 7.0 que contenía 1 mM de EGTA, 150 mM de sacarosa, 5 µM de lucigenina y los sustratos o inhibidores correspondientes, en mM: 0.1 NADH, 1 L-arginina, 0.1 xantina, 5 succinato, 0.1 DPI o 1 L-NAME. La emisión de los fotones en términos de unidades de luz relativa se midió cada 5 min durante 30 min a una longitud de onda de excitación de 368 nm y de emisión de 505 nm usando un lector de placas Synergy HT multimode microplate (Biotek Instruments). El contenido de proteínas se cuantificó por el método de Lowry mediante el estuche colorimétrico de Bio-Rad. La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se normalizó a 1 en los grupos controles y los grupos experimentales se expresaron con respecto al número de veces de aumento con respecto al grupo control.

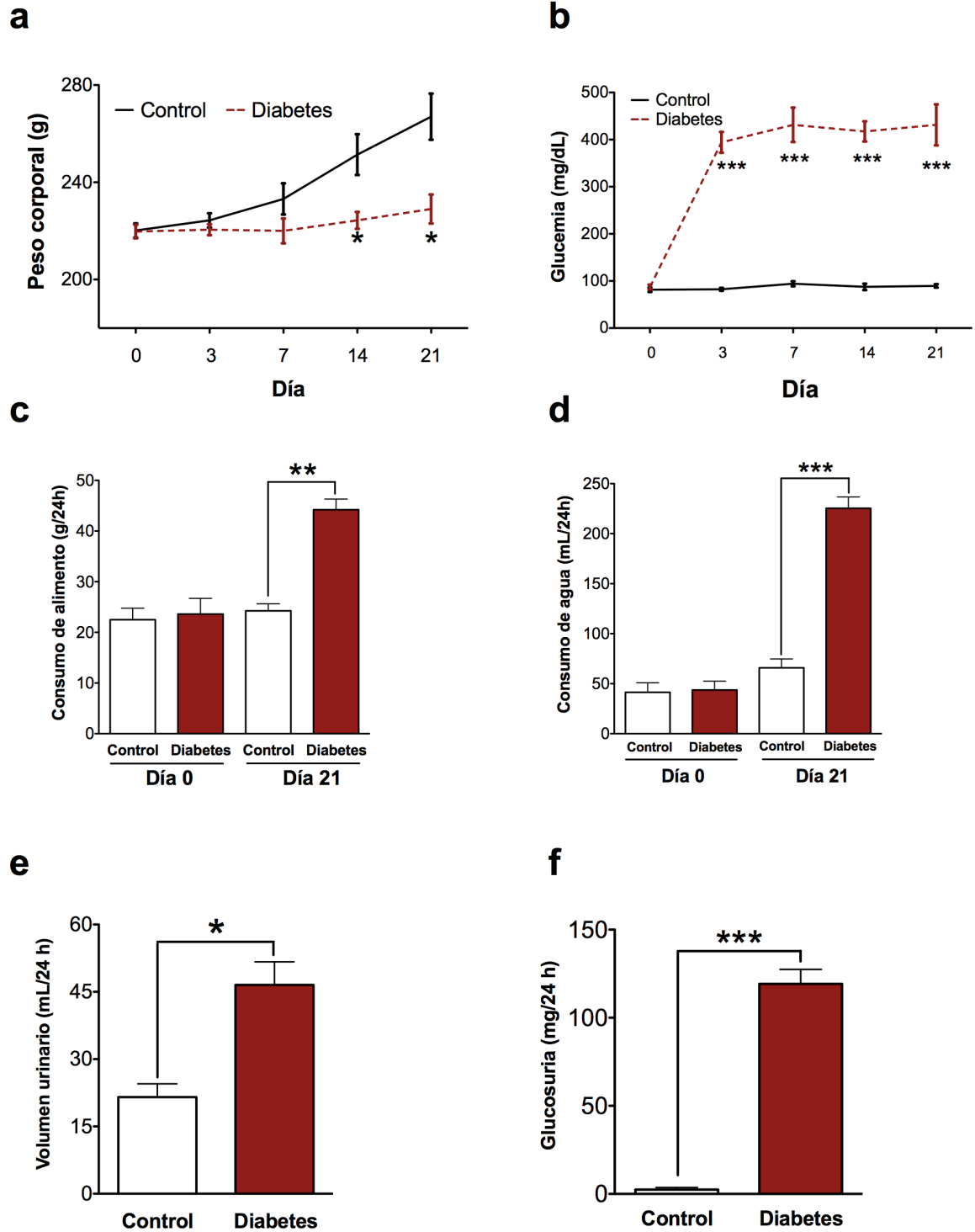
## **12. Análisis estadístico de datos**

Los resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre los promedios se analizaron mediante *t de student* (para comparar entre dos grupos) o análisis de varianza (ANOVA) de una vía (para comparar 3 grupos experimentales o más). Se realizó la prueba *pos hoc* de Bonferroni para comparar entre grupos y se consideró estadísticamente significativa a partir de un valor de p<0.05.

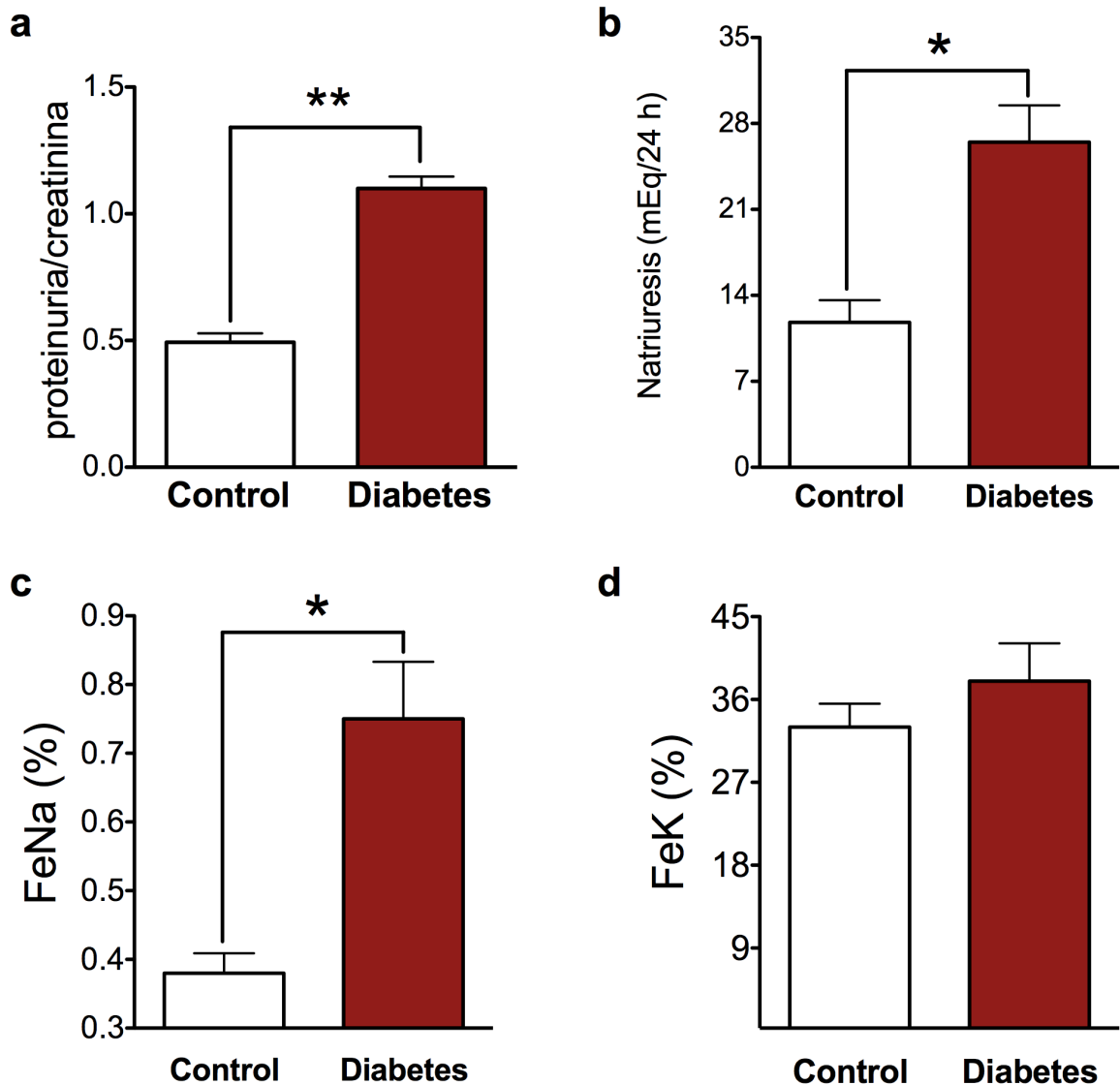


## VII. Resultados

**1. La administración de streptozotocina induce un modelo experimental de diabetes y daño renal.** El primer objetivo fue establecer el modelo experimental de diabetes inducida por la administración de estreptozotocina (STZ). Tres semanas después de la inducción de la diabetes con STZ se encontró un aumento del nivel sérico de glucosa (el cual se mantuvo alrededor de 400 mg/dL durante las tres semanas), del consumo de agua y de alimento y del volumen urinario, glucosuria y disminución del peso corporal (Figura 1). Con estos hallazgos se confirmó que se estableció la diabetes experimental, ya que las ratas presentaron hiperglucemia, polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso, las cuales son características clínicas y metabólicas similares a las que presenta un paciente diabético. Posteriormente se evaluó la función renal y se encontró que la diabetes indujo proteinuria, aumento en la excreción urinaria (natriuresis) y fraccional de sodio (FeNa) sin cambios en la excreción fraccional de potasio (FeK, Figura 2). Con base en estos hallazgos se confirmó que la diabetes indujo disfunción glomerular debido al aumento de la proteinura y disfunción tubular, asociada con el aumento de la natriuresis, ya que en condiciones normales el 70% del sodio que se filtra a través del glomérulo se reabsorbe en el túbulo proximal y cuando existe daño tubular disminuye la reabsorción de sodio, acumulándose en la orina. Para corroborar el daño tubular se evaluó la expresión de la molécula de daño renal KIM-1 en el túbulo proximal, esta molécula aumenta en condiciones de daño nefrotóxico como la isquemia renal [93]. El túbulo proximal se marcó con dipeptidilpeptidasa (DppD, marca roja), ya que esta proteína se expresa en el borde en cepillo de las células epiteliales. Se encontró que la diabetes indujo la expresión de KIM-1 (Figura 3, marca verde) en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal (Figura 3, marca roja), estos hallazgos se corroboraron por Western blot (Figura 3), con lo cual se confirmó que la diabetes indujo daño tubular.



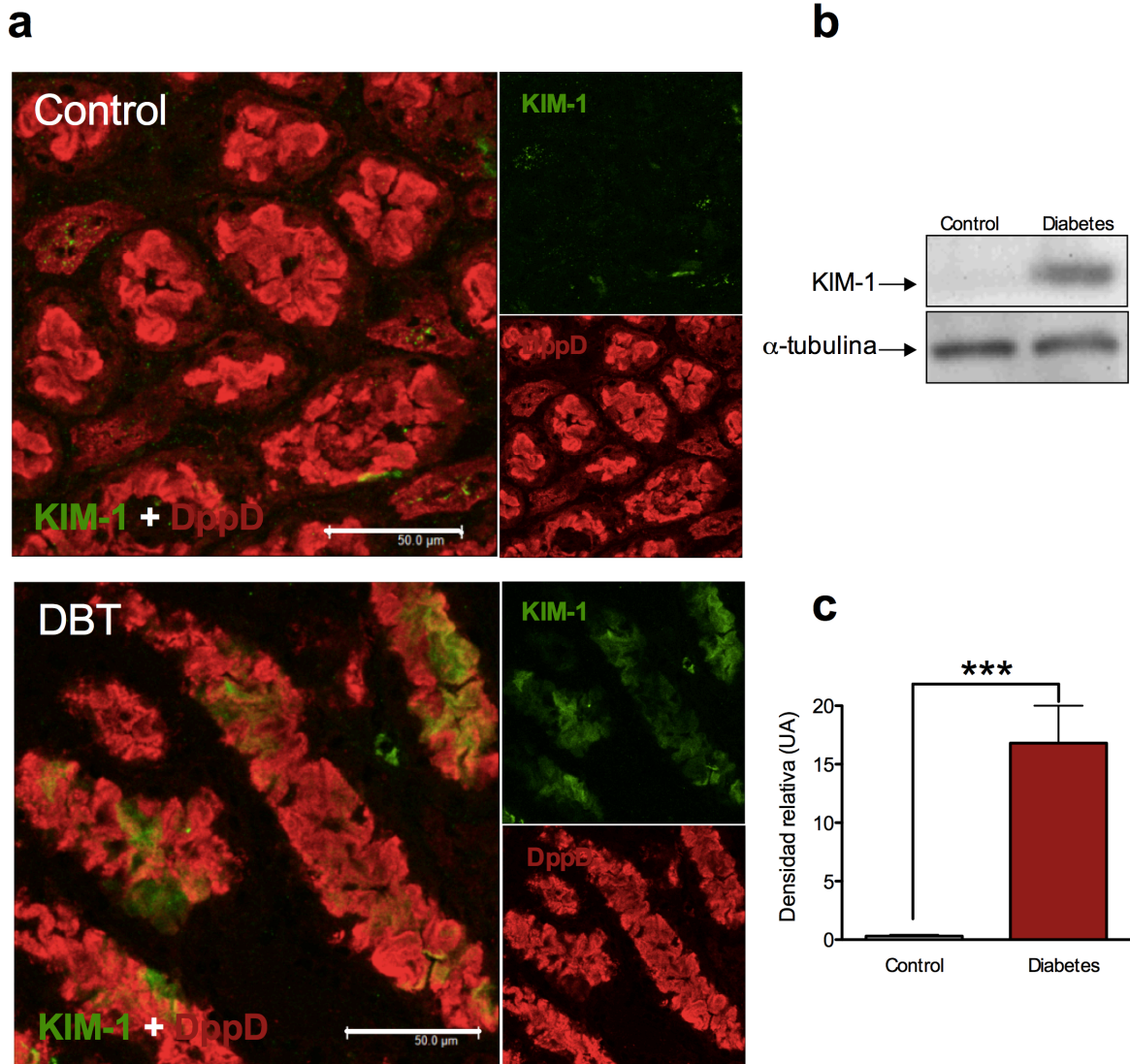
**Figura 1.** La administración de estreptozotocina (STZ) induce las características clínicas y metabólicas de la diabetes. La inducción de la diabetes se confirmó por: a) pérdida de peso, b) hiperglucemia, c) polifagia, d) polidipsia, e) poliuria y f) glucosuria. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 6-8. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.



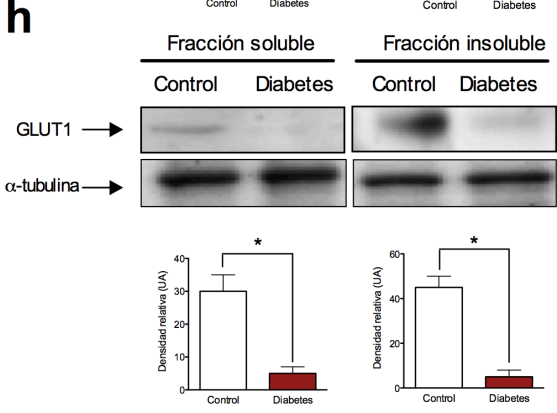
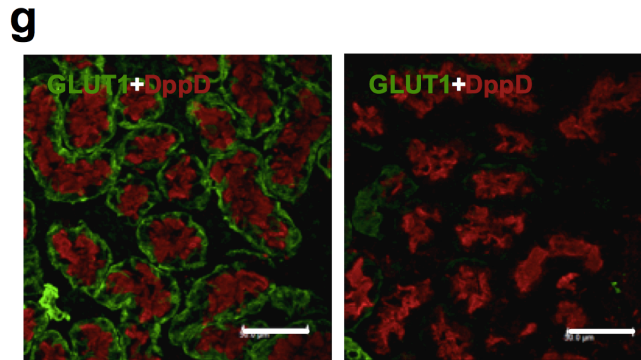
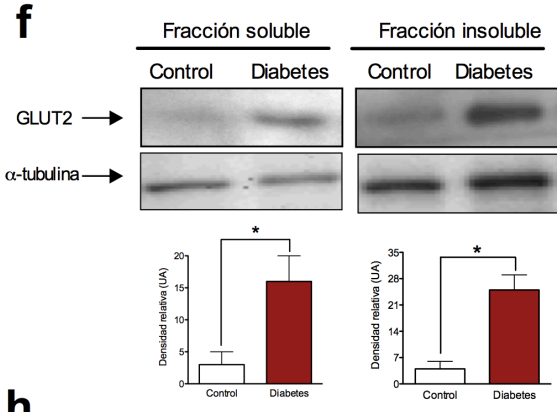
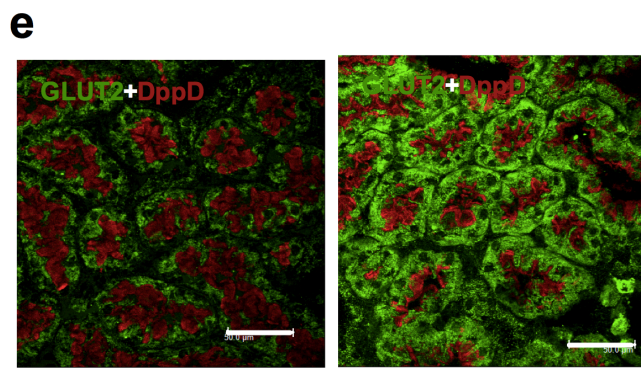
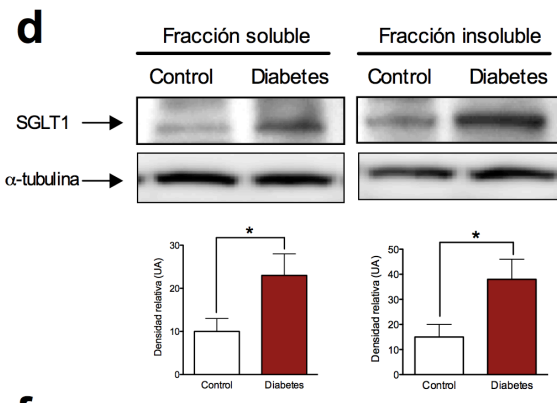
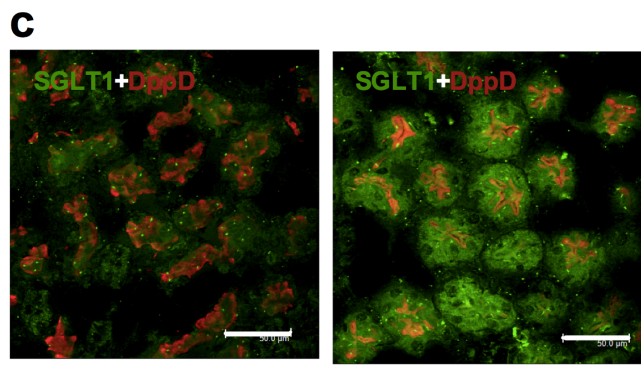
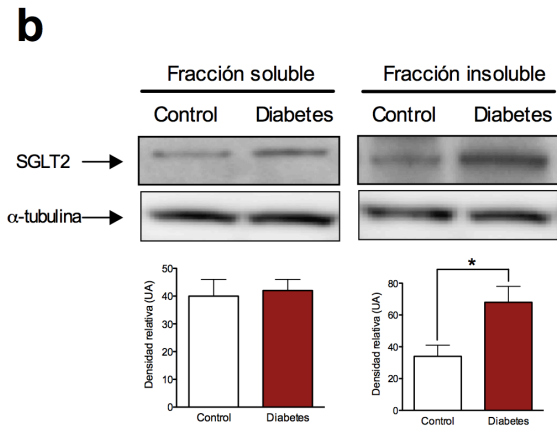
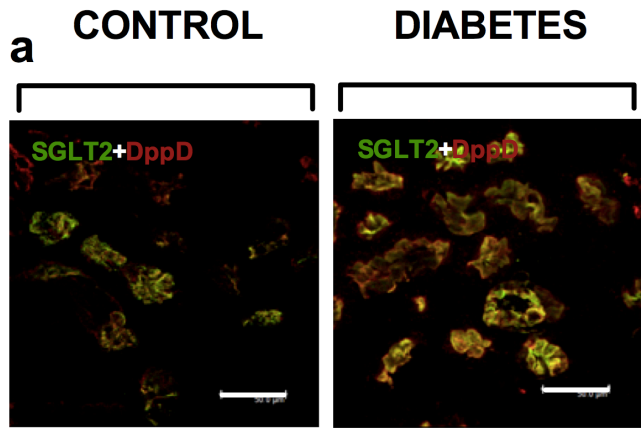
**Figura 2. La diabetes induce disfunción renal.** La disfunción renal se caracterizó por aumento en: a) el cociente proteinuria/creatinina, b) la natriuresis y c) la excreción fraccional de sodio (FeNa). Sin cambios en d) la excreción fraccional de potasio (FeK). Se muestra el promedio±EEM. n = 6-8. \*p<0.05 y \*\*p<0.01.

**2. La diabetes induce la expresión de los transportadores de glucosa SGLT1, SGLT2 y GLUT2 y disminuye la expresión de GLUT1.** El 100% de la glucosa que se filtra a través del glomérulo, se reabsorbe en los segmentos S1-S3 del túbulo proximal, este proceso se lleva a cabo por los cotransportadores de sodio-glucosa (SGLTs)1 y 2 que se localizan en la membrana apical y por los transportadores de glucosa (GLUTs)1 y 2, que se localizan en la membrana basolateral de las células epiteliales del túbulo proximal, de esta forma, en

condiciones normales la glucosa está ausente de la orina [2]. Debido a que la hiperglucemia aumenta la expresión de los transportadores de glucosa en el túbulo proximal, se analizó la expresión de los transportadores SGLTs y GLUTs, ya que estos aumentan la reabsorción tubular de glucosa induciendo su acumulación intracelular. Las altas concentraciones intracelulares de glucosa activan diversos mecanismos que inducen daño celular, entre los que destacan el estrés oxidante [2]. Se encontró que la diabetes induce la expresión de SGLT1 y 2 y de GLUT2 (Figura 4a, c y e, marca verde) y que por lo contrario, disminuye la expresión de GLUT1 (Figura 4g, marca verde). De esta forma, el aumento de SGLT2 y GLUT2 en el segmento S1 favorece la reabsorción de glucosa en este segmento del túbulo proximal. Por otro lado, en el segmento S3 el aumento en SGLT1 paradójicamente no se acompañó del aumento en GLUT1, lo que probablemente favorece una mayor acumulación intracelular de glucosa en este segmento del túbulo proximal. Sin embargo, se ha descrito que en condiciones patológicas como la diabetes, se puede expresar el GLUT2 en el segmento S3, lo que podría compensar la disminución de GLUT1. Estos hallazgos se confirmaron mediante Western blot de las fracciones soluble (citoplasmática) e insoluble (membranal) (Figura 4b, d, f y h) . Con esto se demuestra que la diabetes aumenta la absorción tubular de glucosa induciendo citotoxicidad y disfunción tubular.



**Figura 3.** La diabetes induce daño tubular proximal evaluado mediante el análisis de la expresión de la molécula de daño renal KIM-1 por inmunofluorescencia (a, marca verde) y Western blot (b). El análisis densitométrico se muestra en el panel c. La dipeptidilpeptidasa (DppD, marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. La  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga. UA, unidades arbitrarias. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM. n = 4. \*\*\*p<0.001





**Figura 4. La diabetes aumenta la expresión y localización membranal de los co-transportadores de sodio-glucosa (SGLTs)1 y 2 y del transportador de glucosa (GLUT)2 y disminuye la expresión de GLUT1 en el túbulo proximal.** Se evaluó la localización (mediante microscopía confocal) y la expresión (mediante Western blot) de las fracciones soluble e insoluble de homogenados de corteza renal de SGLT1 y 2 y GLUT1 y 2. La diabetes aumentó la localización en la membrana apical (marca verde) y la expresión en la fracción insoluble de SGLT2 (a y b) y de SGLT1 (c y d). La diabetes también aumentó la localización en la membrana basolateral (marca verde) y la expresión en las fracciones soluble e insoluble de GLUT2 (e y f). Por el contrario, la diabetes disminuyó la localización en la membrana basolateral (marca verde) y la expresión en la fracción soluble e insoluble de GLUT1 (g y h). La dipeptidilpeptidasa (DppD, marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células de túbulo proximal. El análisis densitométrico se muestra en la parte inferior de los paneles b, d, f y h. Los datos de se muestran como densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) normalizadas con  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM. n = 4. \*p<0.05.

### **3. La diabetes induce estrés oxidante por el aumento de la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en los glomérulos y túbulos proximales y en menor magnitud en los túbulos distales a través de un mecanismo dependiente de la actividad de la NADPH oxidasa y del desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).**

Para evaluar el mecanismo de daño celular inducido por la hiperglucemia, se evaluó el estrés oxidante en los glomérulos y túbulos renales. Para ello, se aislaron glomérulos, túbulos proximales y distales por gradientes de Percoll (Esquema 14). Se analizó la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), una especie reactiva que induce la oxidación y el daño a diversas macromoléculas celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos [94]. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  se evaluó mediante un ensayo quimioluminiscente con lucigenina en homogenados glomerulares y tubulares aislado a partir de ratas control y diabéticas. Se analizó la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en ausencia y presencia de diferentes sustratos enzimáticos que producen  $O_2^{\cdot-}$ . Para ello se adicionaron de manera exógena a la mezcla de reacción, los siguientes compuestos: NADH como sustrato para evaluar la actividad de la NADPH oxidasa, L-arginina para evaluar la actividad de la NOS, xantina para evaluar a la xantina oxidasa y el succinato para evaluar la participación del complejo II mitocondrial. Se encontró que la diabetes indujo de manera significativa la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en los glomérulos y los túbulos proximales en ausencia de sustratos exógenos. Sin embargo, en los túbulos distales la diabetes no aumentó la producción de

$O_2^-$  (Figura 5a, d y g). En los glomérulos y los túbulos proximales se encontró un aumento significativo en la producción de  $O_2^-$  cuando se adicionó NADH y L-arginina comparado con el grupo diabético en ausencia de sustratos. En presencia de xantina y succinato no se encontró un aumento significativo en la producción de  $O_2^-$ , lo que sugiere que la xantina oxidasa y la mitocondria no participan de manera importante en la producción de  $O_2^-$  al menos en esta etapa de la diabetes. Estos hallazgos sugieren que la diabetes aumenta la producción de  $O_2^-$  por un mecanismo dependiente de la NADPH oxidasa y la NOS. Para confirmar la especificidad enzimática de la producción de  $O_2^-$  se utilizó el inhibidor específico de la NADPH oxidasa, DPI y de la NOS, L-NAME. Se encontró que el aumento de la producción de  $O_2^-$  inducido por la diabetes en glomérulos y túbulos proximales disminuyó en presencia de los inhibidores DPI (Figura 5b, e y h) y L-NAME (Figura 5c, f e i), lo que confirma que la NADPH oxidasa y la NOS son fuentes específicas de producción de  $O_2^-$  en la diabetes. Es importante destacar que en los grupos control de cada ensayo no se indujo la producción de  $O_2^-$  ni en presencia de sustratos, ni disminución en presencia de inhibidores, sugiriendo que esto solo sucede en condiciones diabéticas.

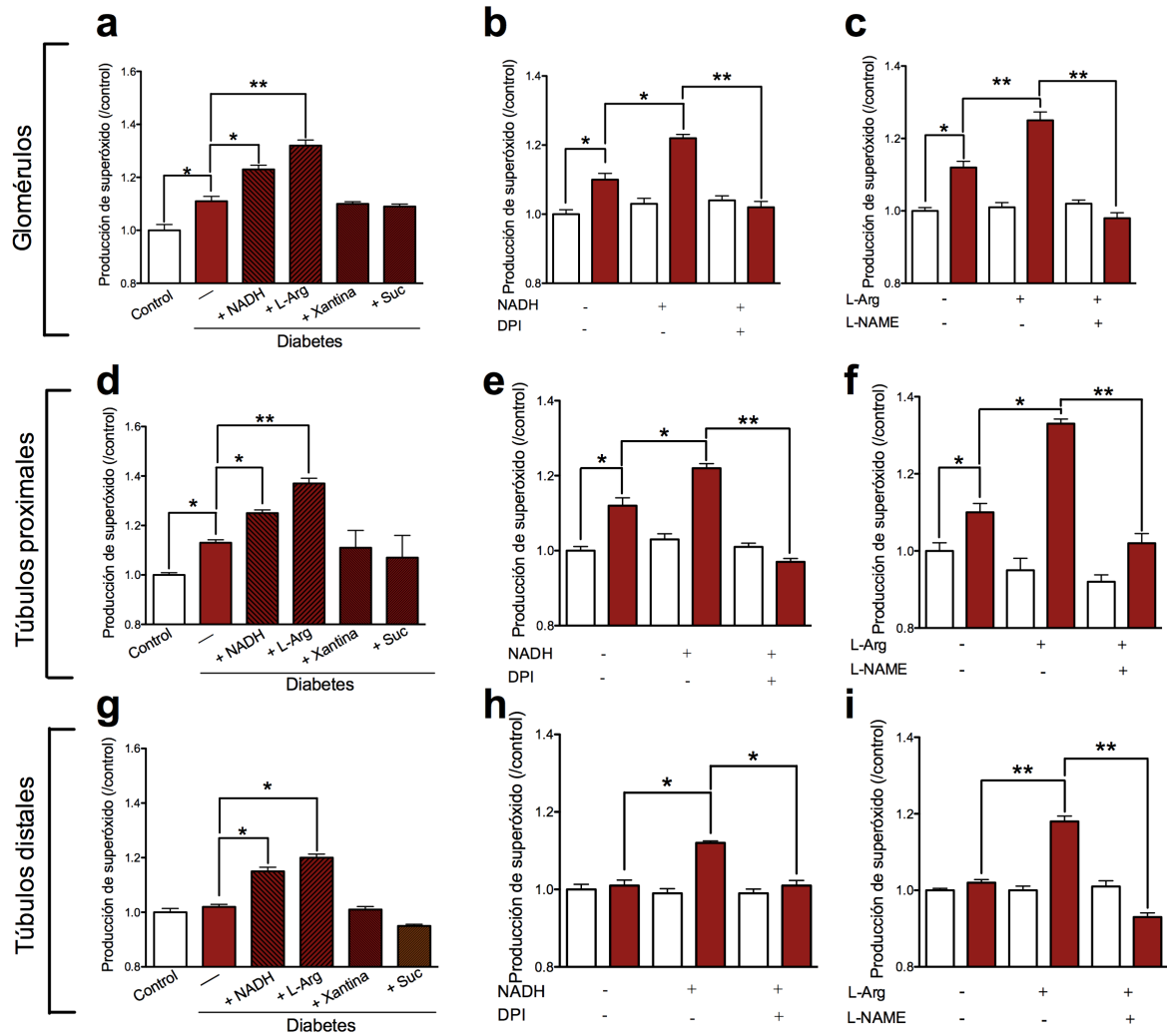
Las tres isoformas de la NOS (eNOS, nNOS e iNOS) se expresan en la nefrona [95]. El aumento en la producción de  $O_2^-$  en presencia de L-arginina, nos sugirió la participación de la NOS en la inducción del estrés oxidante. Sin embargo, para investigar la isoforma de la NOS involucrada se analizó la expresión de la eNOS, nNOS e iNOS y se encontró que la diabetes aumentó de manera significativa la expresión de la eNOS sin inducir cambios en la expresión de la nNOS y la iNOS (Figura 6a). En condiciones patológicas, en las cuales hay un aumento del estrés oxidante, la eNOS se desacopla, ya que pasa de un estado dímérico, que es la forma en la cual sintetiza NO a un estado monomérico que es la forma en la cual sintetiza  $O_2^-$  en lugar de NO [96] (Esquema 15). Para evaluar la síntesis de NO se analizó la excreción urinaria de nitratos ( $NO_2^-$ ) y nitritos ( $NO_3^-$ ) y se encontró que la diabetes disminuyó la excreción de ambos compuestos (Figura 6b) y el cociente dímeros/monómeros (analizado mediante Western blot en condiciones no desnaturizantes, Figura 6c y d). Estos hallazgos confirman que la diabetes induce el desacoplamiento de la eNOS y de esta forma aumenta el estrés oxidante mediante la producción de  $O_2^-$ .

La hiperglucemia induce la acumulación intracelular de altas concentraciones de glucosa, lo que activa diferentes isoformas de las PKCs induciendo la producción de EROs a través del

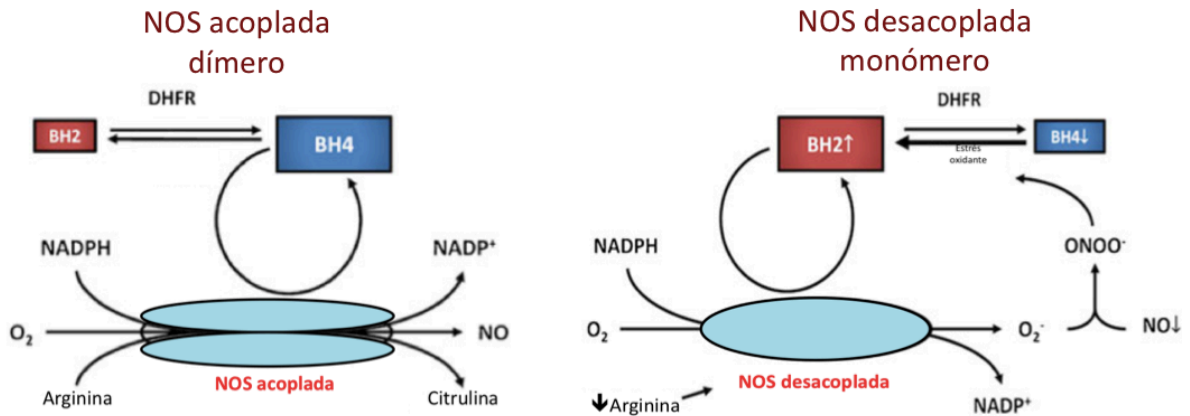


ensamble en la membrana del complejo activo de la NADPH oxidasa debido a que la PKC $\beta$ 2 fosforila a las subunidades de la NADPH oxidasa p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup> lo que promueve el ensamble de la NADPH oxidasa en la membrana, induciendo la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> [97] (Esquema 16). Se observó que la adición de NADH en condiciones diabéticas aumentó la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> sugiriendo la participación de la NADPH oxidasa en la inducción de estrés oxidante. Para confirmar la participación de la NADPH oxidasa se analizó la expresión de PKC $\beta$ 2 en glomérulos y túbulos proximales y distales. Se encontró que la diabetes aumentó la expresión de PKC $\beta$ 2 en los glomérulos y túbulos proximales, sin modificar la expresión de PKC $\beta$ 2 en los túbulos distales (Figura 6e). Estos hallazgos nos confirman que la diabetes promueve el ensamble de la NADPH oxidasa en los glomérulos y túbulos proximales.

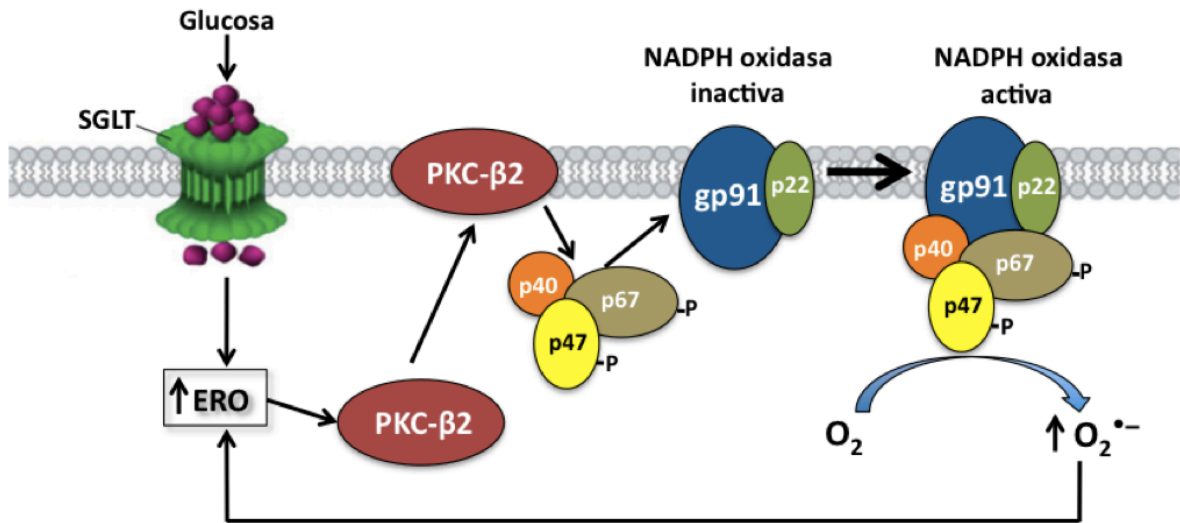
Los hallazgos anteriormente descritos nos sugieren que la diabetes aumenta el estrés oxidante en los glomérulos y en túbulos proximales a través de dos mecanismos principales: el desacoplamiento de la eNOS y la activación de la NADPH oxidasa.



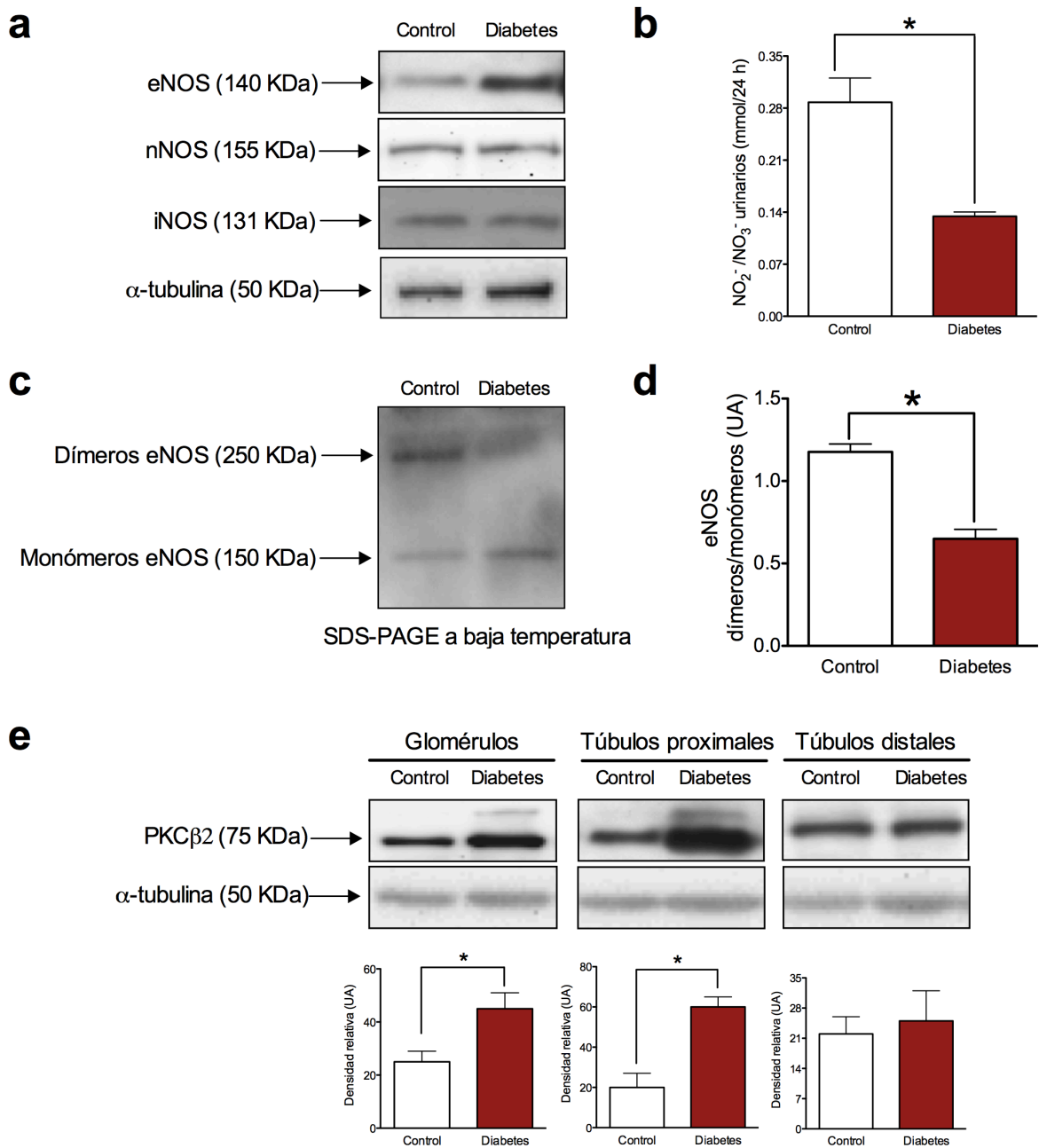
**Figura 5.** La diabetes aumenta la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en glomérulos, túbulos proximales y en menor magnitud en túbulos distales a través de un mecanismo dependiente de la actividad de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). La producción de  $O_2^-$  se midió mediante el método quimioluminiscente con lucigenina en homogenados de glomérulos (a-c), túbulos proximales (d-f) y túbulos distales (g-i) de ratas controles y diabéticas en presencia o ausencia de sustratos de diversas enzimas que son fuente de  $O_2^-$ , se utilizaron como sustratos: NADH, para evaluar la actividad de la NADPH oxidasa, L-arginina (L-arg) para evaluar la actividad de la NOS, xantina para evaluar la actividad de la xantina oxidasa y succinato (suc) para evaluar la contribución del complejo II mitocondrial (a, d y g). Se evaluó el efecto del inhibidor de la NADPH oxidasa difeniliodonio (DPI, paneles b, e y h) y del inhibidor de la NOS éster metílico de N<sup>G</sup>-nitro- L-arginina (L-NAME, paneles c, f, i), sobre la producción de  $O_2^-$  en condiciones control (barras blancas) y diabéticas (barras rojas). La quimioluminiscencia se normalizó con respecto al grupo control (/control). Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 6-8. \*p<0.05 y \*\*p<0.01.



**Esquema 15. Mecanismo de producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en condiciones de desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico (NOS).** En condiciones fisiológicas normales la NOS existe en forma dimérica, en cuyo estado sintetiza NO, mientras que en condiciones de estrés oxidante se rompen los dímeros y se generan los monómeros de la NOS, bajo esta situación la NOS sintetiza O<sub>2</sub><sup>-</sup> en lugar de NO, lo que lleva a la producción de ONOO<sup>-</sup>. BH4, tetrahidrobiopterina; BH2, dihidrobiopterina; DHFR, dihidrofolato reductasa y ONOO<sup>-</sup>, peroxinitrito.



**Esquema 16. Mecanismo de producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por la NADPH oxidasa activada por PKCβ2.** El aumento en la concentración intracelular de glucosa induce estrés oxidante al inducir la expresión de la cinasa PKCβ2, la cual fosforila a las subunidades p47 y p67 de la NADPH oxidasa, promoviendo el ensamblaje del complejo activo de la enzima y en consecuencia la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, lo que induce estrés oxidante. SGLT, co-transportador de Na<sup>+</sup>/glucosa.



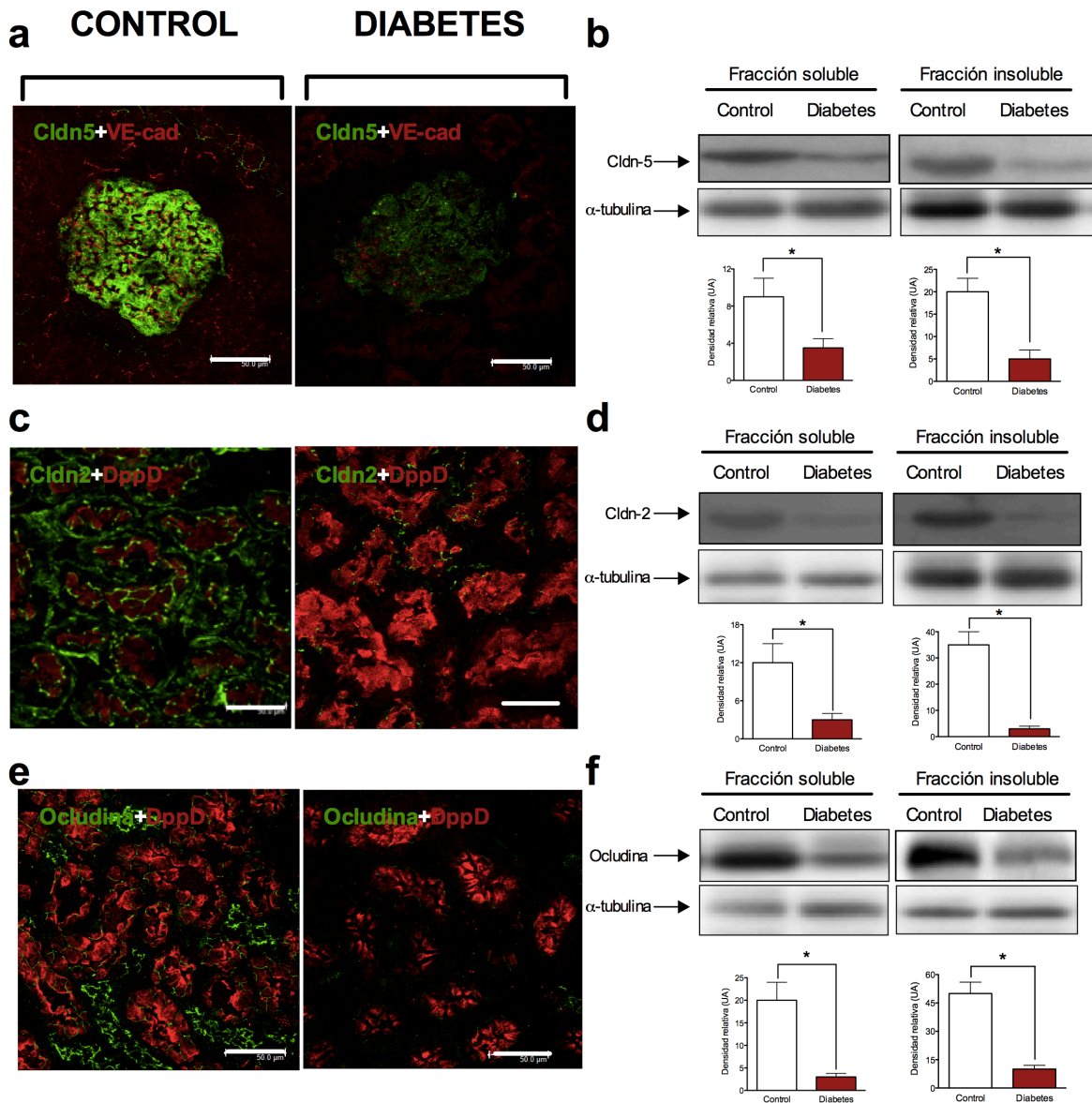
**Figura 6. La diabetes induce el desacople de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y aumenta la expresión de PKC $\beta$ 2 en los glomérulos y túbulo proximal.** La diabetes aumenta la expresión de la eNOS (a) y no cambia la expresión de las isoformas neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). La diabetes disminuye la producción de NO (b), medida por la excreción urinaria de nitratos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_3^-$ ). Para confirmar el desacoplamiento de la eNOS inducida por la diabetes, se evaluó la expresión de los monómeros y dímeros de la eNOS (c) en condiciones no desnaturizantes a baja temperatura, se encontró que la diabetes disminuye el cociente dímeros/monómeros (d) lo cual indica el desacoplamiento de la enzima. La diabetes aumentó la expresión de PKC $\beta$ 2 en los glomérulos y túbulo proximal, y no modificó cambios en los túbulo distales (e), lo que indica la activación de la NADPH oxidasa en los glomérulos y túbulo proximal. Los datos de las densitometrías se expresan como unidades arbitrarias (UA) de densidad relativa normalizadas con  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 4. \*p<0.05.

#### **4. La diabetes altera de manera diferencial la expresión de las proteínas de la unión estrecha: claudina-5 en los glomérulos, claudina-2 y ocludina en los túbulos proximales y ZO-1 y claudinas-1, 4 y -8 en los túbulos distales.**

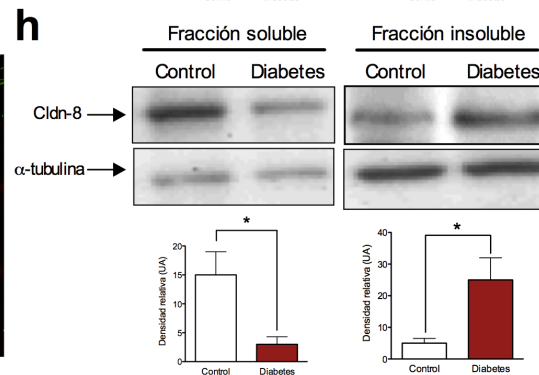
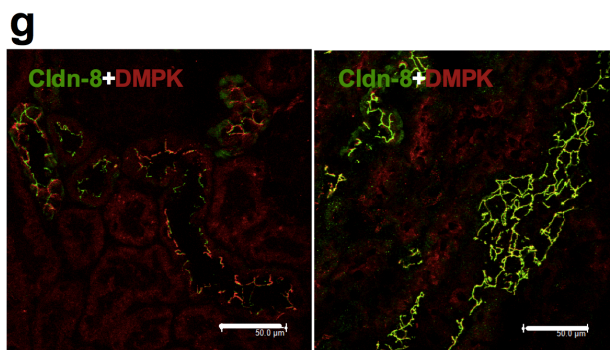
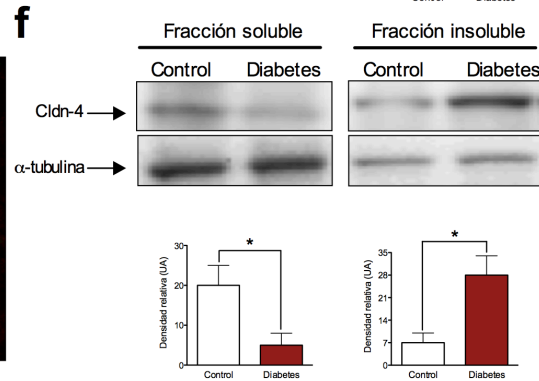
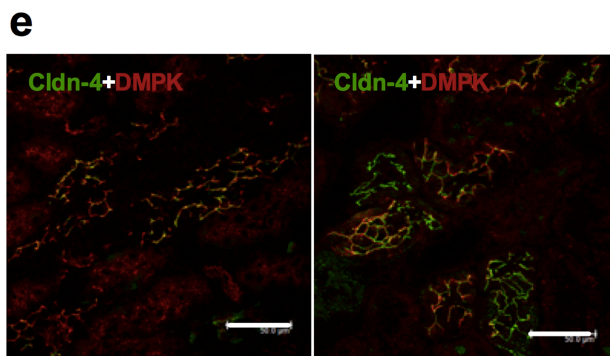
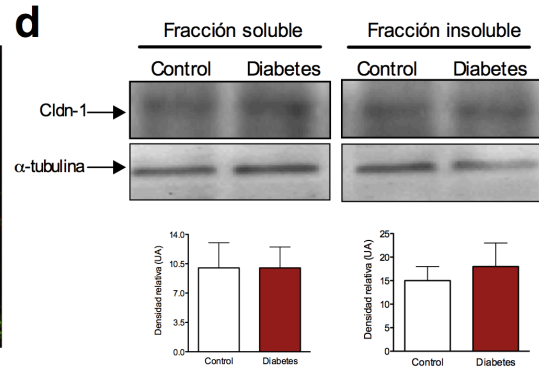
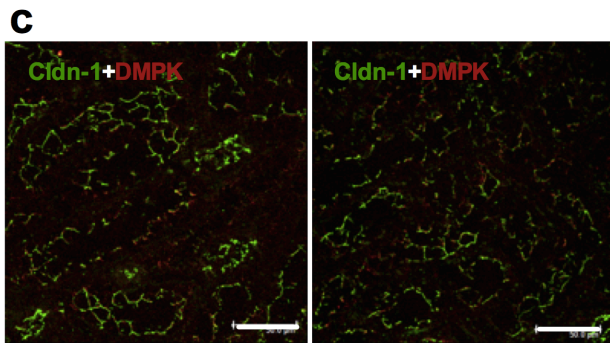
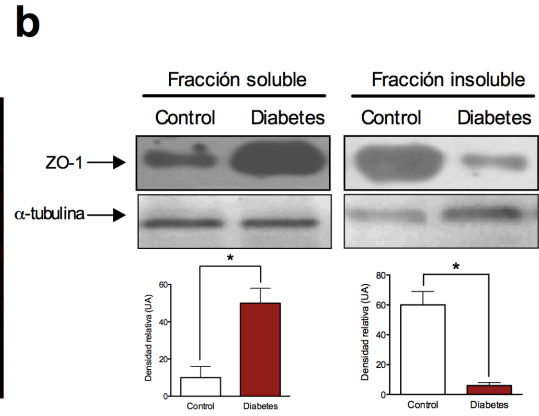
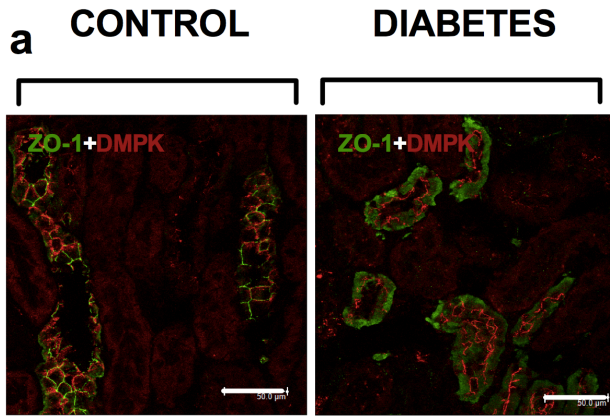
El estrés oxidante induce el desensamble de la UE [90,98-101]. Por ello, se analizó la expresión de las proteínas de la UE. Se encontró que la diabetes disminuyó la expresión de las claudinas-5 (Figura 7a y b) y -2 (Figura 7c y d) y de la ocludina (Figura 7e y f), las cuales se analizaron por inmunofluorescencia y Western blot. Se observa que en la condición control la claudina-2 y la ocludina presentan el patrón de expresión característico de malla de gallinero (marca verde) en el túbulo proximal (marcado con DppD, marca roja), y que en condiciones diabéticas este patrón desaparece. Estos resultados se confirmaron mediante Western blot, en donde se encontró que la diabetes disminuyó la expresión de ambas proteínas en la fracción soluble e insoluble. De manera similar, se observó que en la condición control se expresa la claudina-5 en el endotelio glomerular (marca verde) ya que co-localiza con la VE-cadherina (marca roja) en una estructura esferoide que corresponde al glomérulo. Además, esto es importante ya que la claudina-5 es la principal claudina endotelial [8]. Se observó que la diabetes disminuyó la expresión de la claudina-5 en el endotelio glomerular (Figura 7b).

En el túbulo distal se encontró que la diabetes deslocalizó a ZO-1 de la UE, ya que se observó una expresión difusa y fuera de la membrana (Figura 8a, marca verde), además mediante Western blot se encontró que ZO-1 aumentó en el citoplasma y disminuyó en la membrana (Figura 8b), lo que confirma la deslocalización de ZO-1 de la UE. Por otro lado, no se encontraron cambios en la expresión de la claudina-1, ya que en ambas condiciones control y diabética, se expresa en forma característica de malla de gallinero (Figura 8c, marca verde), este hallazgo se confirmó mediante el análisis por Western blot en las fracciones soluble e insoluble (Figura 8d). Con respecto a las claudinas-4 y -8 se encontró que la diabetes aumentó la expresión de ambas proteínas en la UE de los túbulos distales (marcados con DMPK, marca roja), ya que se observa una marca continua e intensa en la membrana (marca verde, Figura 8e y g). Estos hallazgos se corroboraron mediante Western blot, en donde se confirmó que la diabetes aumentó la expresión de las claudinas-4 y -8 en la membrana y la disminuyó en el citoplasma (Figura 8f y h).

Con base en los resultados anteriormente descritos, se concluye que la diabetes altera de manera diferencial la expresión de las proteínas de la UE en los diferentes segmentos de la nefrona ya que disminuye la expresión de la claudina-5 en glomérulos y de la claudina-2 y ocludina en los túbulos proximales, segmentos donde se encontró estrés oxidante. Mientras que en los túbulos distales donde no se encontró estrés oxidante, la diabetes deslocalizó a ZO-1 y aumentó las claudinas-4 y -8 en la UE, sin cambiar la expresión de la claudina-1.



**Figura 7. La diabetes disminuye la expresión y la localización membranar de la claudina-5 en los glomérulos y de la claudina-2 y la occludina en los túbulos proximales.** La diabetes disminuyó la localización membranar (a, marca verde) y la expresión en las fracciones soluble e insoluble (b) de la claudina-5 en los glomérulos. La cadherina vascular-endotelial (VE-cad, marca roja) se utilizó como marcador de los vasos capilares intraglomerulares. La diabetes disminuyó la localización membranar (c y e, marca verde) y la expresión en las fracciones soluble e insoluble (d y f) de la claudina-2 y la occludina en los túbulos proximales, respectivamente. La dipeptidilpeptidasa (marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. El análisis densitométrico de los Western blots se muestra en los paneles inferiores de b, d y f. Los datos se expresan como densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) normalizadas con  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM. n = 4. \*p<0.05.







**Figura 8. La diabetes deslocaliza a zonula occludens (ZO)-1 y aumenta la expresión de las claudinas-4 y -8 en la unión estrecha (UE) de los túbulos distales.** Se evaluó la localización, mediante inmunofluorescencia, y la expresión mediante Western blot de las fracciones soluble e insoluble, de la ZO-1 y de las claudinas-1, -4 y -8 en los túbulos distales. La diabetes deslocalizó a ZO-1 de la UE (a, marca verde) y aumentó su expresión en la fracción soluble, mientras que, la disminuyó en la fracción insoluble (b). No se observaron cambios en la localización (c) y expresión (d) de la claudina-1. Por el contrario, la diabetes aumentó la localización en la UE (e y g, marca verde) y la expresión en la fracción insoluble (f y h) de las claudinas-4 y -8. La desmoplaquina (DMPK, marca roja) se utilizó como marcador del túbulo distal. El análisis densitométrico de los Western blots se muestra en los paneles inferiores de b, d, f y h. Los datos se expresan como densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) normalizadas con  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 4. \*p<0.05.

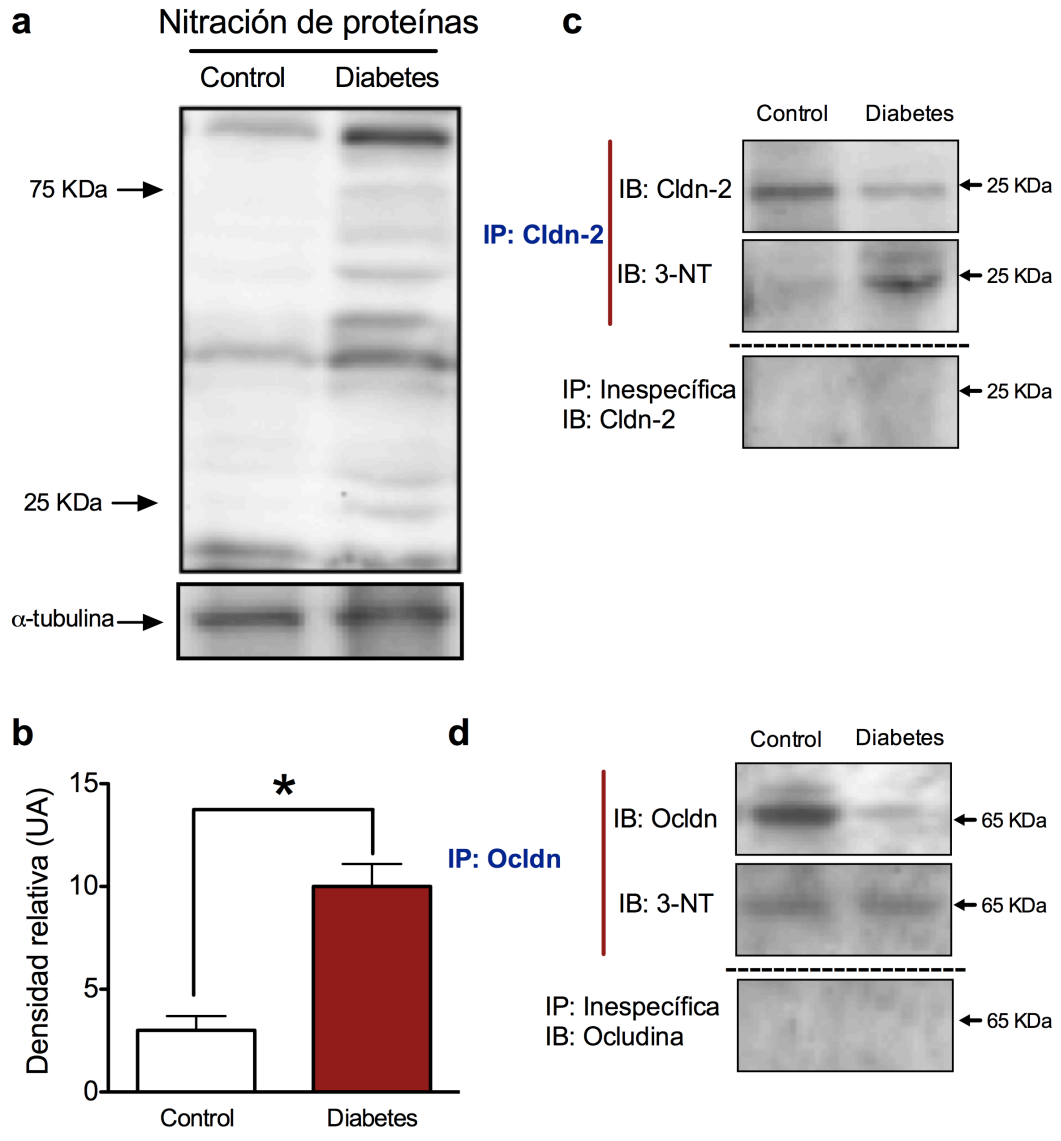
### **5. La disminución de la expresión de la claudina-2 se debe al aumento en su nitración en residuos de tirosina.**

El anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) es una ERO que resulta de la reacción del NO con  $\text{O}_2^-$ , esto induce estrés oxidante y el desacoplamiento de la eNOS (esquema 15) [102]. El  $\text{ONOO}^-$  nitra a diferentes proteínas blanco en residuos de tirosina y de esta manera altera su estructura y función promoviendo su degradación (Esquema 17). Se evaluó la nitración de proteínas en residuos de tirosina mediante un anticuerpo que reconoce a los aductos proteínas-3-nitrotirosina (3-NT), que resultan del impacto directo del  $\text{ONOO}^-$  sobre las proteínas. Se encontró que la diabetes aumentó de manera significativa la expresión de 3-NT (Figura 9a y b). Se inmunoprecipitaron la claudina-2 y la ocludina a partir de los túbulos proximales para evaluar el impacto del estrés oxidante sobre ambas proteínas. Se encontró que la diabetes aumentó la nitración de la claudina-2, a pesar de que se inmunoprecipitó menor cantidad de la proteína (Figura 9c). Por lo contrario, la diabetes no indujo la nitración de la ocludina (Figura 9d), lo que sugiere que la disminución de la expresión de la ocludina se debe a modificaciones post-traduccionales inducidas por el estrés oxidante como puede ser la oxidación o generación de grupos carbonilo.

Los hallazgos anteriores nos demuestran que el mecanismo a través del cual la diabetes disminuye la expresión de la claudina-2 es por la inducción de su nitración en residuos de tirosina lo que aumenta su degradación.



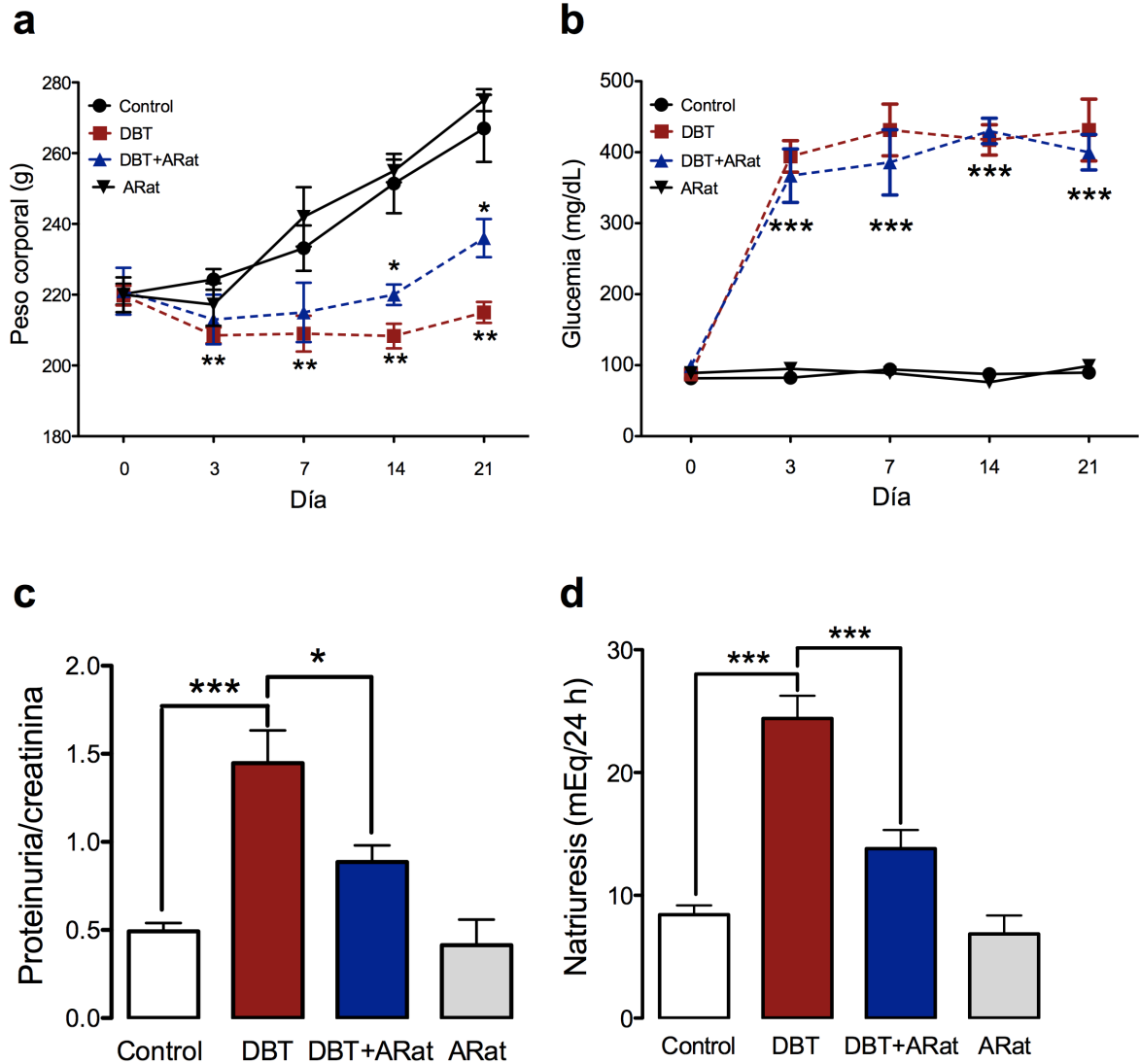
**Esquema 17. Nitración de proteínas en residuos de tirosina mediada por peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).** El  $\text{ONOO}^-$  es una especie reactiva de oxígeno que modifica covalentemente a las proteínas induciendo su nitración en residuos de tirosina y su degradación posterior.



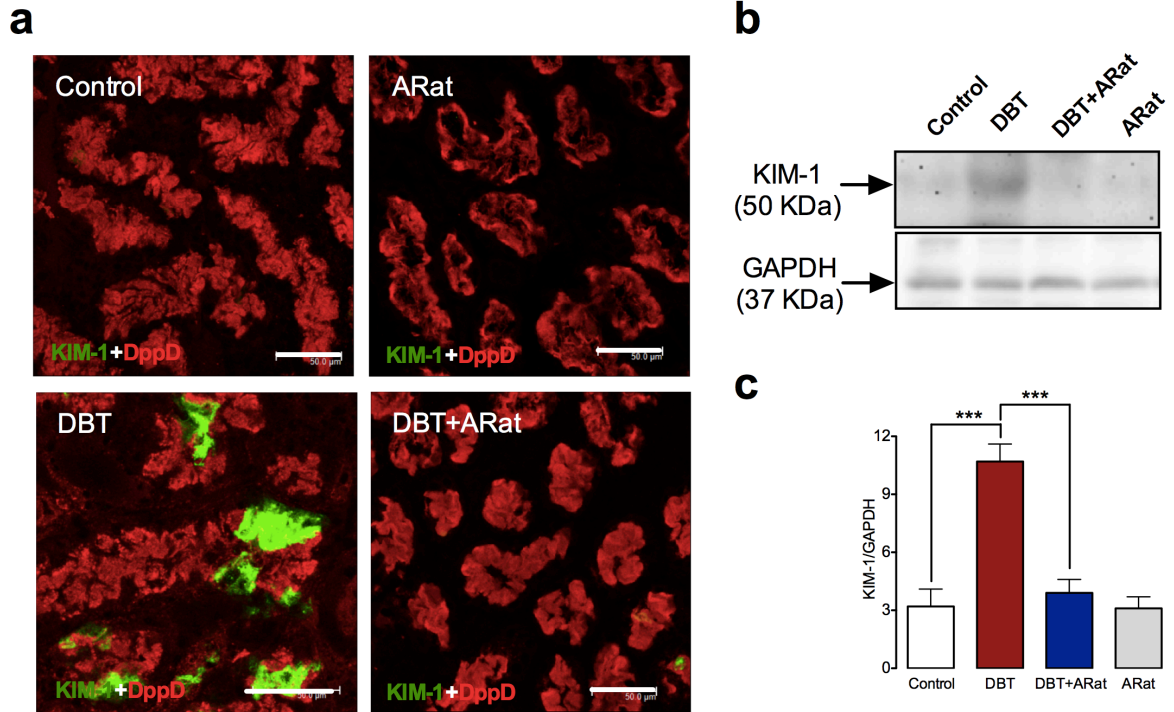
**Figura 9. La diabetes aumenta la nitración de la claudina-2 en residuos de tirosina.** La diabetes aumentó la (a) nitración de proteínas totales en residuos de tirosina, (3-NT), evaluada mediante Western blot. El análisis densitométrico del Western blot se muestra en el panel b. Los datos se expresan como densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) normalizadas con  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM. n = 4. \*p < 0.05. Se realizó la inmunoprecipitación de la claudina-2 (c) y de la ocludina (d) de túbulos proximales aislados y se encontró que la diabetes aumentó la nitración de la claudina-2 (c) en residuos de tirosina sin cambios en la ocludina (d). Se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

## **6. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) ejerce un efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes.**

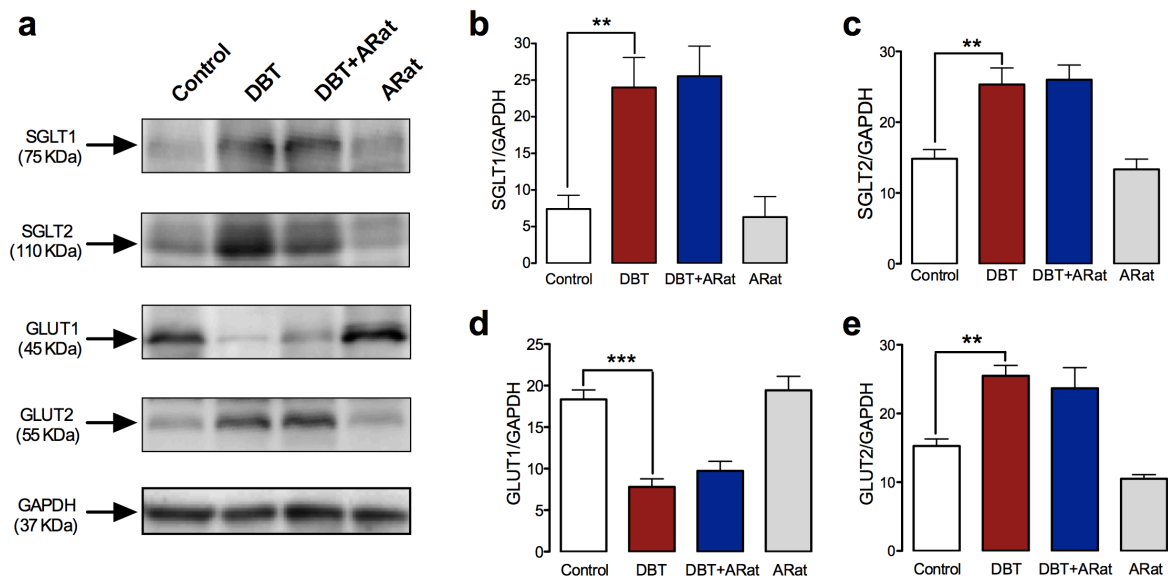
Debido a que el estrés oxidante es el mecanismo a través del cual la diabetes induce disfunción renal y daño sobre las proteínas de la UE, es de esperarse que el tratamiento con un agente antioxidante como el ARat, ejerza efecto nefroprotector en la disfunción renal y en la pérdida de las proteínas de la UE inducida por la diabetes. Como primer objetivo se analizó el efecto del ARat sobre la pérdida de peso corporal. Se encontró que el ARat atenuó la pérdida de peso corporal (Figura 10a) sin tener efecto sobre la hiperglucemia inducida por la diabetes (Figura 10b). El ARat disminuyó la proteinuria (Figura 10c) y el aumento en la natriuresis (Figura 10d) inducida por la diabetes. Dado que el ARat disminuyó la natriuresis, es posible que este compuesto tenga efecto sobre la expresión de la claudina-2. Estos experimentos se describen más adelante. Para confirmar el efecto del ARat sobre el daño en el túbulo proximal, se analizó la expresión de KIM-1, mediante inmunofluorescencia y Western blot, y se encontró que el ARat disminuyó la expresión de KIM-1 en el túbulo proximal (marcado con DppD, marca roja) en condiciones diabéticas (Figura 11a-c) lo que confirma el efecto protector del ARat en el túbulo proximal. Además, se analizó la expresión de los transportadores de glucosa y se encontró que el ARat no tuvo efecto sobre el aumento en la expresión de SGLT1 y 2 y GLUT2, ni sobre la disminución en la expresión de GLUT1 inducida por la diabetes (Figura 12a-e). Esto sugiere, que el mecanismo de nefroprotección del ARat es independiente de la reabsorción tubular de glucosa, lo que concuerda con el hecho de que el ARat no tiene efecto sobre la hiperglucemia, debido a que la hiperglucemia es el principal factor que induce la expresión de los transportadores de glucosa en el túbulo proximal [103]. Estos hallazgos comprueban que el ARat ejerce un efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes mediante un mecanismo independiente de la hiperglucemia.



**Figura 10.** El ácido retinoico *all-trans* (ARat) atenuó la pérdida de peso y el aumento en la proteinuria y la natriuresis inducidos por la diabetes. Se monitoreó el peso corporal (a) y la glucemia (b) los días 0, 3, 7, 14 y 21 después de la inducción de la diabetes. El ARat disminuyó la pérdida de peso (a) y no tuvo efecto sobre la hiperglucemia (b) inducida por la diabetes. \* $p < 0.05$  vs DBT y \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs control. El ARat disminuyó de manera significativa el aumento en el cociente proteinuria/creatinina (c) y la natriuresis (d) inducida por la diabetes. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM.  $n = 6-8$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 11. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) previno el aumento en la expresión de la molécula de daño renal KIM-1 inducida por la diabetes.** Se encontró que el ARat disminuyó la localización en el borde en cepillo, evaluada mediante inmunofluorescencia, de KIM-1 (marca verde) inducida por la diabetes en el túbulo proximal. La dipeptidilpeptidasa (marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. Las hallazgos anteriores se confirmaron mediante Western blot de túbulos aislados (b). Se muestra el análisis densitométrico (c). No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 4.\*\*\*p<0.001.



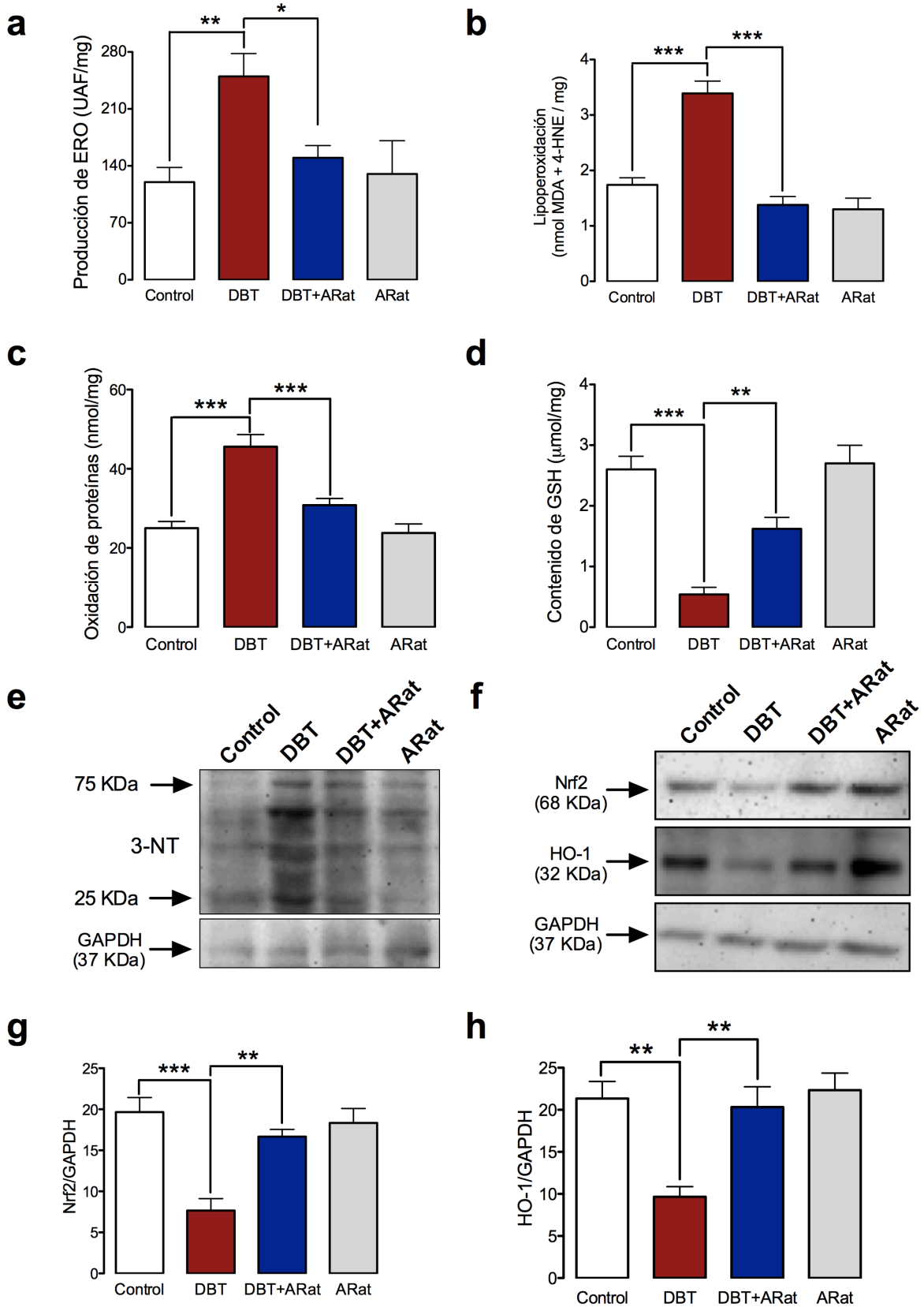
**Figura 12.** El ácido retinoico *all-trans* (ARat) no tuvo efecto sobre la expresión de los cotransportadores de sodio-glucosa (SGLTs)1 y 2 ni de los transportadores de glucosa (GLUTs)1 y 2. Se realizó el análisis de la expresión de las proteínas mediante Western blot (a) y se encontró que el ARat no tuvo efecto sobre el aumento en la expresión de SGLT1 (b), SGLT2 (c), GLUT2 (e) y la disminución en la expresión de GLUT1 (d) inducida por la diabetes. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. Se muestra el promedio±EEM. n = 3.\*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

### 7. El efecto nefroprotector del ácido retinoico *all-trans* (ARat) se asocia con su capacidad antioxidante.

Para evaluar si el efecto nefroprotector del ARat se asocia a su capacidad antioxidante, se midió la producción de ERO, la lipoperoxidación como marcador de daño lipídico, la oxidación y nitración como marcadores de daño a proteínas y el contenido de GSH que es el principal antioxidante intracelular [104]. Se encontró que el ARat disminuyó la producción de ERO (Figura 13a), la lipoperoxidación (Figura 13b), la oxidación (Figura 13c) y la nitración de proteínas, evaluado mediante un Western blot de 3-NT, (Figura 13e) y aumentó el contenido intracelular de GSH (Figura 13d). Los compuestos con capacidad antioxidante modulan la expresión del gen maestro del estado redox celular, el factor transcripcional Nrf2 [105]. El ARat atenuó la pérdida de la expresión de Nrf2 (Figura 13f y g) inducida por la diabetes, estos hallazgos fueron consistentes con el hecho de que el ARat también atenuó la pérdida de la HO-1 (Figura 13f y h) una enzima antioxidante cuya expresión se regula por Nrf2. Se ha reportado que PKC $\beta$ 2 activa las subunidades gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> al promover su fosforilación en residuos de serina favoreciendo su

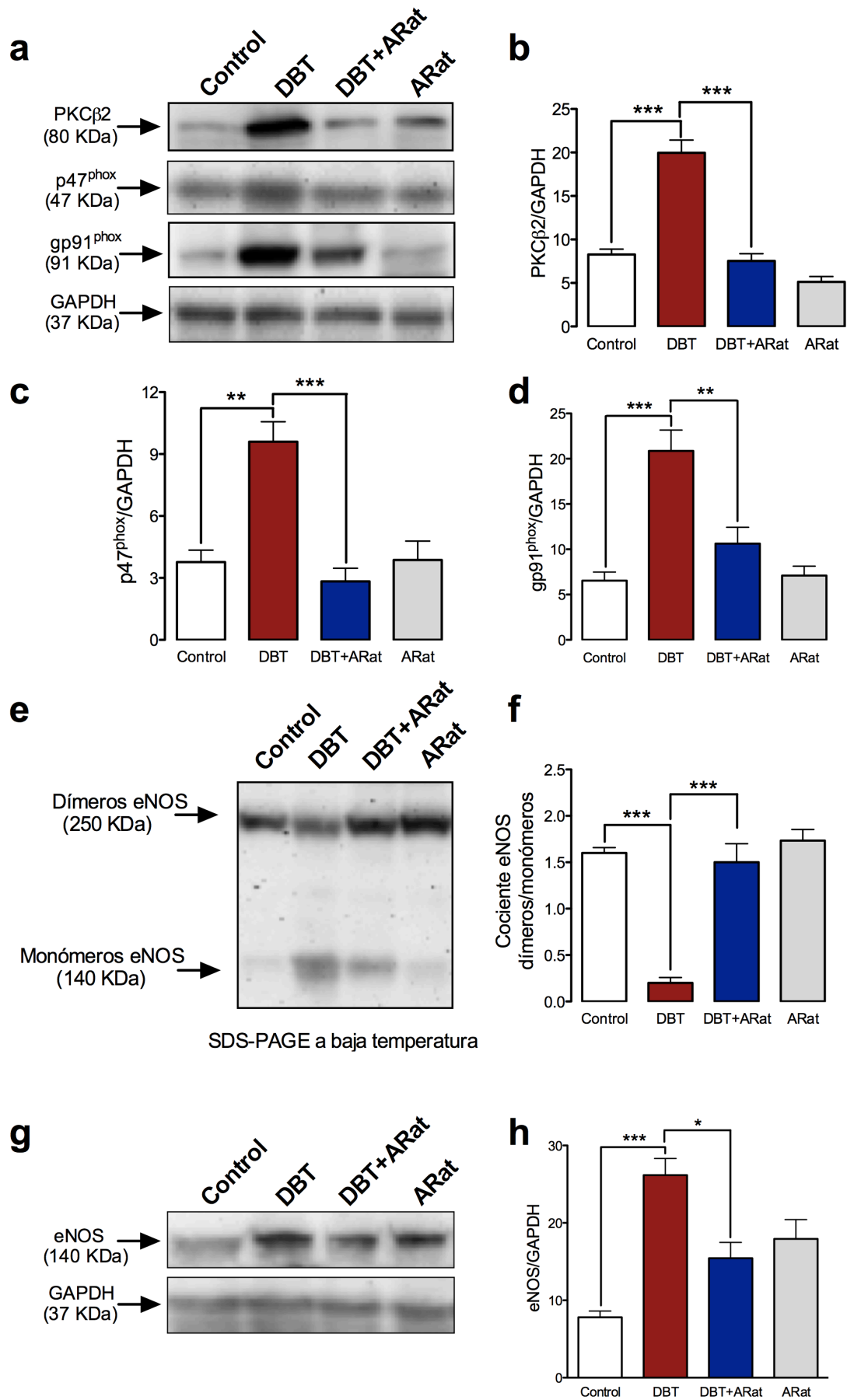
translocación membranal y el ensamble del complejo activo de la NADPH oxidasa [106]. Se encontró que el ARat disminuyó el aumento de la expresión de PKC $\beta$ 2 (Figura 14a y b), p47<sup>phox</sup> (Figura 14 a y c) y gp91<sup>phox</sup> (Figura 14a y d) inducidas por la diabetes. De esta forma se concluye que el ARat disminuye la activación de la NADPH oxidasa. Además, el ARat atenuó el desacoplamiento de la eNOS inducido por la diabetes ya que disminuyó la expresión total de la eNOS (Figura 14g y h) y previno la disminución de los dímeros (Figura 14e y f). Estos hallazgos sugieren que el efecto antioxidante del ARat se debe a que disminuyó la activación de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS en las condiciones diabéticas.







**Figura 13. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) disminuyó el estrés oxidante inducido por la diabetes.** El ARat disminuyó el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (a), la lipoperoxidación (b), la oxidación de proteínas (c) y la disminución en el contenido de glutatión reducido (GSH) inducido por la diabetes. Se evaluó la nitración de proteínas en residuos de tirosina (3-NT) mediante Western blot y se encontró que el ARat disminuyó el aumento en la expresión de 3-NT inducida por la diabetes (e). Además se evaluó la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) y de la enzima antioxidante hemooxigenasa (HO)-1 (f) cuya expresión se regula por Nrf2, y se encontró que el ARat atenúa la disminución en la expresión de ambas proteínas inducida por la diabetes (g y h). La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. Se muestra el promedio±EEM. n = 4-6.\*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia; MDA, malondialdehído; 4-HNE, 4-hidroxi-2-nonenal.



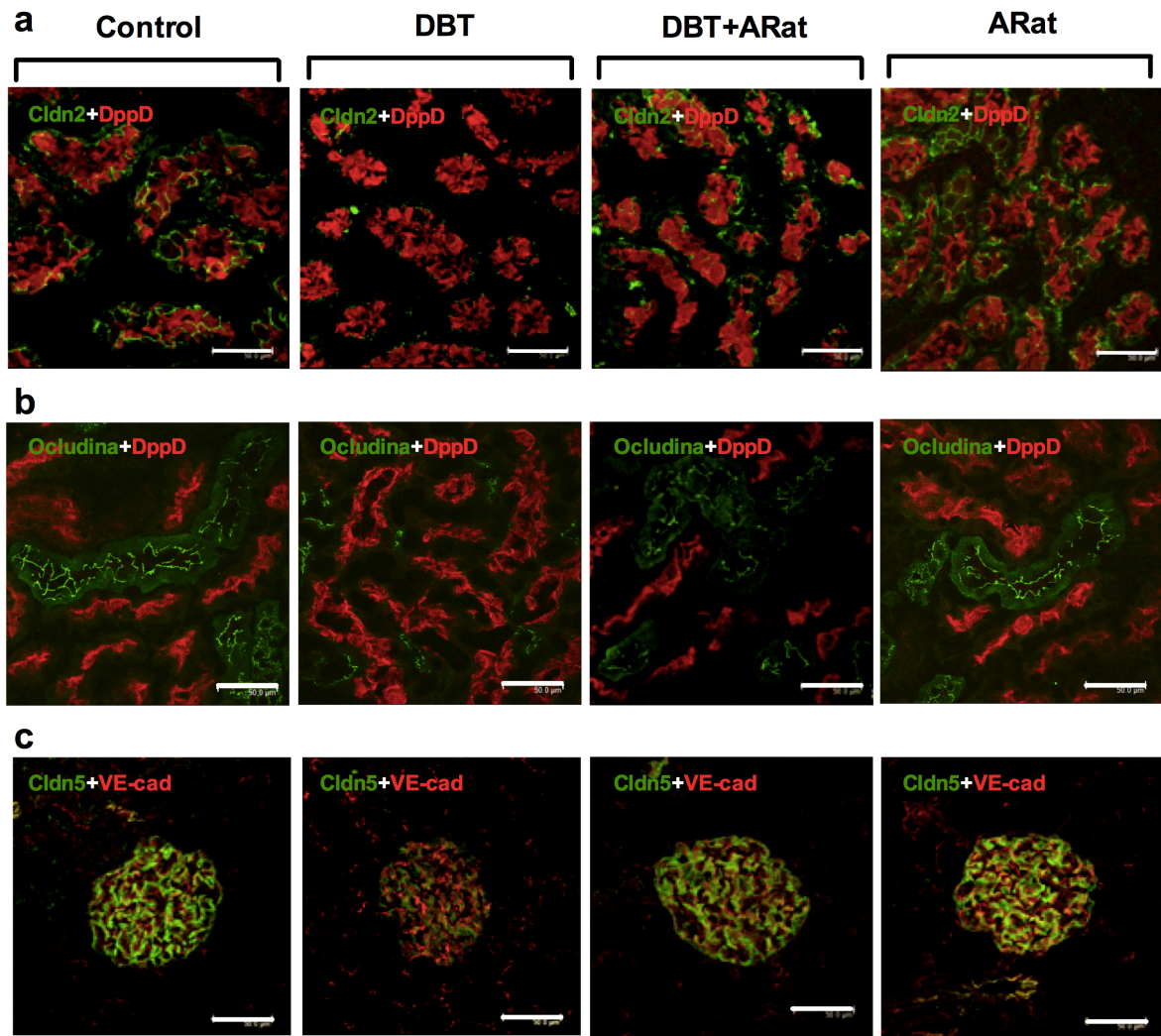


**Figura 14. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) atenuó el aumento en la expresión de PKC $\beta$ 2, las subunidades de la NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>) y el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) inducida por la diabetes.** Se realizó el análisis de la expresión de PKC $\beta$ 2, las subunidades de la NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>) y los dímeros y monómeros de la eNOS mediante Western blot (a, e y g) y se encontró que el ARat disminuyó de manera significativa el aumento en la expresión de PKC $\beta$ 2 (b), p47<sup>phox</sup> (b) y gp91<sup>phox</sup> (c) inducida por la diabetes. Además, se encontró que el ARat disminuyó el desacoplamiento de la eNOS (e), evidenciado por la disminución en los monómeros (f) y la expresión total de la eNOS (g y h) inducida por la diabetes. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 3. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

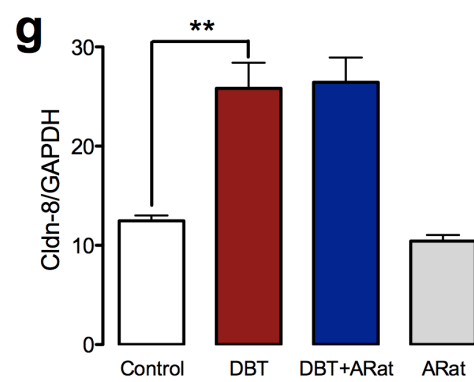
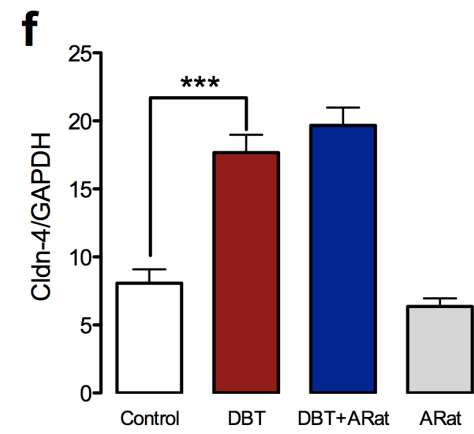
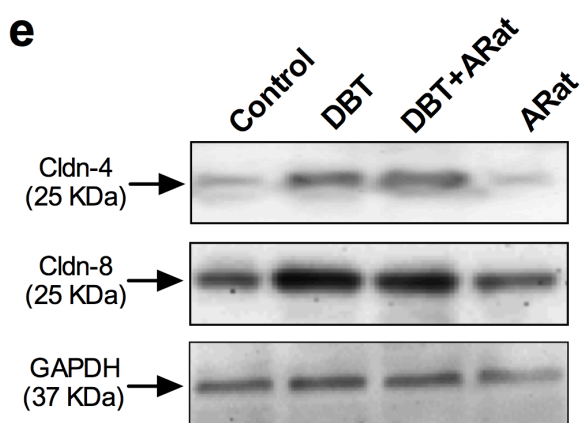
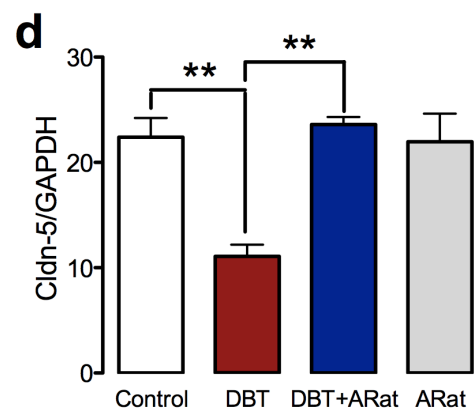
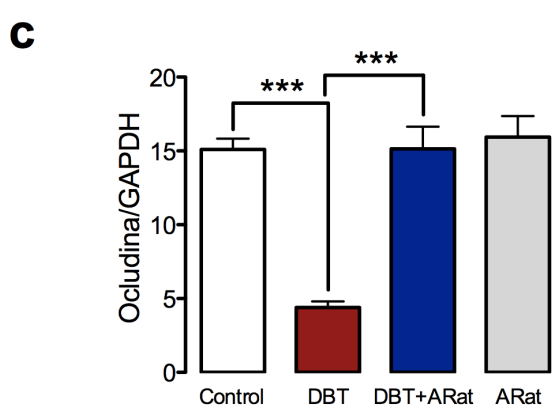
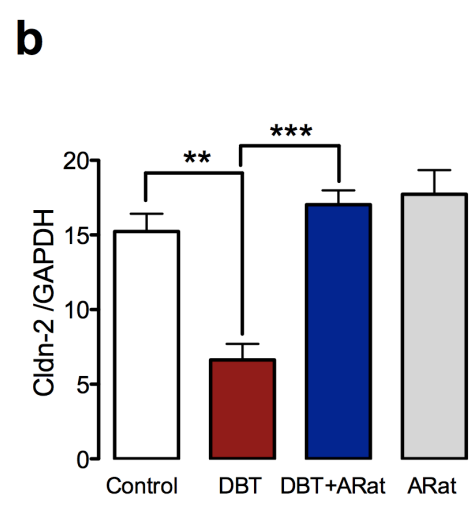
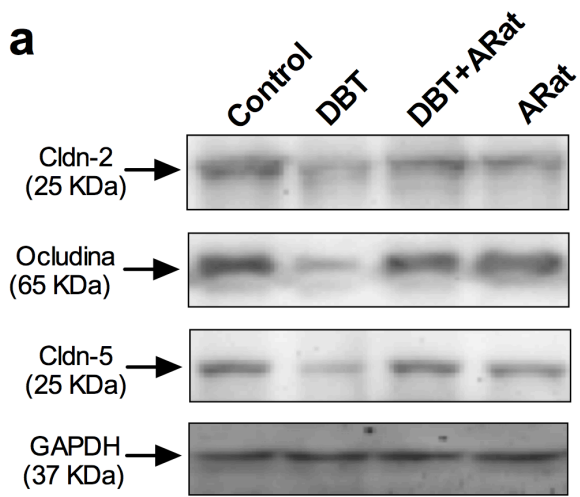
### **8. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) previene la pérdida de las proteínas de la UE en glomérulos y túbulos proximales.**

Como se describió anteriormente, el estrés oxidante inducido por la hiperglucemia promueve la pérdida de las proteínas de la UE en los glomérulos y túbulos proximales. El ARat disminuyó el estrés oxidante a través de la atenuación de la actividad de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS, por lo tanto, es de esperarse que el ARat disminuya la pérdida de la claudina-5 en los glomérulos y de la claudina-2 y la ocludina en los túbulos proximales. Se observó que en condiciones control y tratadas con ARat la claudina-2 y la ocludina presentan el patrón característico de malla de gallinero en la UE, mientras que en condiciones diabéticas se atenúa y en algunos casos desaparece. Se encontró que el ARat previno la pérdida de la expresión de las claudinas-2 y la ocludina (Figura 15a-b, marca verde) inducidas por la diabetes. En el glomérulo, el ARat atenuó la pérdida de la claudina-5 (Figura 15c). Los hallazgos anteriores se corroboraron mediante Western blot (Figura 16a-d), en donde se encontró que el ARat atenuó significativamente la pérdida de la expresión de la claudina-5 en los glomérulos (Figura 16a y d) y de la claudina-2 y la ocludina en los túbulos proximales (Figura 16a-c). Sin embargo, no se encontró efecto del ARat sobre el aumento en la expresión de las claudinas-4 y 8 inducidas por la diabetes en los túbulos distales (Figura 16e-g). Estos hallazgos demuestran que el efecto antioxidante del ARat atenúa la pérdida de la expresión de las proteínas de la UE en los glomérulos y túbulos proximales, sitios en donde la diabetes indujo estrés oxidante y no tiene efecto en las proteínas de la UE de los túbulos distales. Además los resultados

demuestran que la disminución en la proteinuria y la natriuresis inducida por el ARat se asocian con la preservación de la expresión de las claudinas-2 y -5, respectivamente.



**Figura 15.** El ácido retinoico *all-trans* (ARat) atenuó la pérdida de la claudina-2 y la ocludina en los túbulos proximales y de la claudina-5 en los glomerulos. Se encontró que el ARat atenuó la pérdida de la claudina-2 (a, marca verde) y la ocludina (b, marca verde) en la unión estrecha inducida por la diabetes, evaluada mediante inmunofluorescencia. También, el ARat atenuó la pérdida de la claudina-5 (c) en los glomerulos inducida por la diabetes. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. La dipeptidilpeptidasa (DppD, marca roja) se empleó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal y la cadherina endotelial-vascular (VE-cad, marca roja) se empleó como marcador del endotelio capilar glomerular. Escala = 50 μm. Se muestran imágenes representativas del análisis de 3 ratas diferentes por cada grupo experimental.





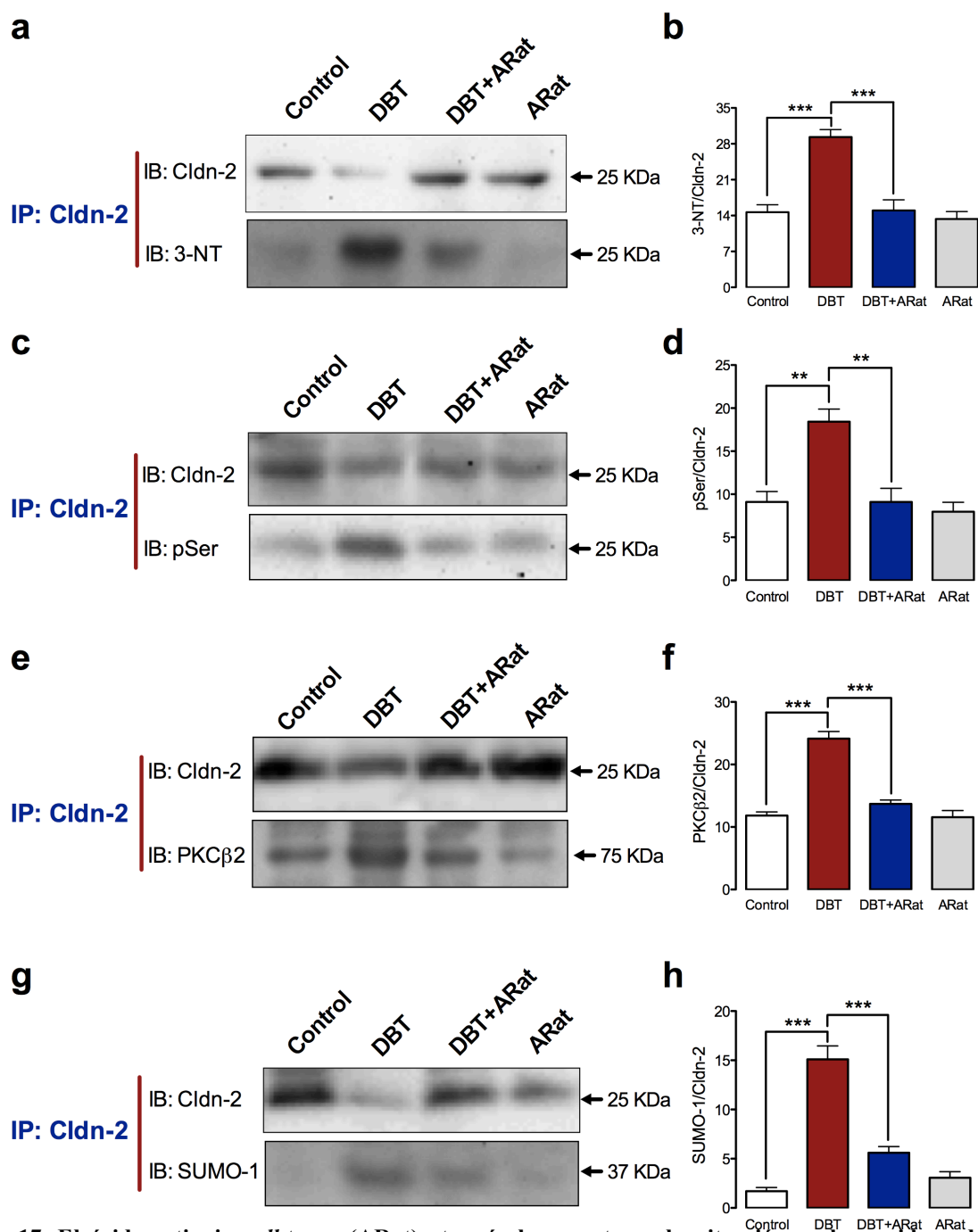
**Figura 16. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) atenuó la pérdida de la expresión de la claudina-2 y la ocludina en los túbulos proximales y de la claudina-5 en los glomérulos inducida por la diabetes.** Se encontró que el ARat disminuyó la pérdida de la expresión de la claudina-2 (a y b) y de la ocludina (a y c) en los túbulos proximales y de la claudina-5 (a y d) en los glomérulos inducidas por la diabetes. Sin embargo, el ARat no tuvo efecto sobre el aumento en la expresión de las claudinas-4 (e y f) y -8 (e y g) inducida por la diabetes. Los análisis densitométricos se muestran en los paneles b, d, f y g. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. Se muestra el promedio±EEM. n = 3. \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

### **9. El ácido retinoico *all-trans* (ARat) mantiene la expresión de la claudina-2 al disminuir su nitración en los residuos de tirosina, su fosforilación en los residuos de serina mediada por PKC $\beta$ 2 y su SUMOilación.**

Con el objetivo de investigar el mecanismo a través del cual el ARat atenúa la pérdida de la claudina-2 inducida por la diabetes, se exploró el efecto del ARat sobre la nitración, la fosforilación y la SUMOilación de la claudina-2. Como se describió anteriormente, el estrés oxidante inducido por la diabetes induce la nitración de la claudina-2 en los residuos de tirosina, lo que disminuye la expresión de la proteína. Para evaluar las modificaciones post-traduccionales que disminuyen la expresión de la claudina-2, ésta se inmunoprecipitó a partir de túbulos proximales aislados. Se encontró que el ARat disminuyó la nitración de la claudina-2 en condiciones diabéticas (Figura 17a y b). En términos generales, la fosforilación de los componentes de la UE por PKCs convencionales desensamblan la UE [3]. Se encontró que al ARat disminuyó la fosforilación en residuos de serina de la claudina-2 (Figura 17c y d) y su co-inmunoprecipitación con PKC $\beta$ 2 (Figura 17e y f), sugiriendo que PKC $\beta$ 2 y la claudina-2 interaccionan entre sí y que PKC $\beta$ 2 induce la fosforilación de la claudina-2, esto constituye un mecanismo adicional a través del cual el ARat atenúa la pérdida de la claudina-2 en condiciones diabéticas. Se ha descrito en estudios *in vitro* que el dominio citoplasmático C-terminal de la claudina-2 humana es sustrato de SUMOilación y que esta modificación disminuye la expresión de la claudina-2 [107]. Por esta razón se analizó la SUMOilación de la claudina-2 y se encontró que el ARat atenuó el aumento en la SUMOilación de la claudina-2, medida mediante la co-inmunoprecipitación de la claudina-2 con SUMO-1, inducida por la diabetes (Figura 17g y

h). Los resultados anteriormente descritos revelan que el ARat atenúa la pérdida de la claudina-2 al disminuir su nitración en residuos de tirosina, su forforilación en residuos de serina y su SUMOilación.





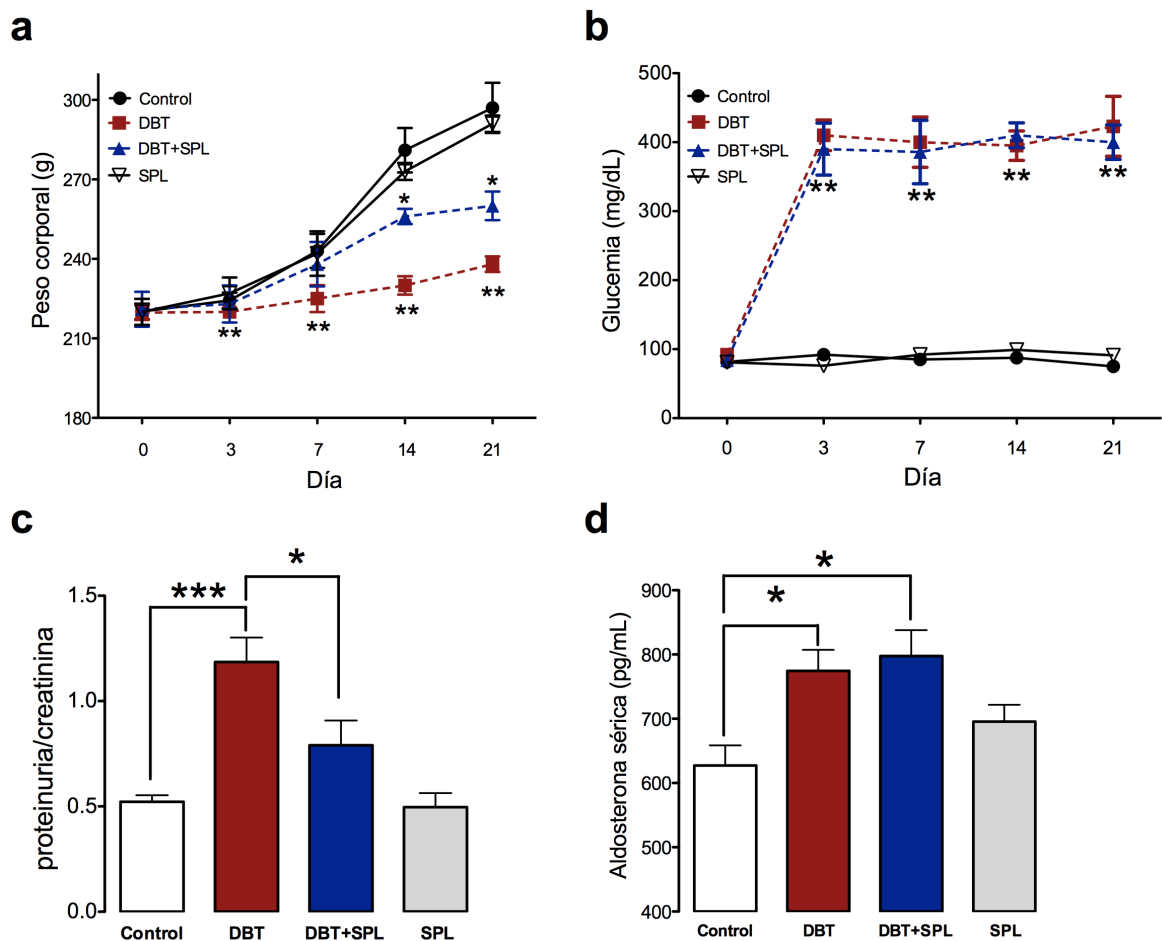
**Figura 17.** El ácido retinoico *all-trans* (ARat) atenuó el aumento en la nitración en los residuos de tirosina (3-NT), la fosforilación en los residuos de serina (pSer) y la SUMOilación de la claudina-2 inducida por la diabetes. Se realizó la inmunoprecipitación de la claudina-2 a partir de túbulos proximales aislados y se encontró que el ARat disminuyó el aumento en la nitración (a y b), la fosforilación en residuos de serina (c y d), la co-inmunoprecipitación con PKCβ2 (e y f) y la SUMOilación (g y h) de la claudina-2 inducida por la diabetes. El análisis densitométrico de los Western blot se muestra en los paneles b, d, f y h. Se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. No se encontraron diferencias entre los grupos control y ARat. Se muestra el promedio±EEM. n = 3. \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001. SUMO-1, small ubiquitin modifier-1 (por sus siglas en inglés).

## **10. La espironolactona ejerce un efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes.**

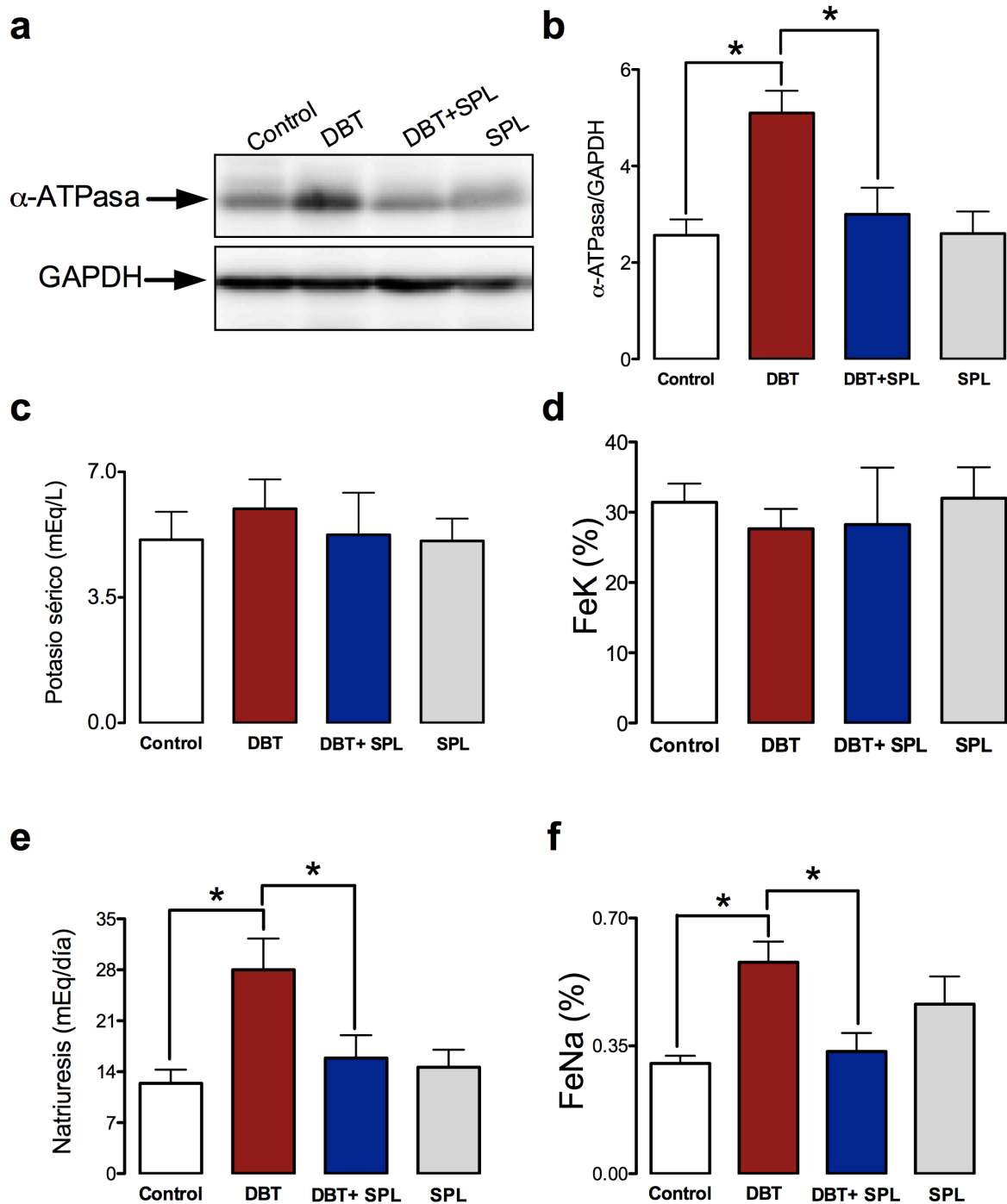
Se ha descrito que las claudinas-4 y-8 interactúan entre sí en el túbulo distal renal donde forman un canal paracelular de cloruro y una barrera catiónica de sodio [5,16,30,35]. Por otro lado, se ha sugerido que la aldosterona regula la vía paracelular a través de la inducción de la expresión de la claudina 8 en el colon distal [87] y la fosforilación de la claudina-4 mediada por WNK4 en las células del conducto colector renal [29]. Por esta razón y debido a la falta de efecto del ARat sobre el aumento de la expresión de las claudinas-4 y -8 inducida por la diabetes, se analizó el papel de la aldosterona en la regulación de las proteínas de la UE en los túbulos distales en condiciones diabéticas. Para inhibir las acciones de la aldosterona se administró espironolactona, que evita la unión de la aldosterona con el receptor de mineralocorticoides. Debido a que se ha descrito que la espironolactona ejerce un efecto nefroprotector en diferentes modelos de daño renal, incluida la nefropatía diabética [79-84], se evaluó el efecto de la espironolactona sobre la pérdida de peso corporal, la hiperglucemia y la proteinuria inducida por la diabetes. Se encontró que la espironolactona atenuó la pérdida de peso (Figura 18a) y la proteinuria (Figura 18c) inducida por la diabetes, estos efectos fueron independientes de la hiperglucemia, ya que las ratas tratadas con espironolactona tuvieron valores de hiperglucemia similares a las ratas diabéticas (Figura 18b). Además, se encontró un aumento en el nivel sérico de aldosterona en la condición diabética (Figura 18d) y que la administración de espironolactona no afecta el nivel sérico de esta hormona ya que se mantiene en niveles elevados similares al grupo diabético (Figura 18d). Estos hallazgos demuestran que la espironolactona ejerce un efecto nefroprotector en el daño renal inducido por la diabetes de manera independiente de la hiperglucemia y el nivel sérico de aldosterona.

Para confirmar que el tratamiento con espironolactona inhibe la activación del receptor de mineralocorticoides, se evaluó la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , ya que esta se regula por la aldosterona. Como era de esperarse, en condiciones diabéticas se encontró un aumento de la expresión de la  $\alpha$  ATPasa y el tratamiento con espironolactona disminuyó la expresión de esta proteína (Figura 19a y b). Sin embargo, una de las principales restricciones del uso de espironolactona se debe a que eleva el nivel

sérico de potasio (hipercalcemia), [108]. En este estudio no se encontraron cambios significativos ni en el nivel sérico de potasio ni en la excreción fraccional de potasio (FeK) entre los 4 grupos experimentales (Figura 19c y d). Con estos resultados se concluye que el esquema de tratamiento con espironolactona inhibió las acciones de la aldosterona sin inducir hipercalcemia. Además se encontró que la espironolactona atenuó el aumento en la natriuresis (Figura 19e) y en la excreción fraccional de sodio (Figura 19f) inducida por la diabetes. Estos hallazgos confirman que la espironolactona ejerce efecto nefroprotector en la disfunción renal inducida por la diabetes.



**Figura 18. La espironolactona (SPL) atenuó la pérdida de peso y el aumento en la proteinuria inducida por la diabetes.** Se monitoreó el peso corporal (a) y la glucemia (b) los días 0, 3, 7, 14 y 21 después de la inducción de la diabetes. La SPL disminuyó la pérdida de peso (a) y no tuvo efecto sobre la hiperglucemia (b) inducida por la diabetes. \* $p < 0.05$  vs DBT y \*\* $p < 0.01$  vs control. La SPL disminuyó de manera significativa el aumento en el cociente proteinuria/creatinina (c) y no tuvo efecto sobre el aumento en el nivel sérico de aldosterona (d) inducido por la diabetes. No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM.  $n = 6-8$ . \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



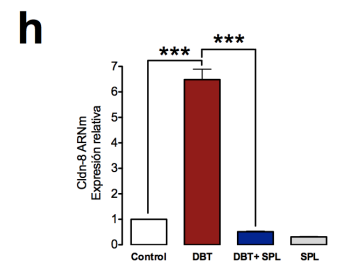
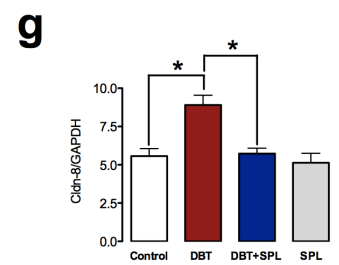
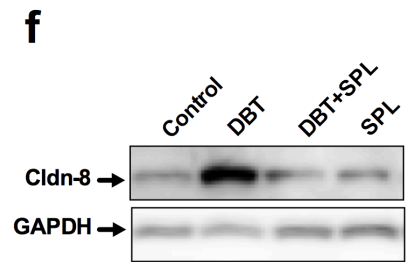
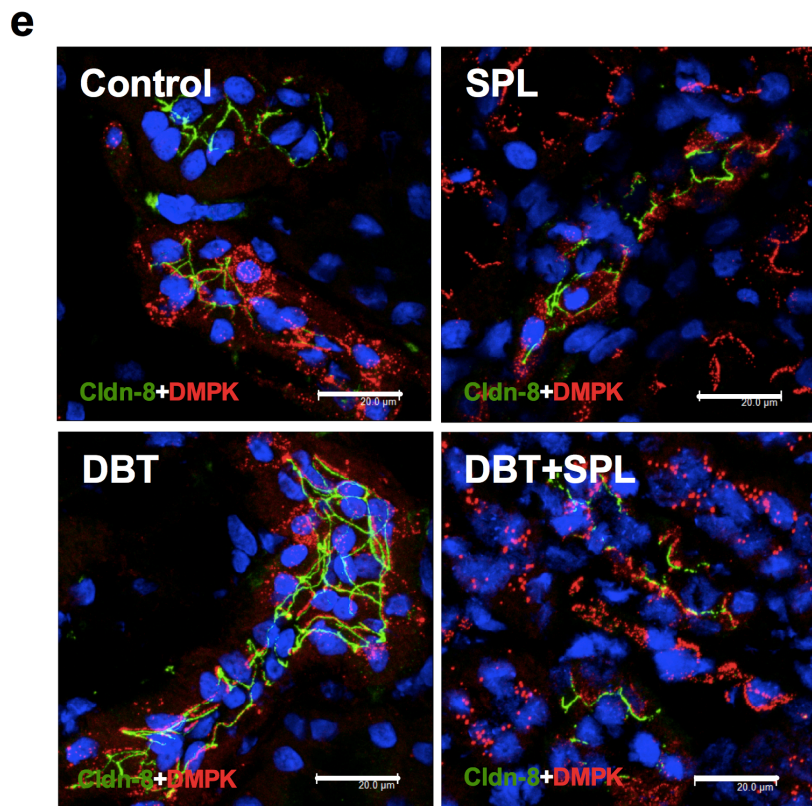
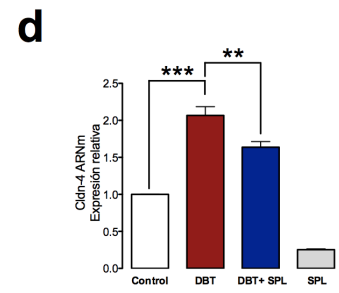
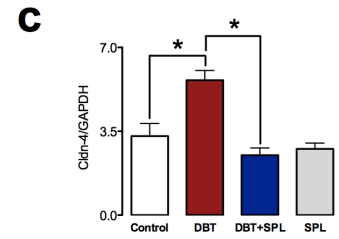
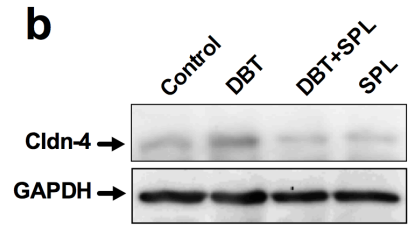
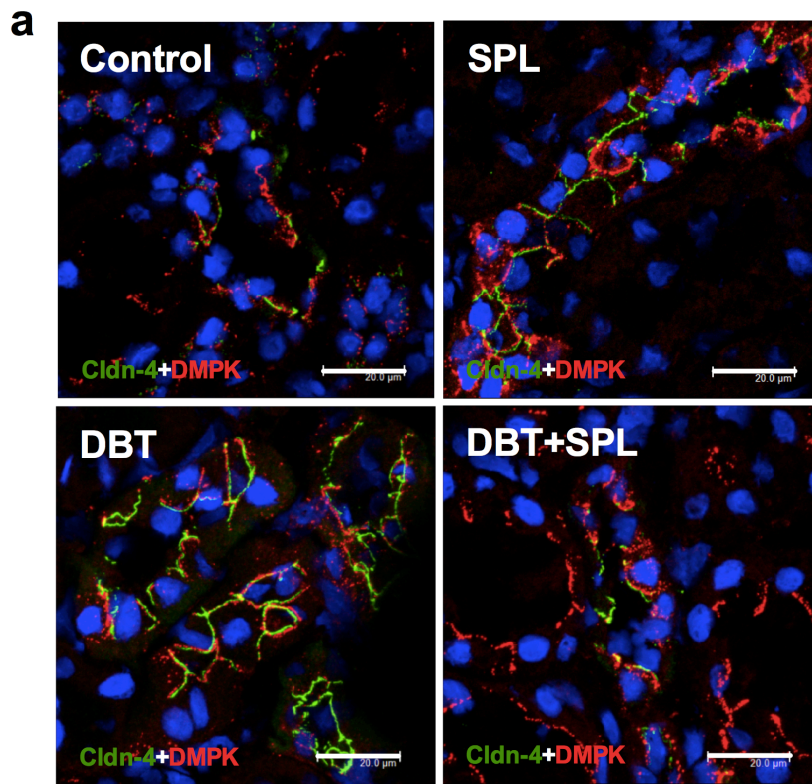
**Figura 19.** La espironolactona (SPL) disminuyó la activación del receptor de mineralocorticoides (MCR) evaluado mediante la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , y disminuyó la natriuresis inducida por la diabetes sin tener efecto sobre el nivel sérico de potasio. La SPL disminuyó el aumento en la expresión de la  $\alpha$ -ATPasa (a). El análisis densitométrico se muestra en el panel b. Se encontró que la SPL no tuvo efecto sobre el nivel sérico de potasio (c) ni sobre su excreción fraccional renal (FeK) (d). La SPL disminuyó el aumento en la natriuresis (e) y la excreción fraccional de sodio (FeNa) (f) inducido por la diabetes. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra el promedio $\pm$ EEM.  $n = 3$  para el Western blot y  $n = 4-6$  para el análisis sérico y urinario de sodio y potasio. \* $p < 0.05$ .

## **11. La aldosterona aumenta la expresión y co-localización de las claudinas-4 y -8 en la UE de los túbulos distales en condiciones diabéticas.**

Para evaluar si la aldosterona aumenta la expresión de las claudinas-4 y -8 en la condición diabética, se evaluó la expresión de ambas proteínas en las ratas diabéticas tratadas con espironolactona. Se encontró que la espironolactona disminuyó la expresión de las claudinas-4 y -8 en la UE (Figura 20a y e, marca verde) en los túbulos distales (marcados con DMPK, marca roja). Los datos anteriores se confirmaron mediante Western blot y se encontró que la espironolactona atenuó de manera significativa el aumento de la expresión de las claudinas-4 (Figura 20b y c) y -8 (Figura 20f y 20g) inducidas por la diabetes. Además se evaluó la expresión de ARNm mediante qRT-PCR y se encontró que la diabetes induce significativamente la expresión del ARNm de las claudinas-4 (Figura 20d) y -8 (Figura 20h) y que la espironolactona disminuye este efecto (Figura 20d y h). Estos hallazgos confirman que el aumento en la proteína se debe al aumento en la expresión de su ARNm.

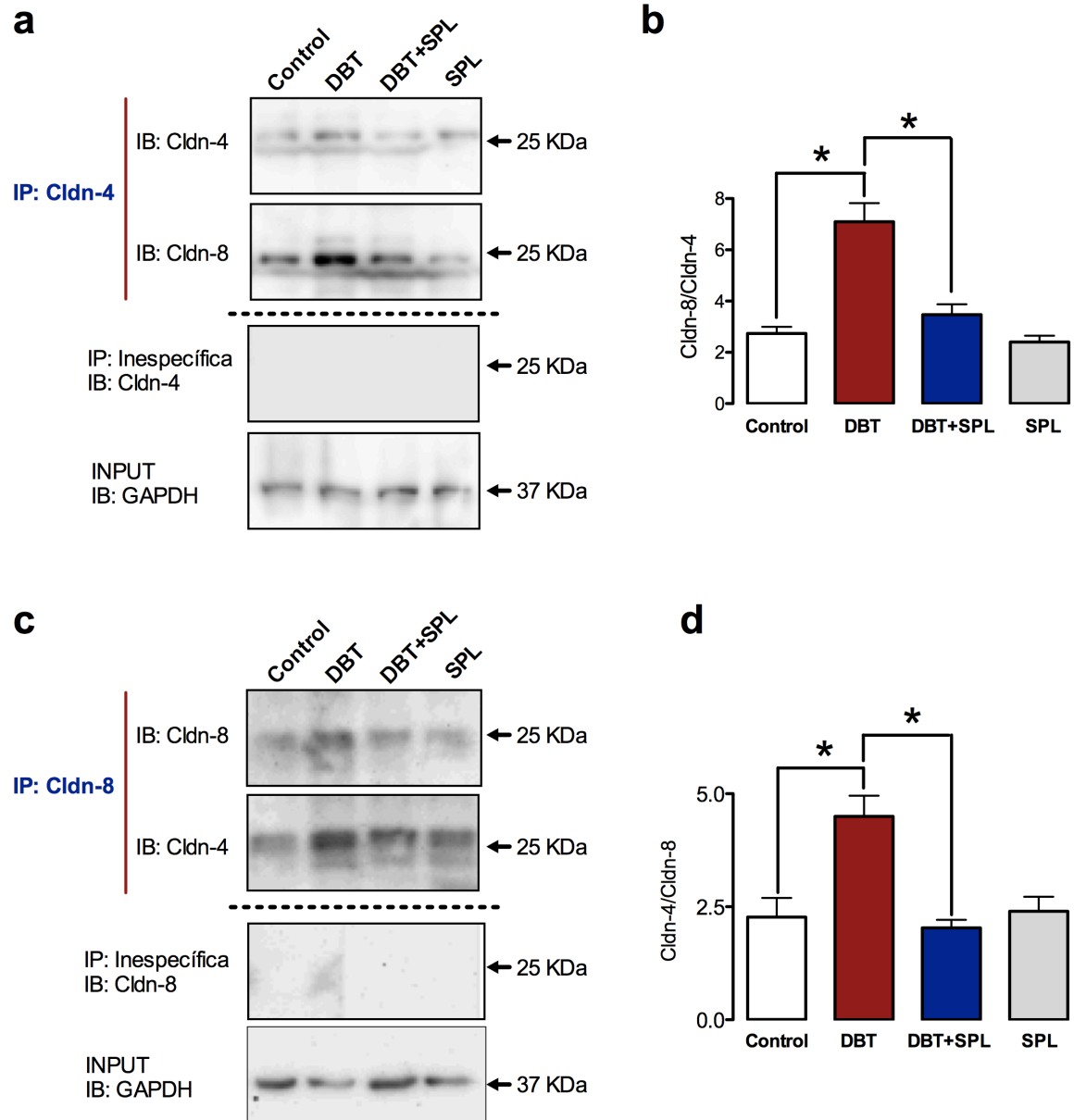
Para evaluar si las claudinas-4 y -8 interactúan entre sí, se realizó la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas a partir de túbulos distales aislados. Para ello se inmunoprecipitó a la claudina-4 y se analizó su interacción con la claudina-8 (Figura 21a), de manera similar, se inmunoprecipitó a la claudina-8 y se analizó su interacción con la claudina-4 (Figura 21c). Se encontró que la diabetes aumentó la co-inmunoprecipitación de las claudinas-4 y -8 (Figura 21a y b), esto se debe a que aumenta la expresión de ambas proteínas. Además, la espironolactona disminuyó de manera significativa la interacción de ambas proteínas (Figura 21b y d). Como control negativo, se realizó la inmunoprecipitación de ambas proteínas con un anticuerpo inespecífico no relacionado, donde no se observó marca específica. Además, se presenta el Western blot de la GAPDH en la carga total (INPUT) en donde se observa que se partió de la misma cantidad de proteína para realizar las inmunoprecipitaciones de los 4 grupos experimentales.

Estos hallazgos confirman que la aldosterona aumenta la expresión e interacción entre sí de las claudinas-4 y -8 en los túbulos distales en condiciones diabéticas ya que estos cambios disminuyeron con espironolactona.





**Figura 20. La espironolactona (SPL) disminuyó el aumento del ARNm y de la expresión de las claudinas-4 y -8 inducida por la diabetes.** La expresión de las claudinas-4 y -8 se evaluó, mediante inmunofluorescencia (a y e), Western blot (b y f) y qRT-PCR (c y g). Se encontró que la SPL disminuyó la localización de las claudinas-4 y -8 (marca verde) en la UE de los túbulos distales. Se utilizó desmoplaquina (DMPK, marca verde) como marcador del túbulo distal. La SPL disminuyó la expresión y el ARNm de las claudinas-4 (b, c y d) y -8 (f, g y h) en el túbulo distal. El análisis densitométrico de las claudinas-4 y -8 se muestra en los paneles c y g, respectivamente. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de carga. Se utilizó DAPI (marca azul) para marcar los núcleos. No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Escala = 20  $\mu$ m. Se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 3. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.



**Figura 21. La espironolactona (SPL) disminuyó la co-inmunoprecipitación de las claudinas-4 y -8 inducida por la diabetes.** Se inmunoprecipitaron las claudinas-4 y -8 a partir de tubulos distales aislados y se encontró que la SPL disminuyó la co-inmunoprecipitación de ambas claudinas (a y c) inducida por la diabetes. El análisis densitométrico de la co-inmunoprecipitación se muestra en los paneles b y d. Se realizó la inmunoprecipitación inespecífica con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de la carga total (INPUT). No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra el promedio±EEM. n = 3. \*p<0.05.



## **12. La aldosterona induce la expresión de WNK4 y su interacción con las claudinas-4 y -8 lo que induce la localización de las claudinas-4 y -8 en la UE y aumenta su fosforilación en los residuos de treonina.**

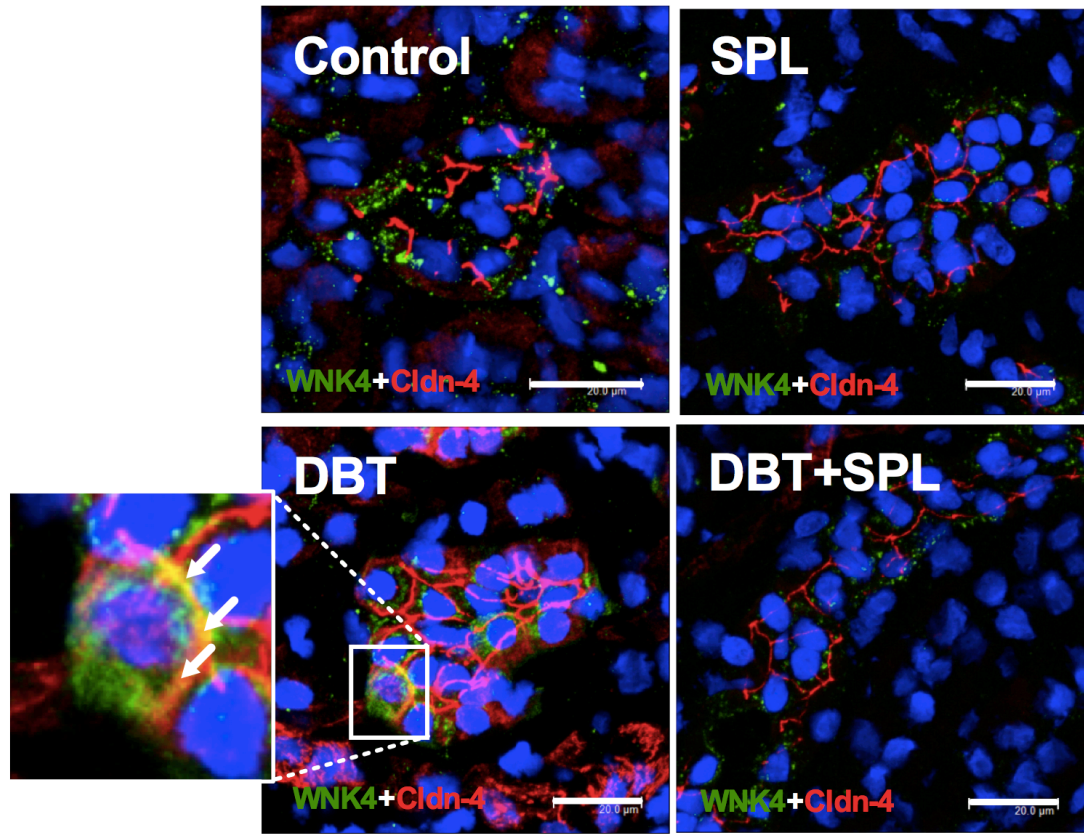
Para evaluar el mecanismo a través del cual la aldosterona promueve la interacción de las claudinas-4 y -8 y la formación del canal paracelular aniónico, se evaluó la co-localización de las claudinas-4 y -8 con la cinasa WNK4, esto debido a que se ha informado que WNK4 se localiza en la UE [109] donde fosforila a la claudina-4 [85], y que además la fosforilación de las claudinas es esencial para la función de estas proteínas como canales paracelulares aniónicos y catiónicos [1]. Se encontró que en condiciones diabéticas existe un aumento en la colocalización de las claudinas-4 y -8 (Figura 22a y b, marca roja) con WNK4 (Figura 22a y b, marca verde y flechas blancas) y que esta co-localización disminuye en las ratas tratadas con espironolactona (Figura 22a y b). Se analizó mediante Western blot la expresión de WNK4 y se encontró que la diabetes aumenta la expresión de esta proteína (Figura 23a y b) la cual disminuyó con espironolactona, también se evaluó la expresión del ARNm de WNK4 y se encontró que la espironolactona disminuyó el aumento en la expresión del ARNm de WNK4 inducido por la diabetes (Figura 23c). Estos hallazgos explican que el mecanismo a través del cual la diabetes aumenta la interacción de WNK4 con las claudinas-4 y -8 y su co-localización en la UE es a través del aumento en la expresión de estas tres proteínas.

Para confirmar la interacción de WNK4 con las claudinas-4 y -8, se analizó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con la claudina-4 (Figura 23d) y con la claudina-8 (Figura 23f). Se encontró que en condiciones diabéticas existe un aumento en la interacción de WNK4 con las claudinas-4 y -8 (Figura 23d y f) y que esta interacción disminuyó con espironolactona. La co-inmunoprecipitación inversa de las claudinas-4 (Figura 23e) y -8 (Figura 23g) con WNK4 confirmó los hallazgos anteriormente descritos. No se observó señal en las inmunoprecipitaciones inespecíficas.

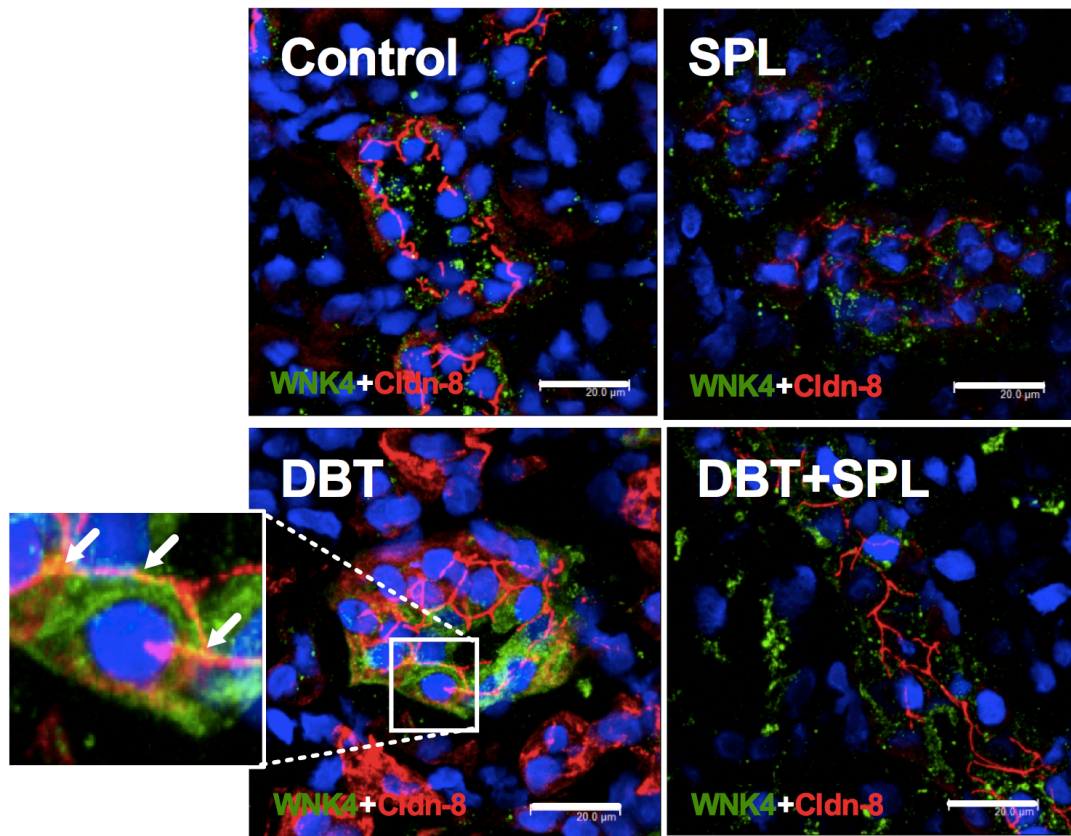
La WNK4 es una cinasa de serinas y treoninas que se localiza en la UE y en el citoplasma [109]. Se evaluó si la interacción entre WNK4 con las claudinas-4 y -8 favorece la fosforilación en residuos de serina y/o treonina de ambas proteínas. Como era de esperarse, se encontró que la diabetes aumentó la fosforilación de las claudinas-4 (Figura 24a) y -8 (Figura 24b) en residuos de treonina, y que la espironolactona disminuyó esta

fosforilación. Por lo contrario, la diabetes no indujo la fosforilación en residuos de serina de las claudinas-4 y -8 (Figura 24a y b). Estos hallazgos sugieren que en condiciones diabéticas, el aumento en la expresión del ARNm y de la proteína de WNK4 promueve su localización en la UE y su interacción con las claudinas-4 y -8 induciendo la fosforilación en residuos de treonina de éstas últimas.

**a**

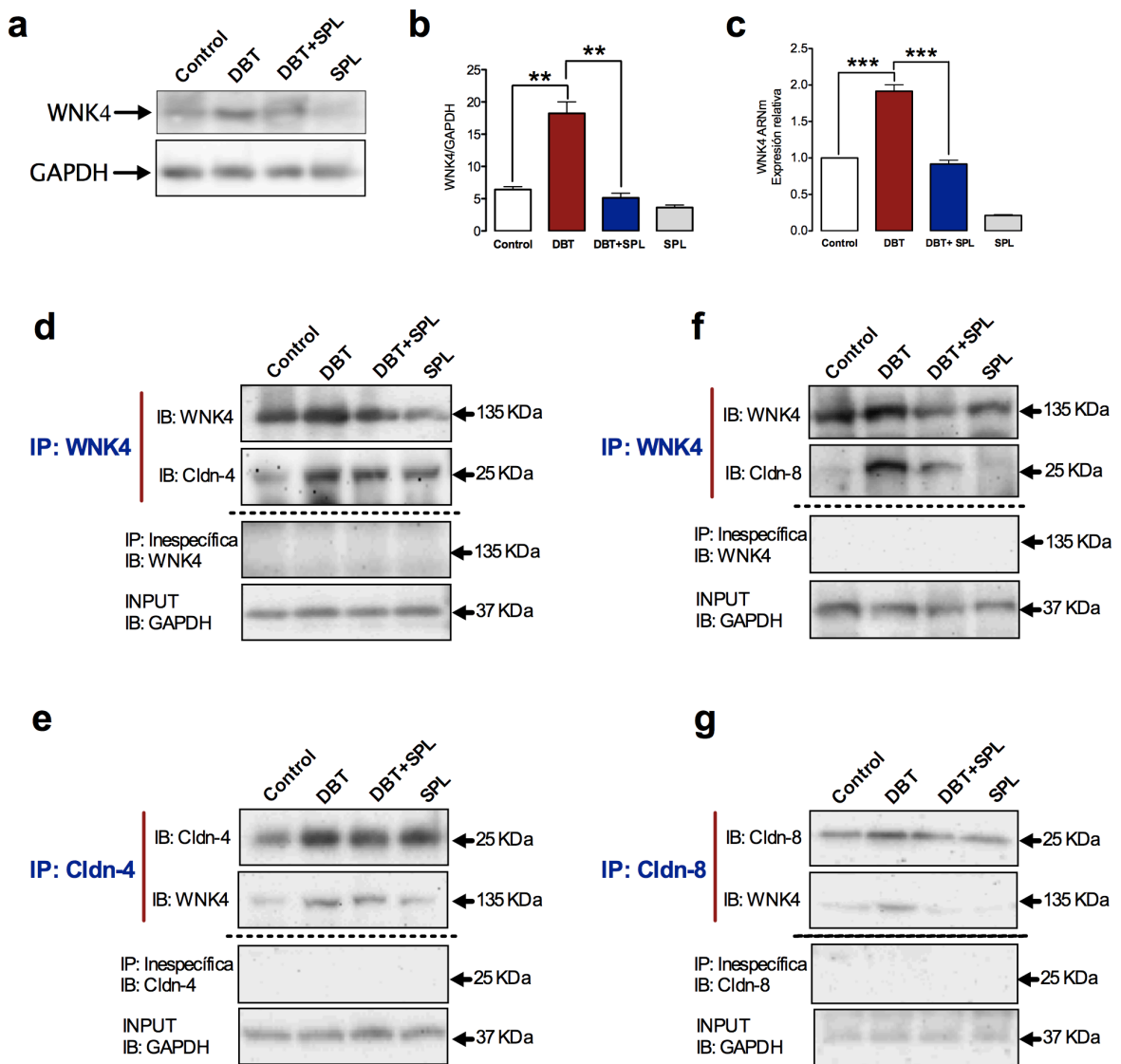


**b**



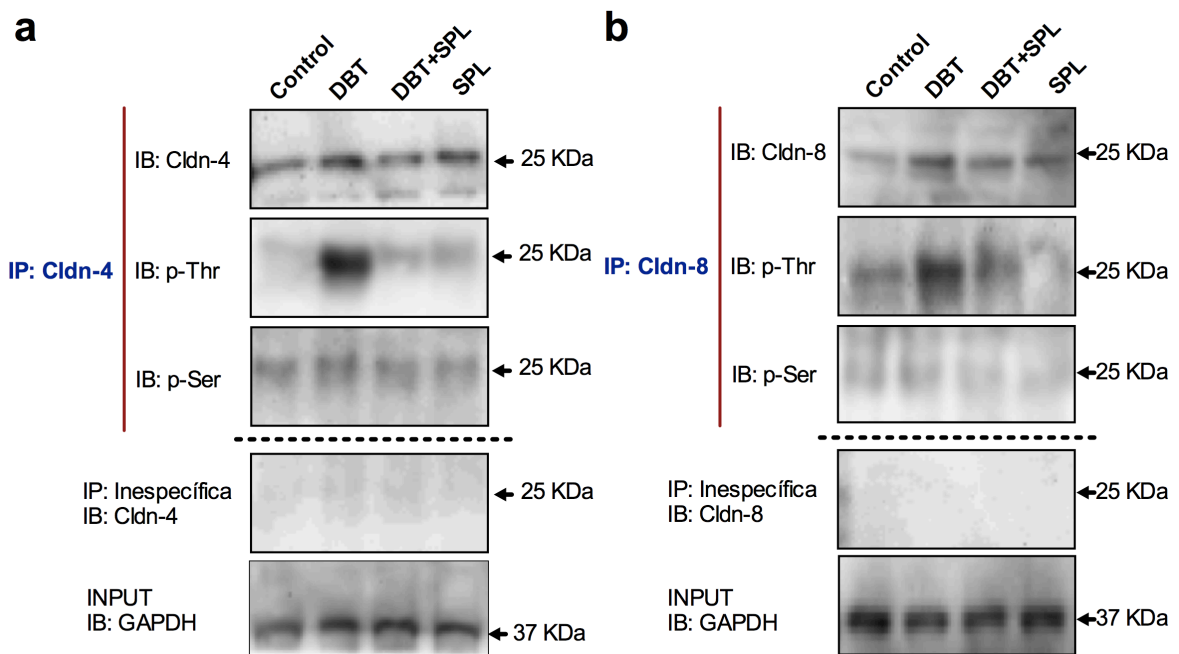


**Figura 22. La espironolactona (SPL) disminuyó la co-localización de las claudinas-4 y -8 y de la cinasa WNK4 en la unión estrecha (UE) inducida por la diabetes.** Se analizó, mediante inmunofluorescencia, la localización de las claudinas-4 y -8 y WNK4 en la UE (a y b) y se encontró que la SPL disminuyó la co-localización de las claudinas-4 y -8 ( marca roja) con WNK4 (marca verde) en la UE inducida por la diabetes. Se muestra un acercamiento de la co-localización de las claudinas-4 y -8 con WNK4 (flechas blancas) en la UE. Se utilizó DAPI (azul) para marcar a los núcleos. No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Escala = 20  $\mu$ m. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes de 3 animales diferentes en cada grupo.





**Figura 23. La espirolactona (SPL) disminuyó la expresión y el ARNm de la cinasa WNK4 y su co-inmunoprecipitación con las claudinas-4 y -8 inducida por la diabetes.** Se analizó la expresión y la co-inmunoprecipitación de WNK4 con las claudinas-4 y -8 en los túbulos distales aislados y se encontró que la SPL disminuyó significativamente el aumento en la expresión (a y b) y el ARNm (c) de WNK4, evaluado mediante Western blot y qRT-PCR, respectivamente, inducida por la diabetes. Se muestra el análisis densitométrico en el panel c. Además se encontró que la SPL disminuyó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con la claudina-4 (d) y con la claudina-8 (f) inducida por la diabetes. Estos hallazgos se corroboraron mediante la inmunoprecipitación inversa de las claudinas-4 y -8 con WNK4 (e y g). Se realizó la inmunoprecipitación inespecífica con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de la carga total (INPUT). No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra el promedio  $\pm$ EEM. n = 3. \*\*\*p<0.001.

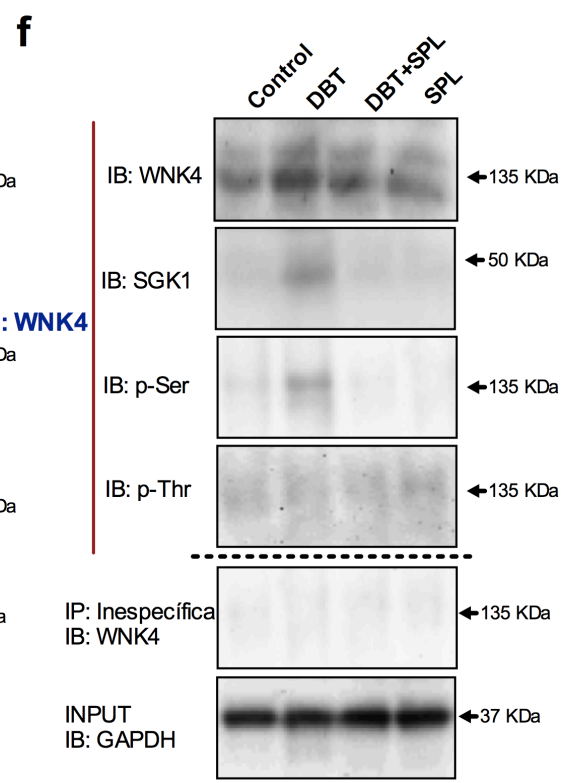
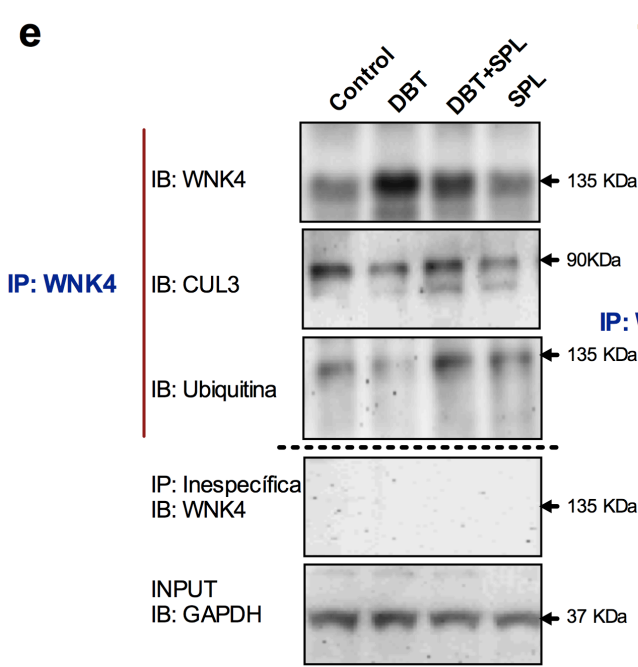
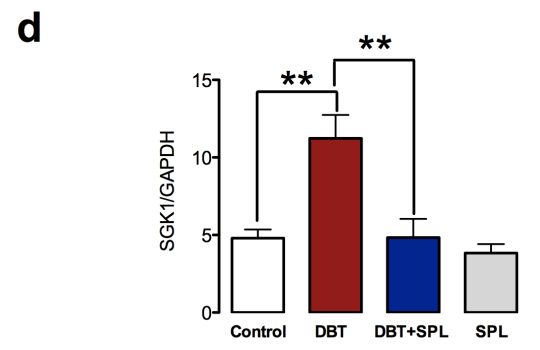
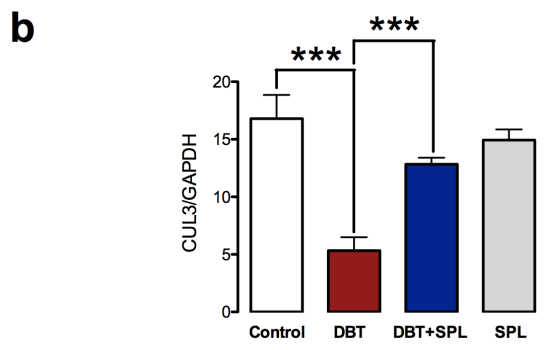
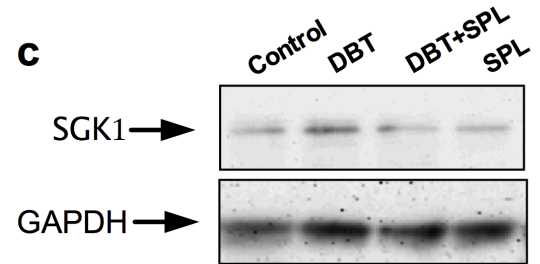
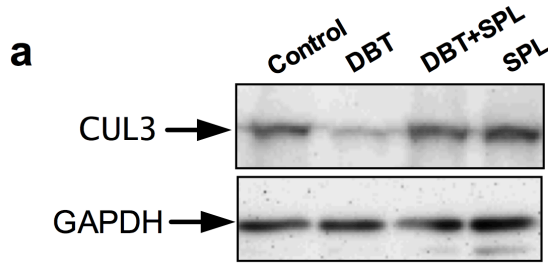


**Figura 24. La espirolactona (SPL) disminuyó el aumento en la fosforilación en residuos de treonina (p-Thr) de las claudinas-4 y -8, inducida por la diabetes.** Se analizó la fosforilación en residuos de treonina (p-Thr) y de serina (p-Ser) de las claudinas-4 y -8 y se encontró que la SPL disminuyó el aumento en la p-Thr de las claudinas-4 (a) y -8 (b) inducida por la diabetes. No se encontraron cambios en p-Ser de las claudinas-4 y -8. Se realizó la inmunoprecipitación inespecífica con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de la carga total (INPUT). No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

### **13. La aldosterona aumenta la expresión de WNK4 al disminuir su ubiquitinación mediada por CUL3 y aumenta su fosforilación en residuos de serina mediada por SGK1.**

La expresión de WNK4 se regula por su interacción con el complejo KLHL3/CUL3, el cual secuestra a WNK4 en el citoplasma, la poliubiquitina en al menos 15 residuos de lisina promoviendo su degradación [110,111]. Se evaluó a CUL3 y se encontró que la diabetes disminuyó su expresión de CUL3, la cual se restaura con espironolactona (Figura 25a y b). Se analizó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con CUL3 y se encontró una disminución en la interacción entre ambas proteínas en condiciones diabéticas (Figura 25e), lo cual se debe a la disminución en la expresión de CUL3 inducida por la diabetes, como se mencionó anteriormente. La CUL3 promueve la ubiquitinación de WNK4, y como era de esperarse, en condiciones diabéticas en las cuales existe una menor expresión y co-inmunoprecipitación de CUL3 con WNK4, se encontró una menor ubiquitinación de WNK4 (Figura 25e) lo cual explica el aumento de la expresión de WNK4. Estos hallazgos explican el mecanismo a través del cual la diabetes aumenta la expresión y localización de WNK4 en la UE.

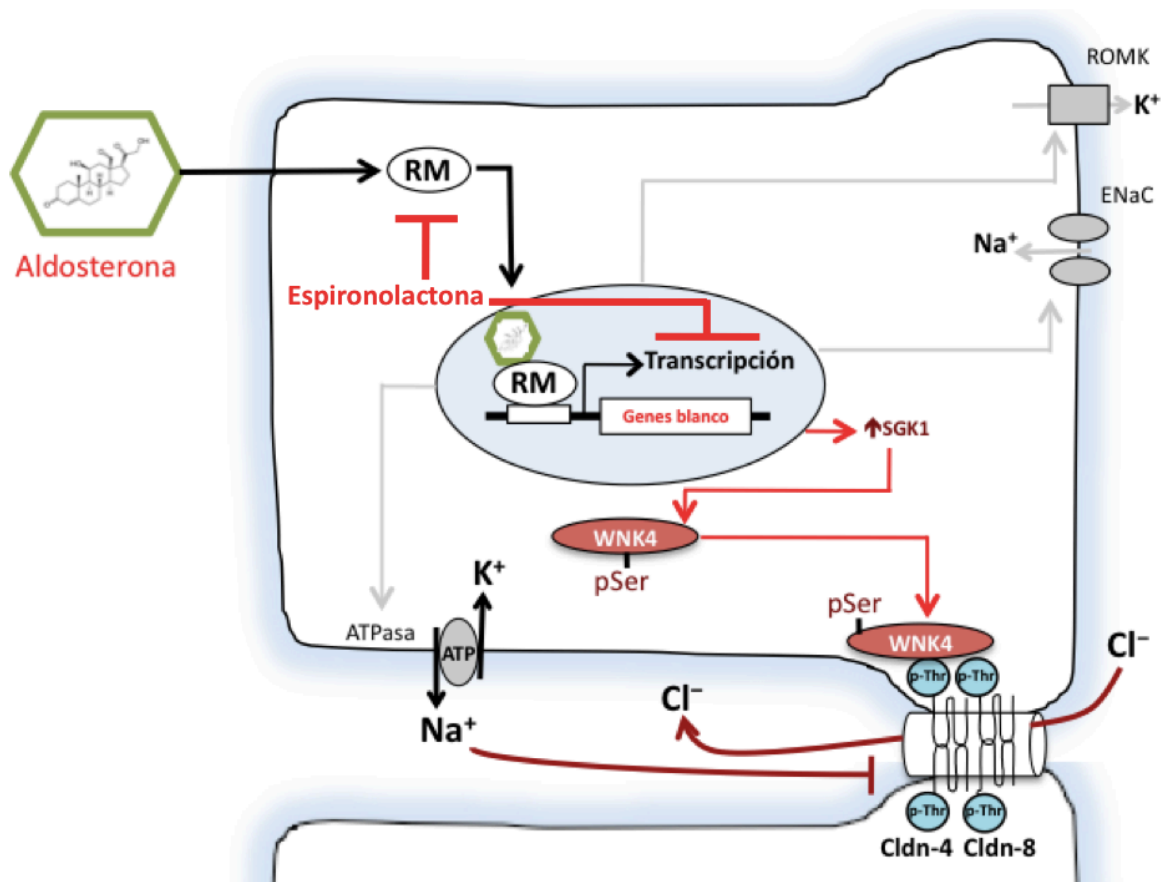
Por otro lado, la SGK1 es una cinasa de serinas y treoninas y es uno de los principales blancos transcripcionales que median los efectos de la aldosterona [112]. Además, la SGK1 fosforila a WNK4 en la serina 1169 [113], promoviendo un estado de WNK4 en el cual aumenta la secreción de potasio [113]. Como era de esperarse, en la diabetes (en la cual existe un aumento en el nivel sérico de aldosterona) se encontró un aumento en la expresión de SGK1, la cual disminuyó con espironolactona (Figura 25c y d). Además, se encontró que en condiciones diabéticas existe un aumento en la co-inmunoprecipitación de WNK4 con SGK1 y en consecuencia un aumento en la fosforilación en residuos de serina de WNK4 (Figura 25f), estos efectos disminuyeron con espironolactona (Figura 25f). No se encontraron cambios en la fosforilación en residuos de treonina de WNK4 (Figura 25f). Estos hallazgos describen que en condiciones diabéticas SGK1 fosforila en residuos de serina a WNK4 aumentando su actividad, su localización en la UE y su capacidad de fosforilar a las claudinas-4 y -8 (Esquema 18).





**Figura 25. La espironolactona (SPL) atenuó la disminución en la expresión de culina 3 (CUL3) y el aumento en la expresión y forforilación en residuos de serina (p-Ser) de SGK1 inducida por la diabetes.** Se analizó la expresión de CUL3 (a y b) y de SGK1 (c y d) y se encontró que la SPL atenuó la disminución de la expresión de CUL3 y el aumento de SGK1 inducida por la diabetes. El análisis densitométrico de CUL3 y SGK1 se muestra en los paneles b y d, respectivamente. Además, se analizó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con CUL3 y su ubiquitinación (e) y se encontró que la SPL aumentó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con CUL3 (e) y la ubiquitinación de WNK4 inducida por la diabetes. También se analizó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con SGK1 y la fosforilación de WNK4 en residuos de serina (p-Ser) y de treonina (p-Thr) y se encontró que la SPL disminuyó la co-inmunoprecipitación de WNK4 con SGK1 y la fosforilación en residuos de serina de SGK1 (f) inducida por la diabetes. No se encontraron cambios en p-Thr de WNK4. Se realizó la inmunoprecipitación inespecífica con un anticuerpo no relacionado de la misma especie como control negativo. La deshidrogenasa del gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) se utilizó como control de la carga total (INPUT). No se encontraron diferencias entre los grupos control y SPL. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. En el caso de los Western blot totales de CUL3 y de SGK1 se muestra el promedio $\pm$ EEM. n = 3. \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.





**Esquema 18. Mecanismo propuesto a través del cual la aldosterona regula la expresión y fosforilación de las claudinas-4 y -8 en el túbulo distal.** En condiciones diabéticas la aldosterona se une al receptor de mineralocorticoides (RM) y promueve la transcripción de la cinasa de glucocorticoides séricos (SGK1). SGK1 fosforila a la cinasa sin lisina (WNK4) en residuos de serina, lo que promueve su localización en la unión estrecha (UE) donde fosforila a las claudinas-4 y -8 en residuos de treonina y estabiliza la formación del canal paracelular de Cl<sup>-</sup> que a su vez funciona como una barrera catiónica que evita la salida en reversa del Na<sup>+</sup> que se absorbe por la vía transcelular. Todos estos efectos se inhibieron al bloquear la unión de la aldosterona al RM con la espironolactona. Cldn, claudina; p-Ser, fosforilación en residuos de serina; p-Thr, fosforilación en residuos de treonina; ENaC, canal epitelial de sodio; ROMK, canal epitelial de potasio.

## VIII. Discusión

En la diabetes las complicaciones renales son severas y a largo plazo inducen la insuficiencia renal. En etapas tempranas de la ND existe un desbalance en el manejo renal de NaCl [114,115]. En esta tesis demostramos que las claudinas, los componentes membranales de la UE, juegan un papel importante en el manejo renal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los túbulos contorneados proximales y distales. Encontramos que el estrés oxidante inducido la activación de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS disminuye la expresión de la claudina-5 en los glomérulos y de la claudina-2 en los túbulos proximales. Mientras que en los túbulos distales, aumentó la expresión y fosforilación de las claudinas-4 y -8 por un mecanismo mediado por la aldosterona a través de las cinasas SGK1 y WNK4. La disminución de la claudina-5 explica en parte el aumento en la proteinuria ya que la integridad del endotelio capilar glomerular regula la filtración de las proteínas del plasma. Por otro lado, la disminución de la claudina-2 en el túbulo proximal explica el mecanismo a través del cual la diabetes disminuye la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en este segmento de la nefrona y en consecuencia el aumento en la eliminación urinaria de este ión o natriuresis. El aumento en la expresión de las claudinas-4 y -8, ambas proteínas formadoras del canal paracelular de  $\text{Cl}^-$  en el túbulo distal, sugiere una mayor absorción de  $\text{Cl}^-$  por la vía paracelular. Con base en estos hallazgos, proponemos que las claudinas pueden ser un blanco terapéutico atractivo para tratar el desbalance de NaCl en las etapas iniciales de la ND.

Diversos mecanismos están implicados en la desregulación del transporte transcelular de iones en el riñón diabético. Por ejemplo, se ha encontrado que la hiperglucemia inducida por la administración de STZ aumenta el ARNm y la expresión de la proteína del transportador de  $\text{K}^+2\text{Cl}^-$  (KCC3) en la membrana basolateral de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, en este contexto, el aumento en la reabsorción de glucosa promueve la reabsorción de  $\text{Cl}^-$  mediado por KCC3 en el túbulo contorneado proximal [116]. En la diabetes, se ha reportado el aumento de la concentración sérica de  $\text{Cl}^-$  y de la concentración urinaria de  $\text{Na}^+$  en ratas con hiperglucemia [117]. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en el este estudio.

El estrés oxidante juega un papel importante en el inicio y progresión de la insuficiencia renal en la diabetes. En términos generales, el estrés oxidante disminuye la expresión de las proteínas blanco ya que afecta a diversas macromoléculas modificando su estructura y

función y promoviendo su degradación posterior. Debido a esto, se analizó el estado de estrés oxidante en los diferentes segmentos de la nefrona mediante la producción del anión superóxido. Se encontró que la diabetes indujo estrés oxidante en los glomérulos y en los túbulos proximales a través de un mecanismo dependiente de la activación de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS. Sin embargo, en los túbulos distales no se indujo la producción del anión superóxido, desmostrándose de esta forma que el glomérulo y el túbulo proximal son más susceptibles al daño por la hiperglucemia ya que es en estos segmentos de la nefrona donde se reabsorbe la mayor cantidad de glucosa filtrada [2]. El aumento de la expresión de los transportadores de glucosa GLUTs y SGLTs favorece un aumento en la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal, lo que promueve el estrés oxidante vía la activación de PKC $\beta$ 2 (Esquema 16). De manera interesante se encontró que los segmentos de la nefrona en los cuales la diabetes disminuyó la expresión de las proteínas de la UE coincide con los mismos segmentos en los cuales la diabetes indujo estrés oxidante. Estos hallazgos nos llevaron a explorar el impacto directo del estrés oxidante sobre las proteínas de la UE, para demostrar esto se inmunoprecipitó a la claudina-2 de los túbulos proximales y se encontró que la diabetes indujo la nitración en residuos de tirosina de la de esta proteína. Estos hallazgos confirman que la UE es sensible al estado redox intracelular y que el estrés oxidante desensambla los componentes de la UE como se ha descrito previamente [90,98-100]. Sin embargo, el estrés oxidante afecta directa o indirectamente a las proteínas, esto último debido a la activación de rutas de señalización que impactan en las proteínas blanco. Por ejemplo, se ha descrito que la acumulación intracelular de glucosa induce estrés oxidante a través de la activación de la NADPH oxidasa dependiente de la PKC $\beta$ 2. Asimismo, las PKCs convencionales, en términos generales, fosforilan a los componentes de la UE y la desensamblan. En este estudio se demostró que la diabetes aumentó la expresión de PKC $\beta$ 2 en los glomérulos y los túbulos proximales y fosforiló a la claudina-2 en residuos de serina al promover la interacción directa de la claudina-2 con PKC $\beta$ 2.

Los hallazgos de que el estrés oxidante está implicados en la disminución de las proteínas de la UE en los glomérulos y túbulos proximales se confirmaron cuando se dio el tratamiento con ARat, el cual como se demostró, ejerce efecto antioxidante en el riñón diabético a través de la disminución de la expresión de las subunidades de la NADPH

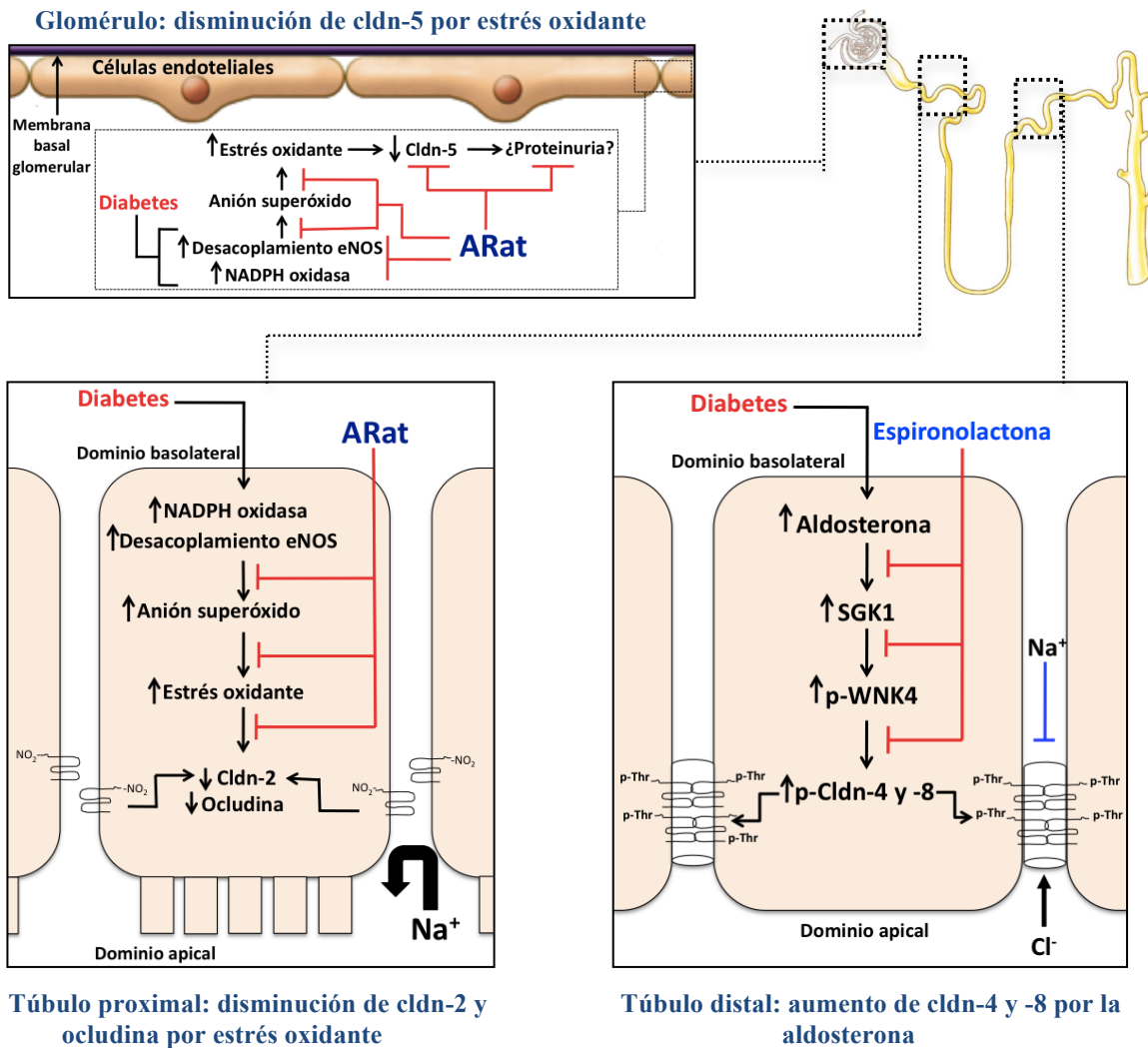
oxidasa, la disminución de la expresión de PKC $\beta$ 2 y la prevención del desacoplamiento de la eNOS. Cuando se analizó la nitración de la claudina-2, se encontró que el ARat disminuyó la nitración de la claudina-2 en residuos de tirosina, la fosforilación en residuos de serina y su interacción con PKC $\beta$ 2. Además se exploró la SUMOilación de la claudina-2 ya que su asociación con SUMO-1 en el dominio C-terminal favorece su degradación. En esta tesis describimos que la SUMOilación de la claudina-2 ocurre *in vivo* en la diabetes. El ARat también disminuyó la SUMOilación de la claudina-2 favoreciendo de esta forma la expresión de la proteína. Además el ARat preservó la expresión de la claudina-5, sin embargo no se exploraron las modificaciones post-traduccionales que explican la regulación de esta proteína en la diabetes. Por otro lado, el ARat no tuvo efecto sobre las proteínas de UE en los túbulos distales, esto se puede explicar por dos mecanismos: 1) Se desconoce la expresión del receptor del ARat en las porciones distales de la nefrona, aunque se ha encontrado la expresión del ARNm, la presencia de la proteína no se ha evidenciado [118,119] y 2) como en los túbulos distales aumentó la expresión de las claudinas-4 y -8 es de esperarse que el tratamiento con el ARat no tenga efecto, ya que solo preserva la expresión de las claudinas que sufren daño por estrés oxidante. Debido a estos resultados, decidimos explorar el mecanismo de sobre-expresión de las claudinas-4 y -8 en los túbulos distales, dado que en estudios *in vitro* se ha sugerido que la aldosterona podría regular las claudinas, decidimos evaluar esta posibilidad. Para ello, primero se confirmó que en la diabetes existe un aumento en el nivel sérico de aldosterona y después se evaluó este aspecto al inhibir las acciones de la hormona con la espironolactona que es el inhibidor competitivo del receptor de mineralocorticoides.

Se han descrito ampliamente los efectos clásicos de la aldosterona sobre el manejo transcelular de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Existen estudios que han sugerido que la aldosterona podría regular la ruta paracelular a través del aumento de la expresión y la fosforilación de las claudinas-8 y -4, respectivamente. Se ha descrito la participación importante de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el inicio y la progresión de la nefropatía diabética, por esta razón se exploró el efecto de la aldosterona en la regulación de las claudinas-4 y -8 en los túbulos distales. Para ello, las ratas diabéticas se trataron con espironolactona, que es un antagonista del receptor de mineralocorticoides que inhibe las acciones de la aldosterona. Como se describió anteriormente, se encontró que la diabetes

aumentó el nivel sérico de la aldosterona, que la espironolactona inhibió la acción de la aldosterona, evaluada mediante la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sin inducir una elevación del nivel sérico de  $\text{K}^+$ , hipercalcemia. Esto es importante ya que la hipercalcemia constituye uno de los principales efectos adversos del uso de espironolactona. En esta tesis encontramos que la espironolactona disminuyó la expresión de las claudinas-4 y -8, lo que demostró que en la diabetes, el aumento en la expresión de ambas claudinas se regula por la aldosterona. Sin embargo, en el análisis de los ARNm de las claudinas-4 y -8, se encontró que la espironolactona disminuyó la expresión del ARNm en condiciones fisiológicas, lo que nos sugiere que la aldosterona regula la expresión de las claudinas en condiciones normales. Además se encontró que la diabetes aumentó la expresión, la localización en la UE y la fosforilación de la cinasa WNK4 mediada por SGK1. Se encontró que la diabetes indujo la interacción entre las claudinas-4 y -8 con WNK4 en la UE, esto indujo la fosforilación de ambas claudinas en residuos de treonina, lo que concuerda con lo encontrado previamente en donde la aldosterona promovió la fosforilación de la claudina-4 en residuos de treonina en células del túbulo distal [29]. También se exploró el mecanismo a través del cual la diabetes aumentó la expresión de WNK4 y se encontró que la diabetes aumenta el ARNm y la expresión de la proteína de WNK4, lo que se asoció con la disminución en su poliubiquitinación y su degradación posterior. Esto debido a que la diabetes disminuyó la expresión de la culina 3, la cual forma un complejo que junto con KLHL3 poliubiquitinan a WNK4 induciendo su degradación y de esta forma regulan la expresión de WNK4. En resumen, en la diabetes, la aldosterona promueve la formación del poro paracelular de  $\text{Cl}^-$  formado por las claudinas-4 y -8 en la nefrona distal. Lo que favorece la reabsorción paracelular de  $\text{Cl}^-$  y evita el flujo reverso de  $\text{Na}^+$  a través de esta vía. Estos hallazgos en conjunto indican que las claudinas participan de manera importante en el manejo renal de iones en condiciones no solo fisiológicas sino también patológicas como la diabetes.

## IX. Conclusión

La diabetes altera de manera diferencial la expresión de las proteínas de la unión estrecha a través de dos mecanismos principales: 1) el estrés oxidante inducido por la activación de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS en el glomérulo y el túbulo proximal y 2) la aldosterona a través de la vía SGK1/WNK4 en el túbulo distal. Se muestra un resumen de los mecanismos en el Esquema 19.



**Esquema 19. Resumen de los mecanismos a través de los cuales la diabetes altera de manera diferencial las proteínas de la unión estrecha a lo largo de la nefrona.** En los glomérulos, la diabetes disminuye la expresión de la claudina-5 lo que asocia con la presencia de proteinuria, en los túbulos proximales disminuye la expresión de la claudina-2 que se asocia con el aumento en la natriuresis y en los túbulos distales aumenta la expresión de las claudinas-4 y -8 lo que favorece el aumento de la reabsorción de  $\text{Cl}^-$  por la vía paracelular. El ARat preserva las claudinas-5 y -2 ya que disminuye el estrés oxidante y la espironolactona bloquea las acciones de la aldosterona sobre el aumento en la expresión de las claudinas-4 y -8.

## X. Referencias

1. Hou J, Rajagopal M, Yu AS (2013) Claudins and the kidney. *Annu Rev Physiol* 75: 479-501.
2. Vallon V (2011) The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1009-1022.
3. Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778: 729-756.
4. Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, et al. (2002) The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 62: 476-487.
5. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107: 1319-1327.
6. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391-401.
7. McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, et al. (2000) Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3387-3398.
8. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS (2004) Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 24: 8408-8417.
9. Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE (2003) Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 278: 17350-17359.
10. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM (2003) Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1078-1084.
11. Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, Yu AS (2007) Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F166-177.
12. Hou J, Paul DL, Goodenough DA (2005) Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 118: 5109-5118.
13. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153: 263-272.
14. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, et al. (2009) Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 122: 1507-1517.
15. Enck AH, Berger UV, Yu AS (2001) Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F966-974.
16. Li WY, Huey CL, Yu AS (2004) Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1063-1071.

17. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, et al. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969-4976.
18. Yu AS, Cheng MH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, et al. (2009) Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 133: 111-127.
19. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, et al. (2008) Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778: 631-645.
20. Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, et al. (2009) A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1566-1574.
21. Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, et al. (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13: 875-886.
22. Ohse T, Pippin JW, Vaughan MR, Brinkkoetter PT, Krofft RD, et al. (2008) Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol* 19: 1879-1890.
23. Inai T, Kobayashi J, Shibata Y (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78: 849-855.
24. Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, et al. (2011) Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res* 343: 637-648.
25. Zhao L, Yaoita E, Nameta M, Zhang Y, Cuellar LM, et al. (2008) Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1856-1862.
26. Hebert SC, Culpepper RM, Andreoli TE (1981) NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol* 241: F412-431.
27. Guyton AC (1991) Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816.
28. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556.
29. Le Moellic C, Boulkroun S, Gonzalez-Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, et al. (2005) Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1513-1521.
30. Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S (2010) Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18010-18015.
31. Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, et al. (2006) Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F1288-1299.
32. Alexandre MD, Jeansonne BG, Renegar RH, Tatum R, Chen YH (2007) The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl<sup>-</sup> permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 87-91.
33. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, et al. (2008) Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 118: 619-628.



34. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C142-147.
35. Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA (2006) Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem* 281: 36117-36123.
36. Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, Rosenthal R, Fromm A, et al. (2012) Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci* 69: 2765-2778.
37. Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, et al. (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 1798: 2048-2057.
38. Sas D, Hu M, Moe OW, Baum M (2008) Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1713-1719.
39. Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, et al. (2003) Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12: 2049-2061.
40. Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ, Carson JL, Gambling TM, et al. (2007) Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1106-1113.
41. Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S (2011) A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol* 6: 395-423.
42. Forbes JM, Cooper ME (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137-188.
43. Mora-Fernandez C, Dominguez-Pimentel V, de Fuentes MM, Gorriz JL, Martinez-Castelao A, et al. (2014) Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J Physiol* 592: 3997-4012.
44. Rerup CC (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22: 485-518.
45. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, et al. (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 201-205.
46. Orfanos CE, Ehlert R, Gollnick H (1987) The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 34: 459-503.
47. Niederreither K, Dolle P (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9: 541-553.
48. Mongan NP, Gudas LJ (2007) Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 75: 853-870.
49. Xu Q, Lucio-Cazana J, Kitamura M, Ruan X, Fine LG, et al. (2004) Retinoids in nephrology: promises and pitfalls. *Kidney Int* 66: 2119-2131.
50. Gronemeyer H, Miturski R (2001) Molecular mechanisms of retinoid action. *Cell Mol Biol Lett* 6: 3-52.
51. Evans TR, Kaye SB (1999) Retinoids: present role and future potential. *Br J Cancer* 80: 1-8.

52. Merlet-Benichou C, Vilar J, Lelievre-Pegorier M, Gilbert T (1999) Role of retinoids in renal development: pathophysiological implication. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8: 39-43.
53. Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J (1999) Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development* 126: 1139-1148.
54. Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, et al. (2001) Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* 27: 74-78.
55. Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21: 444-448.
56. Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dolle P (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127: 75-85.
57. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2009) Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 7: e002.
58. Clagett-Dame M, Knutson D (2011) Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* 3: 385-428.
59. Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV (2000) Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127: 3057-3067.
60. LaMantia AS, Bhasin N, Rhodes K, Heemskerk J (2000) Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. *Neuron* 28: 411-425.
61. Plateroti M, Freund JN, Leberquier C, Keding M (1997) Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. *J Cell Sci* 110 ( Pt 10): 1227-1238.
62. Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Wang J, Fernandez-Mejia C (1999) Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. *Endocrinology* 140: 3091-3096.
63. Chertow BS, Blaner WS, Baranetsky NG, Sivitz WI, Cordle MB, et al. (1987) Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. *J Clin Invest* 79: 163-169.
64. Basu TK, Basualdo C (1997) Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutrition* 13: 804-806.
65. Figueroa DJ, Hess JF, Ky B, Brown SD, Sandig V, et al. (2000) Expression of the type I diabetes-associated gene LRP5 in macrophages, vitamin A system cells, and the Islets of Langerhans suggests multiple potential roles in diabetes. *J Histochem Cytochem* 48: 1357-1368.
66. Starkey JM, Zhao Y, Sadygov RG, Haidacher SJ, Lejeune WS, et al. (2010) Altered retinoic acid metabolism in diabetic mouse kidney identified by O isotopic labeling and 2D mass spectrometry. *PLoS One* 5: e11095.
67. Tuitoek PJ, Ritter SJ, Smith JE, Basu TK (1996) Streptozotocin-induced diabetes lowers retinol-binding protein and transthyretin concentrations in rats. *Br J Nutr* 76: 891-897.

68. Nishimura C, Kuriyama K (1985) Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats: effect of vitamin A administration. *Jpn J Pharmacol* 37: 365-372.
69. Rong J, Liu S (2011) Effect of all-trans retinoic acid on the barrier function in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407: 605-609.
70. Bonvalet JP (1998) Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl* 65: S49-56.
71. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437.
72. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA (1999) Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-23.
73. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, Hur GM, Sung JY, et al. (1999) Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int* 47: 251-254.
74. Hollenberg NK, Stevanovic R, Agarwal A, Lansang MC, Price DA, et al. (2004) Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. *Kidney Int* 65: 1435-1439.
75. Siragy HM, Awad A, Abadir P, Webb R (2003) The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor-alpha in diabetic rats. *Endocrinology* 144: 2229-2233.
76. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, et al. (2003) Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 63: 1791-1800.
77. Gilbert KC, Brown NJ (2010) Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17: 199-204.
78. Matavelli LC, Siragy HM (2013) Reduction of aldosterone production improves renal oxidative stress and fibrosis in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 61: 17-22.
79. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, et al. (2004) Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 66: 1493-1502.
80. Taira M, Toba H, Murakami M, Iga I, Serizawa R, et al. (2008) Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 589: 264-271.
81. Zhou Q, Liu K, Wu H, Chen L, Pouranan V, et al. (2012) Spironolactone rescues Dot1a-Af9-mediated repression of endothelin-1 and improves kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 7: e47360.
82. Zhu D, Yu H, He H, Ding J, Tang J, et al. (2013) Spironolactone inhibits apoptosis in rat mesangial cells under hyperglycaemic conditions via the Wnt signalling pathway. *Mol Cell Biochem* 380: 185-193.

83. Toyonaga J, Tsuruya K, Ikeda H, Noguchi H, Yotsueda H, et al. (2011) Spironolactone inhibits hyperglycemia-induced podocyte injury by attenuating ROS production. *Nephrol Dial Transplant* 26: 2475-2484.
84. Hofni A, El-Moselhy MA, Taye A, Khalifa MM (2014) Combination therapy with spironolactone and candesartan protects against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 744: 173-182.
85. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, et al. (2004) Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4690-4694.
86. Kahle KT, Macgregor GG, Wilson FH, Van Hoek AN, Brown D, et al. (2004) Paracellular Cl<sup>-</sup> permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14877-14882.
87. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, et al. (2009) Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 45-50.
88. Arreola-Mendoza L, Reyes JL, Melendez E, Martin D, Namorado MC, et al. (2006) Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* 218: 237-246.
89. Bautista-Garcia P, Reyes JL, Martin D, Namorado MC, Chavez-Munguia B, et al. (2013) Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F77-87.
90. Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, et al. (2009) The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol Lett* 191: 279-288.
91. Molina-Jijon E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barron ZL, et al. (2011) Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51: 1543-1557.
92. Molina-Jijon E, Rodriguez-Munoz R, Namorado Mdel C, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL (2014) Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 72: 162-175.
93. Ismail OZ, Zhang X, Wei J, Haig A, Denker BM, et al. (2015) Kidney Injury Molecule-1 Protects against Galpha12 Activation and Tissue Damage in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Pathol* 185: 1207-1215.
94. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, et al. (2005) NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1144-1152.
95. Mount PF, Power DA (2006) Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 433-446.
96. Forstermann U, Munzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708-1714.
97. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, et al. (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14: S227-232.

98. Prozialeck WC, Niewenhuis RJ (1991) Cadmium (Cd<sup>2+</sup>) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 107: 81-97.
99. Jacquillet G, Barbier O, Cougnon M, Tauc M, Namorado MC, et al. (2006) Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F127-137.
100. Reyes JL, Molina-Jijon E, Rodriguez-Munoz R, Bautista-Garcia P, Debray-Garcia Y, et al. (2013) Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *Biomed Res Int* 2013: 730789.
101. Meyer TN, Schwesinger C, Ye J, Denker BM, Nigam SK (2001) Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 276: 22048-22055.
102. Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002) Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 109: 817-826.
103. Ha H, Lee HB (2005) Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton)* 10 Suppl: S7-10.
104. Lash LH (2009) Renal glutathione transport: Identification of carriers, physiological functions, and controversies. *Biofactors* 35: 500-508.
105. Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1: S128-138.
106. Deng B, Xie S, Wang J, Xia Z, Nie R (2012) Inhibition of protein kinase C beta(2) prevents tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and oxidative stress in endothelial cells: the role of NADPH oxidase subunits. *J Vasc Res* 49: 144-159.
107. Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM (2012) SUMOylation of claudin-2. *Ann N Y Acad Sci* 1258: 60-64.
108. Muzzarelli S, Maeder MT, Toggweiler S, Rickli H, Nietlispach F, et al. (2012) Frequency and predictors of hyperkalemia in patients  $\geq 60$  years of age with heart failure undergoing intense medical therapy. *Am J Cardiol* 109: 693-698.
109. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, et al. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.
110. Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, et al. (2012) Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 482: 98-102.
111. Shibata S, Zhang J, Puthumana J, Stone KL, Lifton RP (2013) Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7838-7843.
112. Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, et al. (1999) Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2514-2519.
113. Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, et al. (2007) An SGK1 site in WNK4 regulates Na<sup>+</sup> channel and K<sup>+</sup> channel activity and has implications for

- aldosterone signaling and K<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4025-4029.
114. Vallon V, Thomson SC (2012) Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol* 74: 351-375.
  115. Sima CA, Koeners MP, Joles JA, Braam B, Magil AB, et al. (2012) Increased susceptibility to hypertensive renal disease in streptozotocin-treated diabetic rats is not modulated by salt intake. *Diabetologia* 55: 2246-2255.
  116. Melo Z, de los Heros P, Cruz-Rangel S, Vazquez N, Bobadilla NA, et al. (2013) N-terminal serine dephosphorylation is required for KCC3 cotransporter full activation by cell swelling. *J Biol Chem* 288: 31468-31476.
  117. Arikawe AP, Udenze IC, Akinwolere MF, Ogunsola AO, Oghoghlosu RT (2012) Effects of streptozotocin, fructose and sucrose-induced insulin resistance on plasma and urinary electrolytes in male Sprague-Dawley rats. *Nig Q J Hosp Med* 22: 224-230.
  118. Wong YF, Kopp JB, Roberts C, Scambler PJ, Abe Y, et al. (2011) Endogenous retinoic acid activity in principal cells and intercalated cells of mouse collecting duct system. *PLoS One* 6: e16770.
  119. Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, et al. (1998) Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem* 8: 261-277.

## **XI. Publicaciones derivadas de la presente tesis**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

Original Contribution

## Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy

Eduardo Molina-Jijón<sup>a</sup>, Rafael Rodríguez-Muñoz<sup>a</sup>, María del Carmen Namorado<sup>a</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>, José L. Reyes<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Physiology, Biophysics, and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, México, DF 07360, Mexico<sup>b</sup> Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, 04510 University City, DF, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 October 2013

Received in revised form

13 March 2014

Accepted 29 March 2014

Available online 12 April 2014

## Keywords:

Renal tight junctions

Oxidative stress

Claudins

Protein tyrosine nitration

Glucose transporters

Free radicals

## ABSTRACT

Renal complications in diabetes are severe and may lead to renal insufficiency. Early alterations in tight junction (TJ) proteins in diabetic nephropathy (DN) have not been explored and the role of oxidative stress in their disassembly has been poorly characterized. We investigated the expression and distribution of TJ proteins: claudin-5 in glomeruli (GL), occludin and claudin-2 in proximal tubules (PTs), and ZO-1 and claudin-1, -4, and -8 in distal tubules (DTs) of rats 21 days after streptozotocin injection. Redox status along the nephron segments was evaluated. Diabetes increased kidney injury molecule-1 expression. Expression of sodium glucose cotransporters (SGLT1 and SGLT2) and facilitative glucose transporter (GLUT2) was induced. Increased oxidative stress was present in GL and PTs and to a lesser extent in DTs (measured by superoxide production and PKC $\beta$ 2 expression), owing to NADPH oxidase activation and uncoupling of the endothelial nitric oxide synthase-dependent pathway. Claudin-5, occludin, and claudin-2 expression was decreased, whereas claudin-4 and -8 expression increased. ZO-1 was redistributed from membrane to cytosol. Increased nitration of tyrosine residues in claudin-2 was found, which might contribute to decrement of this protein in proximal tubule. In contrast, occludin was not nitrated. We suggest that loss of claudin-2 is associated with increased natriuresis and that loss of glomerular claudin-5 might explain early presence of proteinuria. These findings suggest that oxidative stress is related to alterations in TJ proteins in the kidney that are relevant to the pathogenesis and progression of DN and for altered sodium regulation in diabetes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Diabetes courses with hyperglycemia and oxidative stress, which play a primary role in renal damage [1]. Diabetic nephropathy (DN) is the most common complication of this pathology and is considered the overall leading cause of end-stage renal disease (ESRD) [2,3]. DN presents major morphological and functional alterations, including hyperfiltration [4], proteinuria [5], and natriuresis [6]. Several factors are involved in the pathogenesis of DN, such as decreased nitric oxide (NO) production [7] and increased activity of protein kinase C (PKC) isoforms, leading to reactive oxygen species (ROS) overproduction [8,9].

Glomerular and tubular epithelial cells play critical roles in renal handling of organic and inorganic solutes and hence on extracellular fluid homeostasis [10]. Paracellular transport of solutes and water is regulated by the tight junctions (TJs). Several integral membrane proteins have been identified as components of TJ strands, among them occludin and claudins [11,12]. In kidney,

occludin is expressed along the nephron tubular segments [13,14]. Claudins are the major components in TJ strands and are expressed in all epithelia in a tissue-specific manner, modulating their permeability [15,16]. Claudins are responsible for the size- and charge-selective conductance properties of the paracellular pathway [10]. They have been classified as barrier or pore proteins depending on whether their expression increases or decreases epithelial ionic permeability measured as transepithelial electrical resistance. Zonula occludens (ZO-1 and ZO-2) proteins function to bind TJ fibrils to the cytoskeleton [17,18]. ZO-1 is essential for claudin polymerization into TJ strands [19].

The mammalian nephron displays a wide spectrum of claudins, whose distribution varies in each tubular segment; pore claudins are associated with leakier tubule segments, whereas barrier claudins are expressed in tighter distal segments. For example, claudin-2 is a pore claudin localized at the leaky proximal tubule (PT) [20]; it functions as a cation-selective paracellular pore [21] and mediates sodium and water transport in the PT [22]. Barrier claudins, such as claudin-1, -4, and -8, are expressed in the connecting tubule and collecting duct [21,23]. Claudin-5, the

\* Corresponding author. Fax: +55 5747 3754.

E-mail address: [jreyes@fisio.cinvestav.mx](mailto:jreyes@fisio.cinvestav.mx) (J.L. Reyes).

predominant isoform in endothelial cells, is a cation barrier-forming protein [24] and its expression in podocytes has also been described [25].

TJ structure and function are sensitive to oxidative stress damage induced by factors such as heavy metals [26–29] and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [30]. The impact of diabetes on TJs has been partially explored in both diabetic animals and epithelial cells cultured in the presence of high glucose concentrations. Under these conditions, altered localization and decreased content and phosphorylation of ZO-1 were observed in glomerular epithelial cells [31]. However, it is unknown whether early renal alterations occurring in diabetes might damage TJ structure in glomeruli (GL), PT, and distal tubules (DTs) or what its relationship with oxidative stress is. Therefore, in this study we explored the expression and distribution of renal TJ proteins: claudin-5 in GL, occludin and claudin-2 in PTs, and ZO-1 and claudin-1, -4, and -8 in DTs in diabetic rats and their association with the redox status along the nephron.

## Materials and methods

### Reagents and experimental design

The rabbit anti-claudins-1, -2, -4, -5, and -8; rabbit anti-ZO-1; rabbit anti-occludin; rabbit anti-peroxidase-conjugated, mouse anti-peroxidase-conjugated, rabbit anti-Alexa Fluor 488, goat anti-Alexa Fluor 488, mouse anti-Alexa Fluor 594 antibodies and recombinant protein G-agarose were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The rabbit anti-sodium glucose cotransporter (SGLT1), rabbit anti-facilitative glucose transporter (GLUT1), rabbit anti-GLUT2, and mouse anti-3-nitrotyrosine (3-NT) antibodies were purchased from Millipore Corp. (Billerica, MA, USA). The goat anti-SGLT2, rabbit anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS), rabbit anti-inducible NOS (iNOS), mouse anti-vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), mouse anti-aquaporin (AQP)-2, mouse anti- $\beta$ -dystroglycan, and peroxidase-conjugated anti-goat antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The rabbit anti-neuronal NOS (nNOS) antibody was purchased from BD Trans-Lab (San Jose, CA, USA). The mouse anti-dipeptidylpeptidase IV (DppIV) antibody was purchased from AbD Serotec (Raleigh, NC, USA). The mouse anti-desmoplakin (DMPK 1/2) antibody was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH, USA). The goat anti-kidney injury molecule (KIM-1) antibody was purchased from R&D Systems (McKinley Place, MN, USA). The mouse anti- $\alpha$ -tubulin and goat anti-malondialdehyde (MDA) antibodies were purchased from Abcam (Boston, MA, USA). The rabbit anti-PKC $\beta$ 2 antibody, Percoll, streptozotocin (STZ), 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), glutathione reduced form (GSH), glutathione oxidized form, tetramethoxypropane, streptomycin sulfate, 1-methyl-2-phenylindole, butylated hydroxytoluene (BHT), lucigenin, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) reduced form, L-arginine, xanthine, succinate, diphenyleiodonium chloride (DPI), and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Monochlorobimane was obtained from Fluka (Schnell-dorf, Germany). Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Animal experiments were performed in accordance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999, and Institutional Animal Care Committee (UPEAL) guidelines (approved protocol for this study No. 491). Female Wistar rats weighing 200 to 250 g were housed with 12/12-h light/dark cycles at 22  $\pm$  1 °C and 50  $\pm$  5% humidity. Animals received water and food ad libitum. Type 1 diabetes was induced by a single tail vein injection of STZ

(60 mg/kg body wt) diluted in citrate buffer, pH 6.0. Nondiabetic control rats were injected with an equal volume of citrate buffer. After 3 days, the induction of diabetes was confirmed by measuring blood glucose concentration with a OneTouch Ultra blood glucose meter (Milpitas, CA, USA).

### Biochemical and physiological parameters

Blood glucose and water and food intake were monitored every 7 days throughout the study. To measure water and food intake, rats were allocated in individual metabolic cages and had free access to 500 ml of purified water and 100 g of standard rat chow (PMI, 5008, Purina, Alief City, TX, USA), and 24 h after, the remaining water and food were measured to determine the amount ingested.

Mean arterial blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography (at day 20 after STZ injection). Rats were individually housed in metabolic cages 24 h before sacrifice. Urine samples were collected and volumes were measured. Blood was collected by cardiac puncture under anesthesia with sodium pentobarbital (30 mg/kg, ip) and serum was separated. Urinary protein-to-creatinine ratios were assessed as an index of kidney injury. Total protein was measured by the Lowry method (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Urine and plasma creatinine was measured by the modified Jaffé reaction as previously described [32]. The urinary protein-to-creatinine ratio was obtained by dividing the urine protein concentration by the urine creatinine concentration, both expressed in mg/dl. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated by creatinine clearance by using the standard equation [32]. Proximal tubular function was estimated by measurement of fractional excretions of glucose (FE<sub>GLU</sub>), of sodium (FE<sub>Na+</sub>), and of potassium (FE<sub>K+</sub>). Urinary and serum sodium and potassium concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (PerkinElmer 3100 with an air-acetylene flame; Norwalk, CT, USA) as previously described [32]. Sodium, potassium, and glucose fractional excretions were calculated according to the following equation [32]:

$$\text{fractional excretion(compound } z) (\%) = (\text{compound } z \text{ clearance/creatinine clearance}) \times 100,$$

where compound *z* is sodium, potassium, or glucose. Urinary glucose was estimated with a commercial kit by the hexokinase method (Randox Laboratories, San Diego, CA, USA). Urinary nitrate and nitrite excretion was measured by the nitric oxide colorimetric assay kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA).

### Renal tissues

Kidneys from control and diabetic groups were perfused with isotonic saline solution (NaCl 0.9%), excised, weighed, and placed on ice-cold saline solution. Renal mass of both kidneys was recorded. Kidneys were decapsulated, and the cortex was removed.

### Isolation of GL, PT, and DT

GL were isolated as previously described [33]. Briefly, capsules were removed by macroscopic dissection and the kidney cortex was separated from the medulla and minced on a glass dish. The homogenized tissue was pushed through a stainless sieve with a pore size of 117  $\mu$ m (Cat. No. 8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) applying gentle pressure with the bottom of a glass flask. The sieve was rinsed several times with potassium phosphate-buffered solution (PBS). The sieved tissue containing a preparation enriched in glomeruli was transferred to a second sieve with a pore opening of 74  $\mu$ m (Cat. No. 8321A58; Thomas



Scientific). After several washes with cold PBS, the material that remained on top of the sieve, which contained the glomeruli, was collected in ice-cold PBS and centrifuged for 10 min at 20,000 g. The supernatant was decanted and the pellet containing the glomeruli was resuspended in PBS.

Renal tubules were isolated by Percoll gradients as previously described [14]. Briefly, renal cortex from three rats was placed in 15 ml of ice-cold Krebs–bicarbonate solution (KB; mM): 110 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 0.7 MgSO<sub>4</sub>, 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 sodium acetate, 5.5 glucose, 5 alanine, and 0.5 g/L bovine albumin, pH 7.4, osmolarity 290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. The cortex was washed three times and resuspended in 10 ml of KB containing 15 mg of collagenase (from *Clostridium histolyticum*, type II; Sigma–Aldrich) and 0.5 ml of 10% bovine serum albumin. Samples were gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath for 20 min at 37 °C. After digestion, approximately 20 ml of ice-cold KB with a protease inhibitor cocktail (Complete 1 ×; Boehringer Mannheim, Germany) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 20 g/ml) was added, and the suspension was gently agitated to disperse tissue fragments. The suspension was filtered to remove collagen fibers, and the tissue suspension was gently centrifuged (18 g/30 s). The pellet was resuspended in 10 ml of ice-cold KB with the protease inhibitor cocktail. This washing procedure was repeated three times. The tissue pellet was then resuspended in bovine serum albumin (5%) with protease inhibitors for 5 min, at 4 °C, and centrifuged for 1 min, and the supernatant was discarded. Tissue pellets were suspended in 30 ml of a freshly prepared mixture of ice-cold Percoll and KB (1:1, v/v). Thereafter, the suspension was centrifuged (1071 g/30 min), resulting in separation of four bands. The first was enriched with distal tubules and the second with glomeruli, and the third contained a mixture of isolated tubular segments. The fourth (deepest) was significantly enriched in proximal tubules. Band content was confirmed by light microscopy observation.

#### Extraction of total, soluble, and insoluble fractions of proteins

For total protein extraction, renal cortex from three rats was placed in 15 ml of ice-cold KB, washed three times, and resuspended in 10 ml of KB containing 15 mg of type II collagenase. Samples were gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath for 20 min at 37 °C. After digestion, approximately 30 ml of ice-cold KB with the protease inhibitor cocktail Complete 1 × and PMSF (20 g/ml) was added, and the suspension was gently agitated to disperse the tissue fragments. The suspension was filtered to remove collagen fibers, and the tissue suspension was gently centrifuged (18 g/30 s). The pellet was resuspended in 30 ml of ice-cold KB containing protease inhibitor cocktail. This washing procedure was repeated three times. Tissue pellets were suspended and incubated for 30 min at 4 °C in 500 μl of lysis buffer (RIPA; mM): 40 Tris–HCl, pH 7.6, 150 NaCl, 2 EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Thereafter, samples were sonicated three times for 30 s each in a high-intensity ultrasonic processor (Vibra Cell; Sonics & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) and centrifuged at 20,000 g, at 4 °C, for 40 min, and supernatants were collected.

Soluble (cytosolic) and insoluble (membranous) fractions of proteins were obtained as previously described [14]. Briefly, the method was as mentioned above until the type II collagenase washing procedure. Thereafter, the pellet was resuspended in MBL buffer (mM): 50 Tris–HCl, pH 7.4, 100 NaCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, and 1% Nonidet P-40 with complete protease inhibitor cocktail and PMSF (20 μg/ml). The samples were centrifuged at 20,000 g, at 4 °C for 10 min, and the supernatant was collected (soluble fraction). The pellet (insoluble fraction) was further lysed with RIPA buffer for 30 min at 4 °C and sonicated three times for 30 s each in a high-intensity ultrasonic processor,

centrifuged at 20,000 g, at 4 °C for 10 min, and the supernatant was collected (insoluble fraction). Total protein quantification of insoluble or soluble fractions was performed using the Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

#### Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described [28]. Briefly, samples were denatured by boiling for 12 min and then diluted 1:5 in 5 × Laemmli buffer with urea (5 M). Proteins were loaded on 12% SDS–PAGE gels. Molecular weight standards (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) were run in parallel. Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Nonspecific protein binding was blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in 1 × PBS containing 0.4% Tween 20, for 1 h, at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies against claudin-1, -2, -4, -5, and -8; ZO-1; SGLT1, SGLT2; GLUT1, GLUT2; occludin; α-tubulin; PKCβ2; eNOS, iNOS, nNOS; KIM-1; AQP-2; MDA; and 3-NT (dilution 1:1000). Thereafter, membranes were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat (dilution 1:10,000) for 1 h, and after being washed, immunoblots were developed using the ECL Prime Western blotting detection reagent (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Chemiluminescence was detected in an EC3 imaging system (UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, UK). Protein band density was quantified by transmittance densitometry (UVP Bioluminescence Systems software).

#### Assay of eNOS dimer/monomer

SDS-resistant eNOS dimers and monomers were assayed by using low-temperature SDS–PAGE as described previously [34]. Briefly, total proteins from renal cortex homogenates were mixed with loading buffer and loaded on gels without boiling. Proteins were separated with low-temperature SDS–PAGE under reducing conditions (with β-mercaptoethanol). Gels and buffers were kept at 4 °C during the whole procedure.

#### Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of claudin-2 and occludin was performed in the membranous fraction of isolated PTs with anti-claudin-2 (10 μg of mouse anti-claudin-2; Invitrogen) and occludin (10 μg of rabbit anti-occludin; Invitrogen) as previously described [35]. Briefly, proximal tubule extracts from membranous fractions (1 mg) were precleared with 20 μl of recombinant protein G–agarose beads overnight at 4 °C. The beads were removed by centrifugation at 16,000 g for 5 min, and precleared extracts were incubated overnight at 4 °C with 2.5 mg of the immunoprecipitating antibody previously bound with the protein G–agarose.

As negative control, parallel incubations with irrelevant antibodies (polyclonal anti-β-dystroglycan for claudin-2 and polyclonal anti-VE-cadherin for occludin nonspecific precipitations) were performed. The immune complexes were collected by centrifugation at 16,000 g for 5 min and washed three times for 10 min with 1 ml of RIPA buffer and then eluted by boiling in 300 μl of RIPA buffer. Immunoprecipitated proteins were then analyzed by immunoblotting as described above.

#### Immunofluorescence

Kidney samples were prepared for immunofluorescence as previously described [28]. Briefly, cubes of 0.5 cm/side were cut and immediately immersed for 2 min in 2-methylbutane

(Aldrich M3, 263–1; Milwaukee, WI, USA), which was previously cooled in liquid nitrogen. The cubes were then transferred for 10 min to liquid nitrogen. Next, 6- $\mu$ m sections were cut in a Leica CM 1510 cryostat (Wetzlar, Germany) and mounted on gelatin-coated slides that were then kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . For the immunofluorescence experiments, the sections were fixed for 10 min with methanol and subsequently incubated for 5 min at room temperature in 1% (vol/vol) Triton X-100. Then, the tissue sections were washed three times with PBS, blocked for 1 h at room temperature with 1% (wt/vol) IgG-free albumin (1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, USA), and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with one of the following primary polyclonal antibodies: anti-claudin-1, -2, -4, -5, or -8, ZO-1, SGLT1, SGLT2, GLUT1, GLUT2, VE-cadherin, KIM-1, AQP-2, MDA, or occludin (dilution 1:100); DppD (dilution 1:300); or DMPK 1/2 (1:50). GL were double-labeled for claudin-5 and VE-cadherin (dilution 1:100). To differentiate between PTs and DTs, double labeling was performed using anti-DppD, to label the brush border of PTs, and anti-DMPK antibodies to label DTs. Secondary antibodies Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488 donkey anti-goat, and Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse (dilution 1:300) were used. Immunofluorescence was evaluated using a confocal inverted microscope (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Germany). Immunofluorescence experiments were performed at least three times in samples from three animals per group. Nonspecific labeling was assessed by exclusion of the primary antibodies.

#### Oxidative stress markers

ROS production, lipid peroxidation, protein carbonylation, and GSH content were measured in homogenates from renal cortex, as previously described [36]. Briefly, renal cortex was dissected out and homogenized in a Polytron (Model PT 2000; Brinkmann, Westbury, NY, USA) for 10 s in cold PBS (50 mM) containing 0.1% Triton X-100, pH 7.0, BHT (0.5 M), leupeptin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), pepstatin (7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and aprotinin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The homogenates were centrifuged at 19,000 g and  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min and the supernatant was separated out to measure total protein by the Lowry method and oxidative stress markers.

ROS formation was estimated according to previous reports [37]. Briefly, aliquots of 1.5 ml of renal cortex homogenates (50 mg) were incubated with 0.5 ml of 5  $\mu\text{M}$  DCFH-DA at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Fluorescence signals were recorded at the end of the incubation at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm using a Synergy HT multimode microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). A standard curve was obtained using increasing concentrations of DCF incubated in parallel. Results are expressed as fluorescence arbitrary units (FAU)/mg of protein.

Lipid peroxidation was assessed by MDA and 4-hydroxynonenal (4-HNE) using a standard curve of tetramethoxypropane as previously described [36]. A solution of 1-methyl-2-phenylindole in a mixture of acetonitrile:methanol (3:1) was added to the samples and the reaction was started by adding 37% HCl. Optical density was measured at 586 nm after 1 h of incubation at  $45^{\circ}\text{C}$ . Data are expressed as nmol MDA + 4-HNE/mg protein.

For protein carbonyl content the kidney samples were incubated overnight with streptomycin sulfate to remove nucleic acids. Later, homogenates were treated with dinitrophenylhydrazine (DNPH) and HCl and finally with guanidine hydrochloride. Assessment of carbonyl formation was obtained on the basis of formation of protein hydrazone by reaction with DNPH. The absorbance was measured at 370 nm. Protein carbonyl content is expressed as nmol/mg protein [36].

GSH levels were measured using monochlorobimane as previously described [36]. The fluorescence was measured at

excitation and emission wavelengths 385 and 478 nm, respectively, using a Synergy HT multimode microplate reader. GSH levels are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein

Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) production was measured in freshly isolated GL, PTs, and DTs, by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as described previously [38]. After being excited by the superoxide anion, lucigenin releases energy in the form of light. Lucigenin-amplified chemiluminescence is a specific method for studying the kinetics of the superoxide production of cells. Briefly, freshly isolated GL, PTs, and DTs, were homogenized in PBS buffer (500  $\mu\text{l}$ ) using a Dounce homogenizer (100 strokes on ice). Homogenates were subjected to a low-speed centrifugation at 800 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , for 10 min to remove the unbroken cells and debris, and aliquots were used immediately. To start the assay, 100- $\mu\text{l}$  amounts of homogenates were added to 900  $\mu\text{l}$  of 50 mM PBS, pH 7.0, containing 1 mM EGTA, 150 mM sucrose, 5  $\mu\text{M}$  lucigenin, and the corresponding substrates or inhibitors (mM): 0.1 NADH, 1 L-arginine, 0.1 xanthine, 5 succinate, 0.1 DPI, or 1 L-NAME. Photon emission in terms of relative light units was measured every 5 min for 30 min at excitation and emission wavelengths of 368 and 505 nm, respectively, by using a Synergy HT multimode microplate reader (Biotek Instruments). Protein content was measured using the Bio-Rad protein assay kit.

#### Data analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between means from two groups were evaluated by the Student *t* test. Analysis of variance was used for multiple comparisons among groups. The Bonferroni post hoc test was performed.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Diabetes induced proteinuria and increased natriuresis and $\text{FE}_{\text{Na}^+}$

Our first aim was to determine the physiological and biochemical characteristics of the rats 21 days after STZ injection. Diabetic rats exhibited decreased body weight and increased blood glucose, water intake, food intake, and urinary output. Also, diabetic rats showed increased urinary glucose,  $\text{FE}_{\text{Glu}}$ , and glucose clearance. No changes in mean arterial blood pressure in either group were found (Table 1). In the renal function parameters evaluated (Table 2), diabetic rats showed increased proteinuria, natriuresis, and  $\text{FE}_{\text{Na}^+}$ . It is noteworthy that filtered load of sodium did not change; this finding strongly suggests tubular alterations in  $\text{Na}^+$  reabsorption, which would explain the increased natriuresis observed in the diabetic group. No alterations were found in

**Table 1**  
Physiological and biochemical parameters of control and diabetic rats.

Parameter	Control rats	Diabetic rats
Body weight (g)	267 $\pm$ 9.4	206 $\pm$ 5.9*
Water intake (ml/rat/day)	65.8 $\pm$ 8.8	225.4 $\pm$ 11.3*
Food intake (g/rat/day)	24.2 $\pm$ 1.3	44.2 $\pm$ 2.1*
Urinary output (ml/rat/day)	21 $\pm$ 3.3	46 $\pm$ 4.2*
Blood glucose (mg/dl)	90 $\pm$ 3.6	431 $\pm$ 43.4**
Urinary glucose (mg/day)	0.5 $\pm$ 0.1	119.2 $\pm$ 8.2**
$\text{C}_{\text{Glu}}$ ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	1.5 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.3*
$\text{FE}_{\text{Glu}}$ (%)	0.4 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.3*
Mean arterial pressure (mm Hg)	106 $\pm$ 2.6	119 $\pm$ 4.7

$\text{C}_{\text{Glu}}$ , glucose clearance;  $\text{FE}_{\text{Glu}}$ , fractional excretion of glucose. Values are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ).

\*  $p < 0.05$  vs control.

\*\*  $p < 0.001$  vs control.

**Table 2**  
Renal function parameters and Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> handling of control and diabetic rats.

Parameter	Control rats	Diabetic rats
Serum creatinine (mg/dl)	1.23 ± 0.06	1.41 ± 0.15
C <sub>cr</sub> (ml/min)	1.1 ± 0.07	0.9 ± 0.12
Urinary protein/creatinine	0.53 ± 0.03	1.12 ± 0.11*
U <sub>Na+</sub> V (mEq/day)	11.8 ± 1.83	26.5 ± 3.01*
FL <sub>Na+</sub>	70.9 ± 4.19	78.7 ± 9.62
FE <sub>Na+</sub> (%)	0.4 ± 0.03	0.8 ± 0.05*
U <sub>K+</sub> V (mEq/day)	43.5 ± 5.02	49.5 ± 7.11
FL <sub>K+</sub>	2.7 ± 0.12	2.9 ± 0.28
FE <sub>K+</sub> (%)	33 ± 2.5	38 ± 4.1

C<sub>cr</sub>, creatinine clearance; U<sub>Na+</sub>V, urinary sodium excretion; FL, filtered load; FE, fractional excretion; U<sub>K+</sub>V, urinary potassium excretion. Values are presented as means ± SEM (n = 8–10).

\* p < 0.05 vs control.

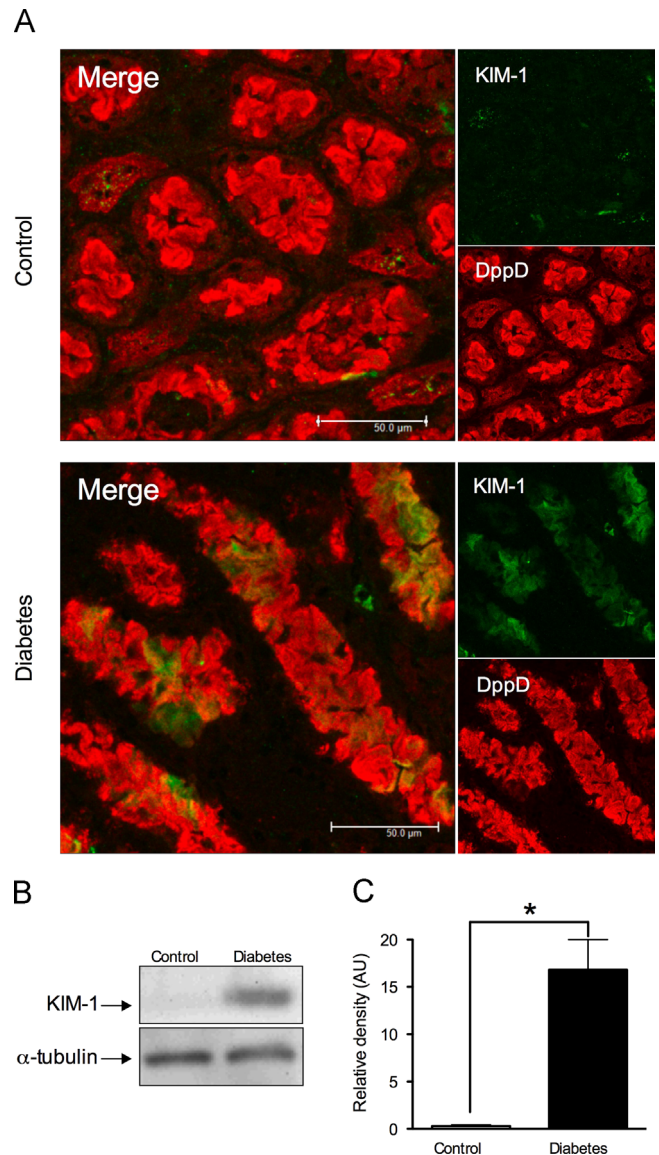
serum creatinine, creatinine clearance, urinary K<sup>+</sup> excretion, filtered load of potassium, or FE<sub>K+</sub>. These findings suggest that 21 days after STZ injection, proteinuria and natriuresis are seen as early alterations in the diabetic kidney, as has been previously reported [5,6].

#### Diabetes induced the expression of KIM-1

KIM-1, a type 1 membrane protein, is expressed at negligible levels in normal kidney tissue, but it is massively induced in proximal tubule epithelial cells in proteinuric, toxic, and ischemic kidney diseases [39,40]. To explore initial tubular injury, the expression of KIM-1, an early and sensitive marker of renal damage, was assessed by confocal microscopy (Fig. 1A) and Western blot (Fig. 1B and C) in kidneys from control and diabetic rats. As shown, KIM-1 is expressed at negligible levels in normal kidney tissue in the proximal tubule. In contrast, it is markedly induced (15-fold increase) under diabetic conditions (Fig. 1A–C). The KIM-1 label colocalized with DppD (red label), thus indicating proximal tubular injury.

#### Diabetes increased SGLT1, SGLT2, and GLUT2 and decreased GLUT1 expression in the PT

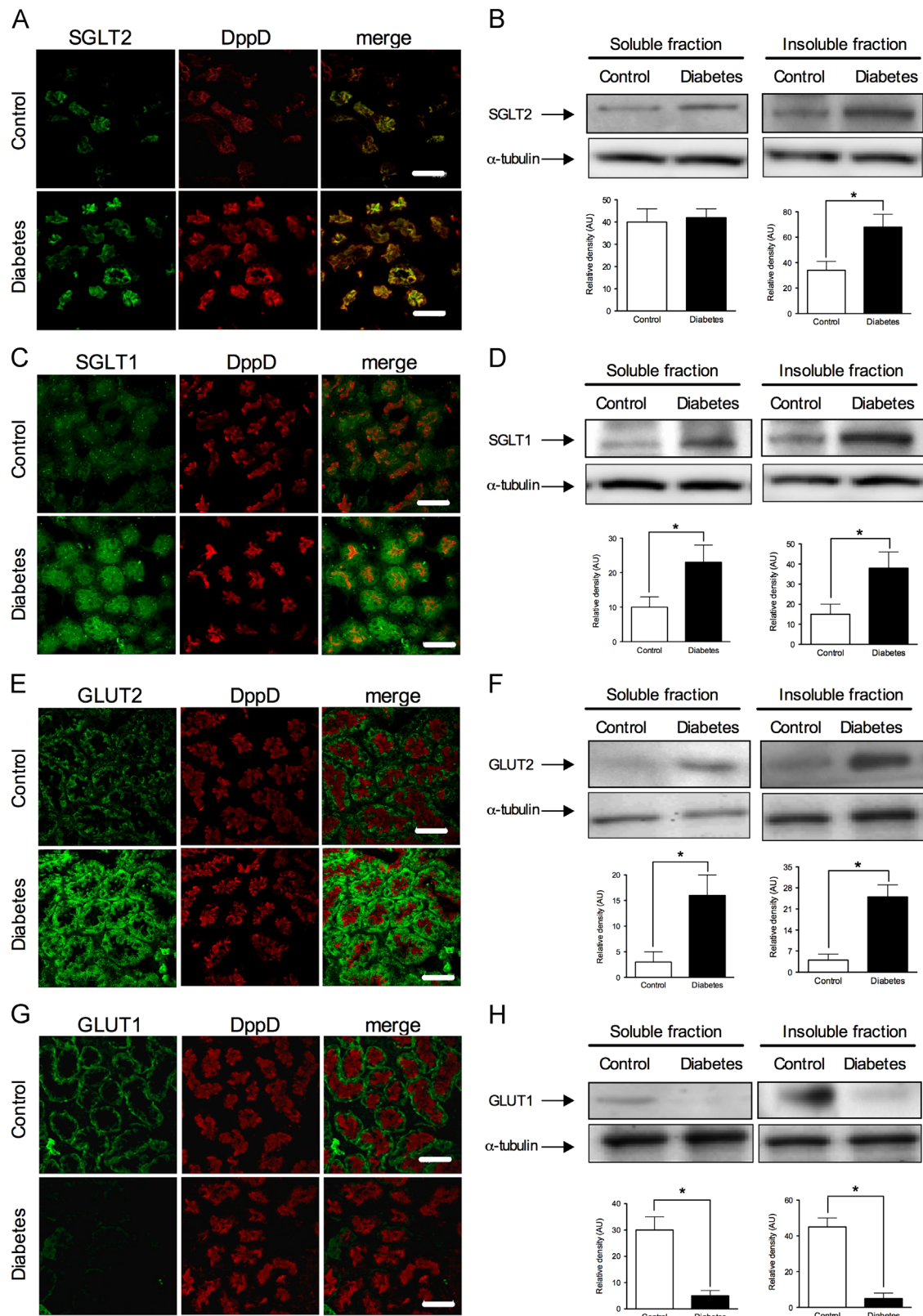
Renal glucose reabsorption is carried out in PTs by SGLT1 and 2 and GLUT1 and 2 [41]. Glucose transporters SGLT1 and 2 and GLUT1 and 2 expression was analyzed because it has been reported that in diabetic nephropathy, hyperglycemia increases glucose transporter expression in the proximal tubular cells of the kidney, leading to high intracellular glucose levels, inducing an overproduction of ROS [42]. Our aim was to explore the initial alterations in glucose transporters and to associate these changes with oxidative stress. DppD-4 was used as a marker of the PT epithelial cells. Diabetes significantly increased the expression of SGLT2 (Fig. 2A), SGLT1 (Fig. 2C), and GLUT2 (Fig. 2E), detected by immunofluorescence. To confirm these results, a Western blot analysis of soluble (cytosolic) and insoluble (membranous) cell fractions of renal cortex homogenates was performed. In Fig. 2, an increased expression of SGLT2 in the insoluble fraction was observed but not in the soluble fraction (Fig. 2B); SGLT1 (Fig. 2D) and GLUT2 (Fig. 2F) increased in both soluble and insoluble fractions in diabetic rats, thus indicating increment of these transporters in the apical tubular membrane, which suggests an increment in the glucose absorptive mechanisms. In contrast, GLUT1 expression was decreased in the diabetic rats (Fig. 2G and H). Densitometric analyses of the Western blots are shown in Fig. 2B, D, F, and H, bottom, and are in agreement with the findings of confocal microscopy.



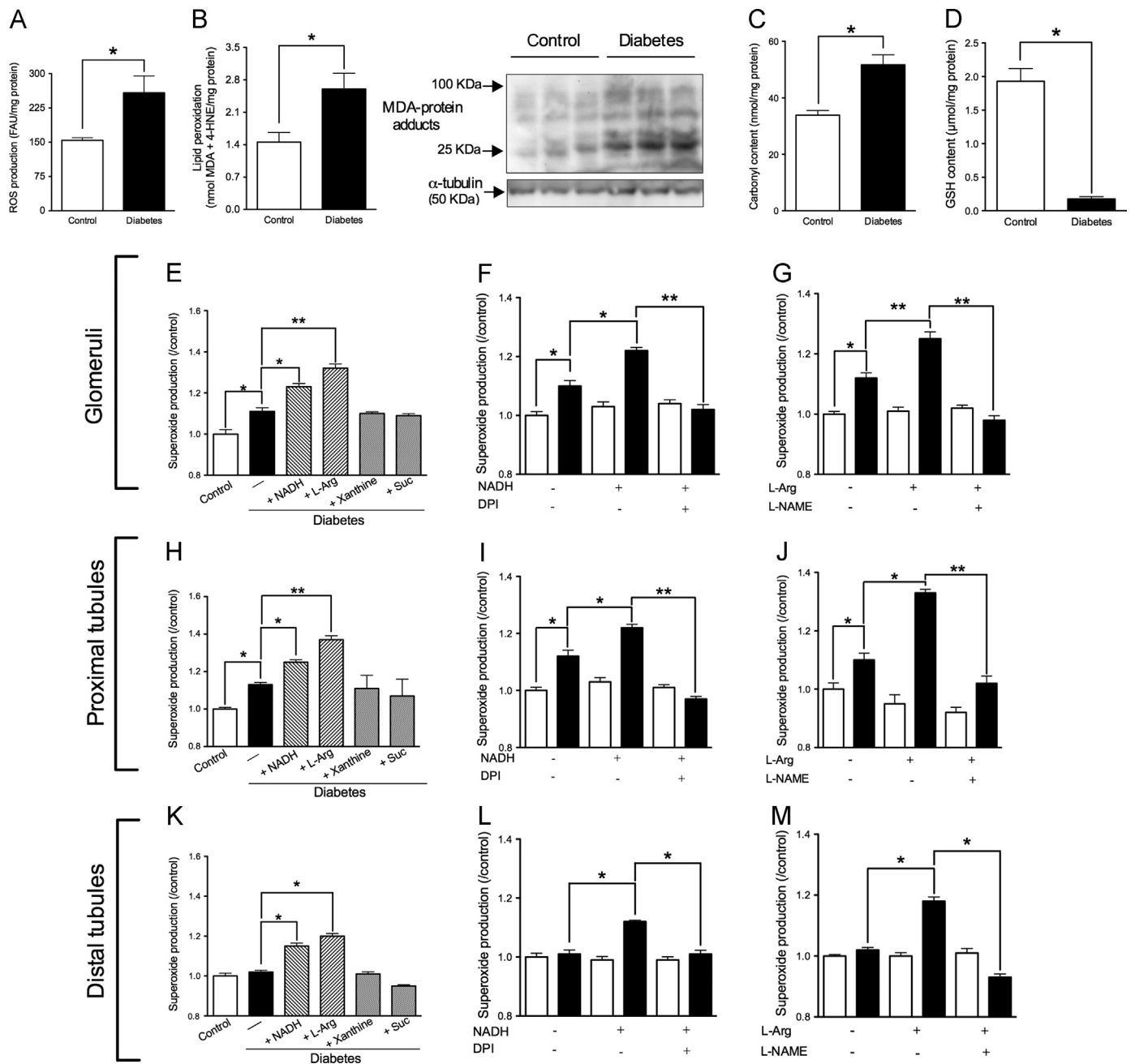
**Fig. 1.** Diabetes increases the expression of kidney injury molecule (KIM)-1 in proximal tubules. Twenty-one days after streptozotocin injection the expression (assessed by confocal microscopy and Western blot from renal cortex homogenates) of KIM-1 was studied. Diabetes significantly increased KIM-1 expression in apical membrane of proximal tubular cells, as shown by (A) immunofluorescence (green) and (B) Western blot. Dipeptidyl peptidase (DppD)-4 (red) was used as a marker of the proximal tubular cells. (C) Densitometric analysis of Western blot. Data for control and diabetic groups are expressed as relative density from four rats/group normalized to  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means ± SEM. \*p < 0.05. Scale bar, 50  $\mu$ m. AU, arbitrary units.

#### NADPH oxidase and uncoupled eNOS are major sources of oxidative stress in GL, PTs, and DTs of diabetic rats

The next set of experiments was performed to evaluate the redox state in diabetic kidneys. Diabetes increased ROS production (Fig. 3A), MDA and 4-HNE (markers of lipid peroxidation, Fig. 3B), and protein carbonyl content (Fig. 3C). MDA was also determined by Western blot (Fig. 3B) and immunofluorescence assay in both groups. Western blot analysis of MDA showed an increased amount of MDA–protein adducts under diabetic conditions, which was evident by increased bands between 25 and 100 kDa. Increased MDA label was found in the diabetic group (evaluated by immunofluorescence), which colocalizes with DppD, thus indicating an increased lipid peroxidation in the apical membrane of proximal tubular cells (Supplementary Fig. 1). In contrast, the



**Fig. 2.** Diabetes increases the expression and membrane localization of sodium glucose cotransporters (SGLT) 1 and 2 and facilitative glucose transporter 2 (GLUT2) and decreases GLUT1 expression in proximal tubules (PT). Twenty-one days after streptozotocin injection the localization (confocal microscopy) and expression (Western blot of soluble and insoluble fractions of renal cortex homogenates) of SGLT1, SGLT2, GLUT1, and GLUT2 were assessed. Diabetes increased (A) apical membrane localization (green) and (B) expression in insoluble membrane fraction of SGLT2. Diabetes also increased (C) apical membrane localization (green) and (D) expression in soluble and insoluble fractions of SGLT1 and (E) basal membrane localization (green) and (F) expression in soluble and insoluble fractions of GLUT2. In contrast, diabetes decreased (G) basal membrane localization (green) and (H) expression in soluble and insoluble fractions of GLUT1 compared with control (vehicle-treated) rats. Dipeptidyl peptidase (DppD)-4 (red) was used as a marker of the PT apical membrane. Densitometric analyses of Western blots are shown at the bottom of (B), (D), (F), and (H). Data for control (white bars) and diabetic (black bars) groups are expressed as relative density from four rats/group normalized to  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . Scale bar, 50  $\mu$ m. AU, arbitrary units.



**Fig. 3.** Diabetes increases oxidative stress and  $O_2^-$  production in GL, PTs, and DTs by a NADPH oxidase- and NOS-dependent mechanism. Oxidative stress was increased in diabetic rats 21 days after streptozotocin injection as depicted by (A) increased ROS production, (B) increased lipid peroxidation evaluated by colorimetric quantification of MDA and 4-HNE and by Western blot of MDA-protein adducts, (C) increased carbonyl content, and (D) diminution of reduced glutathione (GSH) content in renal cortex homogenates from control (white bars) and diabetic (black bars) rats.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control. Superoxide production was assessed by lucigenin-enhanced chemiluminescence assay in homogenates of isolated (E, F, and G) GL, (H, I, and J) PTs, and (K, L, and M) DTs. GL, PTs, and DTs isolated from control and diabetic rats were incubated in the presence of substrates of several enzymes that are sources of  $O_2^-$ : NADH for NADPH oxidase; L-Arg, L-arginine for NOS; xanthine for xanthine oxidase; Suc, succinate for mitochondrial complex II (E, H, and K). The effects of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) (F, I, and L) and NOS inhibitor *N*<sup>c</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (G, J, and M) on  $O_2^-$  production in control (white bars) and diabetic (black bars) rats were assessed. Chemiluminescence of diabetic relative to control rats without substrates is expressed as superoxide production (/control). Means  $\pm$  SEM from six to eight rats/group are shown. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$ . MDA, malondialdehyde; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; FAU, fluorescence arbitrary units.

control group showed a negligible mark (Supplementary Fig. 1). Diabetes diminished GSH content (Fig. 3D), indicating increased oxidative stress conditions. To explore segment-specific production of superoxide, GL, PTs, and DTs were isolated by Percoll gradients. Enrichment of nephron sections was validated, because claudin-5 (used as a marker of GL), Dppd (used as a marker of PT), and AQP-2 (used as a marker of DT) expression was found only in the respective nephron sections and was absent from the other fractions (Supplementary Fig. 2). To further study the mechanism

involved in oxidative stress increment, we analyzed the  $O_2^-$  production by using the lucigenin-enhanced chemiluminescence assay in freshly isolated GL, PTs, and DTs by using several substrates. NADH was used as substrate for NADPH oxidase activity, L-arginine was used as substrate for NOS activity, xanthine was used as substrate for xanthine oxidase activity, and succinate was used to evaluate intramitochondrial  $O_2^-$  production. As shown in Fig. 3E, H, and K, under basal conditions without addition of any substrate,  $O_2^-$  production was increased in diabetic GL and PTs but not in DTs compared to control, thus

suggesting that oxidative stress is produced mostly in GL and PTs and to a lesser extent in DTs. When NADH and L-arginine were added, an increased  $O_2^{\cdot-}$  production was found in GL, PT, and DT sections. No changes were found when xanthine and succinate were added, suggesting a minor role of xanthine oxidase and mitochondria at this stage of diabetes. To evaluate the specificity of  $O_2^{\cdot-}$  production, DPI and L-NAME were used as inhibitors of NADPH oxidase and NOS activities, respectively. A decreased  $O_2^{\cdot-}$  production was observed when DPI (Fig. 3F, I, and L) and L-NAME (Fig. 3G, J, and M) were added to homogenates from GL, PTs, and DTs of diabetic rats. Inhibition of diabetes-induced  $O_2^{\cdot-}$  generation by adding DPI or L-NAME suggests that NADPH oxidase and NOS are sources of  $O_2^{\cdot-}$  at this stage of diabetes. It is noteworthy that  $O_2^{\cdot-}$  production was not induced when the substrates and the corresponding inhibitors were added to homogenates isolated from control rats. These data suggest that NADH and L-arginine induced  $O_2^{\cdot-}$  production only under diabetic conditions and not under normal conditions. In conclusion, diabetes increased oxidative stress in NADPH oxidase- and NOS-dependent pathways in GL and PTs and to a lesser extent in DT nephron sections.

#### *Diabetes induced uncoupling of eNOS and increased expression of PKC $\beta$ 2*

The three isoforms of NOS (eNOS, nNOS, and iNOS) are expressed in the kidney [43]. Because  $O_2^{\cdot-}$  production was increased when L-arginine was added to GL, PT, and DT homogenates from diabetic rats, their roles were considered. It was found that eNOS expression was induced under diabetic conditions (Fig. 4A). In contrast, nNOS and iNOS were unchanged, indicating that nNOS and iNOS are not directly implicated in this stage of diabetes. Under pathological conditions, eNOS dysfunction or uncoupling resulted in decreased bioavailability of NO and increased generation of superoxide anion by the enzyme [44]. Urinary nitrate ( $NO_2^-$ ) and nitrite ( $NO_2^-$ ) excretion was measured to evaluate NO synthesis. As shown in Fig. 4B, diabetes decreased urinary nitrate  $NO_2^-$  and  $NO_2^-$  excretion, thus confirming that eNOS generates a smaller amount of NO, resulting in diminished NO bioavailability. Because eNOS dimer formation and stability are critical for eNOS to functionally produce NO, a decrease in the dimer-to-monomer ratio reflects eNOS uncoupling [44]. Therefore, the proportions of eNOS existing as either dimers or monomers in control and STZ-treated rats were determined (Fig. 4C). Electrophoresis of renal cortex homogenates without prior heat denaturation (low-temperature SDS-PAGE) revealed bands approximately twice the size of the eNOS monomer, attributable to the eNOS dimer (Fig. 4C). Under diabetic conditions, a significant reduction in the dimer-to-monomer ratio compared with the ratio in the control group was found (Fig. 4D), suggesting eNOS uncoupling. Hyperglycemia is a strong stimulus to activate PKC isoforms and intracellular high glucose levels produce ROS through PKC-dependent activation of NADPH oxidase [8]. Because  $O_2^{\cdot-}$  production was increased when NADH was added as substrate, we analyzed the expression of PKC $\beta$ 2 in GL, PTs, and DTs isolated from control and diabetic rats. We found an increased expression of PKC $\beta$ 2 in GL and PTs of diabetic rats but not in DTs (Fig. 4E), thus suggesting PKC-dependent activation of NADPH oxidase mainly in GL and PTs.

#### *Diabetes altered the expression of TJ proteins in GL, PT, and DT*

We analyzed whether diabetes affects expression and distribution of TJ proteins, claudin-5 in GL, claudin-2 and occludin in PTs, and ZO-1 and claudin-1, -4, and -8 in DTs. We found decreased expression of claudin-5 in GL from diabetic rats (Fig. 5A and B) compared to the control group. VE-cadherin (used as a marker of GL endothelial cells) did not change (Fig. 5A). Diabetes decreased expression of claudin-2 (Fig. 5C) and occludin in PTs (Fig. 5E) as

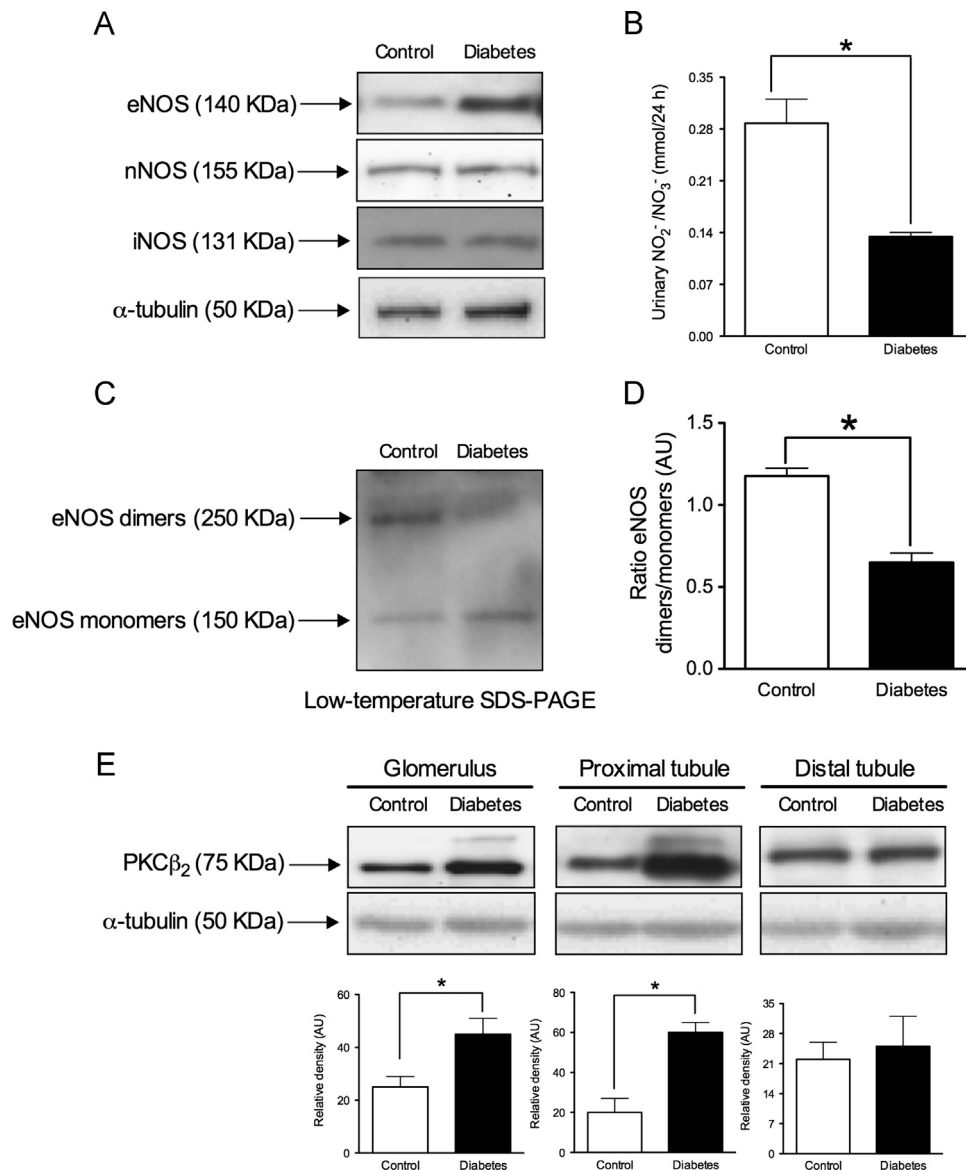
shown by immunofluorescence and Western blot from soluble and insoluble fractions (Fig. 5D and F). DppD, used as a marker of PT, did not change (Supplementary Fig. 3), indicating that the decrement in claudin-2 and occludin was selective (Fig. 5C and E). Also, in DTs isolated from diabetic rats, ZO-1 was redistributed from membrane to cytosol as shown by immunofluorescence (Fig. 6A) and Western blot from soluble and insoluble fractions (Fig. 6B). In contrast, no changes were found in the distribution and expression of claudin-1 (Fig. 6C and D). The membrane localization of claudin-4 and -8 was increased in DTs from diabetic rats as shown by immunofluorescence (Fig. 6E and G) and Western blot from the insoluble fraction (Fig. 6F and H). In contrast, the expression of claudin-4 and -8 was decreased in soluble fractions (Fig. 6F and H), indicating relocation of these claudins to the TJ. DMPK 1/2 was used as a marker of DTs and its expression did not change between the groups studied.

#### *Diabetes increased tyrosine nitration of claudin-2 but not occludin*

Peroxynitrite, the product of NO-superoxide interaction, is produced under oxidative stress conditions promoting eNOS uncoupling [34]. Peroxynitrite can evolve into oxidizing and nitrating species that cause nitration of amino acids, most notably, tyrosine [45]. The next experiment was designed to evaluate 3-NT levels, a footprint of peroxynitrite production. As shown in Fig. 7A and B, diabetes increased 3-NT levels evaluated by Western blot from renal cortex homogenates. To explore a direct effect of oxidative stress on TJ proteins, claudin-2 and occludin were immunoprecipitated from membranous fractions of isolated PTs and tyrosine nitration of both proteins was evaluated. Western blot of 3-NT was performed on immunoprecipitated extracts (Fig. 7C and D). Increased nitration of claudin-2 was observed under diabetic conditions, even when immunoprecipitated to a lesser extent. In contrast, occludin tyrosine nitration was unchanged under diabetic conditions. This finding suggests that claudin-2 can be a direct target of ROS and therefore suggests that loss of claudin-2 expression in PTs might partially explain increased natriuresis in diabetic rats, as it has been postulated that approximately one-third of the filtered sodium is reabsorbed through the paracellular pathway [46].

## **Discussion**

In this study the effects of early diabetic conditions on TJ proteins of renal epithelia and the relationship with oxidative stress were explored. Nephropathy is a frequent and severe complication of diabetes. However, initial damage has been poorly characterized. Our major findings at this early stage of diabetes evolution were: (1) diabetes increased oxidative stress in GL, PTs, and, to a lesser extent, DTs by a mechanism dependent on NADPH oxidase and uncoupled eNOS activities; (2) diabetes decreased notably the expression of TJ proteins (claudin-5, occludin, and claudin-2), especially in the renal segments where oxidative stress was more pronounced, GL and PTs; in contrast, in DTs, where oxidative stress was minor, increased expression of claudin-4 and -8 was found and ZO-1 was redistributed from TJ to cytosol; (3) claudin-2 is a direct target of ROS as evidenced by its increased tyrosine nitration under diabetic conditions. To our knowledge we describe for the first time these alterations in TJ proteins and the functional consequences. Rincon-Choles et al. [31] reported increased phosphorylation and decreased expression of glomerular ZO-1, a protein related to TJ in diabetic rats. These authors suggested a relationship between these changes and the presence of proteinuria; however, they did not explore this issue. We show



**Fig. 4.** Diabetes uncoupled eNOS and increased the expression of PKC $\beta$ 2 in GL and PTs, but not in DTs. (A) Western blot analyses in renal cortex homogenates of eNOS, nNOS, and iNOS showed that diabetes increased the expression of eNOS but not those of nNOS or iNOS. (B) Diabetic rats showed lower NO production as assessed by urinary excretion ratio of nitrates (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrites (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). (C) Also, eNOS dimer-to-monomer ratio was assessed to confirm eNOS uncoupling. As shown by low-temperature SDS-PAGE and Western blot, diabetes decreased eNOS dimer and increased eNOS monomer. (D) Dimer-to-monomer ratio was also decreased in diabetic rats compared to control rats. (E) Diabetes increased the expression of PKC $\beta$ 2 in isolated GL and PTs but not in DTs compared to control rats. Data for control (white bars) and diabetic (black bars) groups are expressed as relative density from four to six rats/group corrected with  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05. AU, arbitrary units.

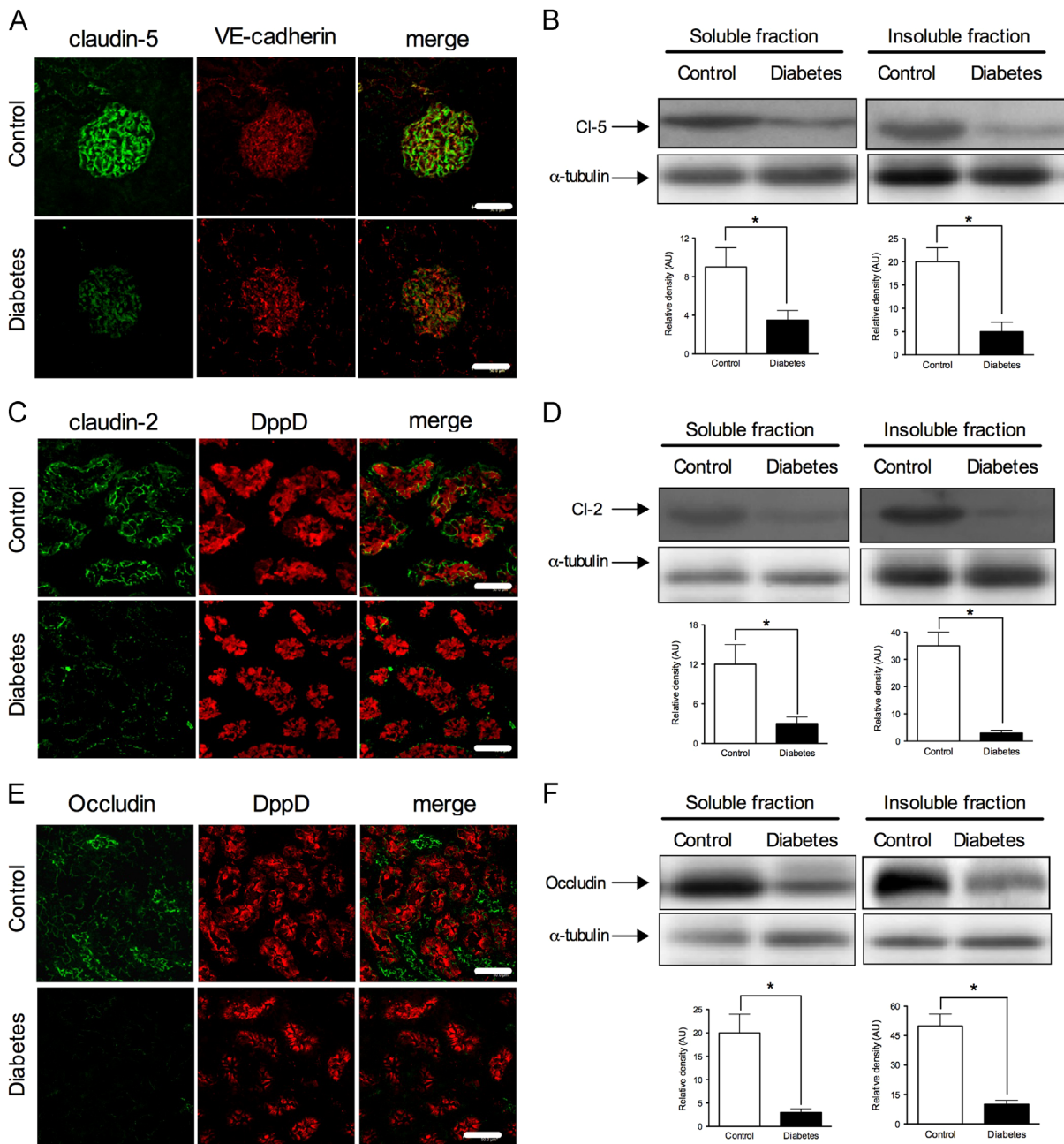
in this study an increment in proteinuria and damage to glomerular TJ proteins, confirming the suggestion made by those authors.

Physiological and biochemical renal alterations were explored in rats 21 days after STZ injection. We consider this period an early diabetic stage, because no changes were found in GFR, mean arterial pressure, renal potassium handling, or serum creatinine. It is known that KIM-1 expression is induced in proteinuric, toxic, and ischemic kidney diseases [39,40]. Herein we found that KIM-1 was significantly increased under diabetic conditions, which strongly suggests that tubular damage was present 21 days after STZ injection.

Other major alterations were proteinuria and natriuresis. Because there were no changes in glomerular filtration or sodium filtered load, this finding indicates alterations in the tubular reabsorption of sodium. Claudin-2, a protein of the intercellular TJ, acts as a sodium and water channel in the renal PT [21,22]. It has been described that almost one-third of the filtered sodium

is absorbed through the paracellular pathway in PTs and that the loss of claudin-2 decreases sodium reabsorption [10]. In agreement with alterations of sodium regulation, we found a decreased expression of claudin-2 in proximal tubules of diabetic rats, suggesting that the loss of claudin-2 might partially explain the increased natriuresis. Should these findings occur in diabetic patients, they would explain increased urinary loss of sodium and would question the usefulness of salt restriction in the diet of diabetic individuals, because it has been suggested that dietary sodium restriction might be associated with higher mortality and incidence of ESRD in patients with diabetes mellitus [47,48].

It is well established that oxidative stress is increased in the diabetic state, leading to structural and physiological alterations in the cells. We found that induction of SGLT1, SGLT2, and GLUT2 and decreased GLUT1 expression occur early in the diabetic kidney associated with oxidative stress. To explore oxidative stress, we decided to analyze the redox status of the diabetic kidney along

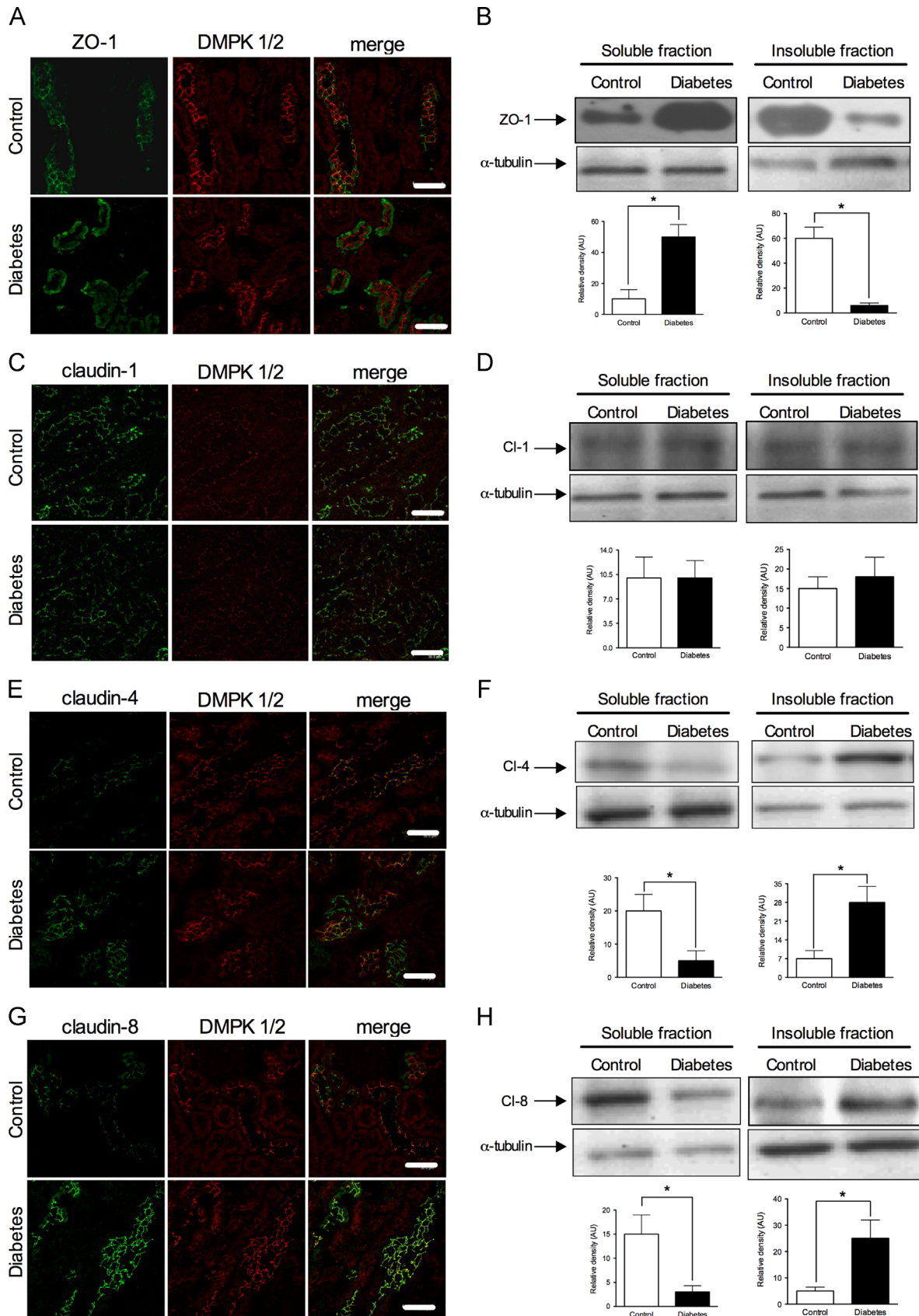


**Fig. 5.** Diabetes decreased the expression and membrane localization of endothelial claudin-5 in glomeruli and claudin-2 and occludin in proximal tubule epithelia. Twenty-one days after streptozotocin injection the localization (confocal microscopy) and expression (Western blot of soluble and insoluble fractions of renal cortex homogenates) of claudin-5 in GL and claudin-2 and occludin in PTs were assessed. Diabetes decreased (A) membrane localization of claudin-5 (green) and (B) expression in soluble and insoluble fractions in GL compared to control rats. VE-cadherin (red) was used as a marker of glomerular endothelia (A). Diabetes decreased (C and E) membrane localization of claudin-2 and occludin (green) and expression in soluble (cytosolic) and insoluble (membrane) fractions of (D) claudin-2 and (F) occludin in PTs. (C and E) Dipeptidyl peptidase (DppD)-4 (red) was used as a marker of PT brush border. Densitometric analyses of Western blots from control (white bars) and diabetic (black bars) rats are shown at the bottom of (B), (D), and (F). Data are expressed as relative density from four rats/group normalized to  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . Scale bar, 50  $\mu$ m. AU, arbitrary units.

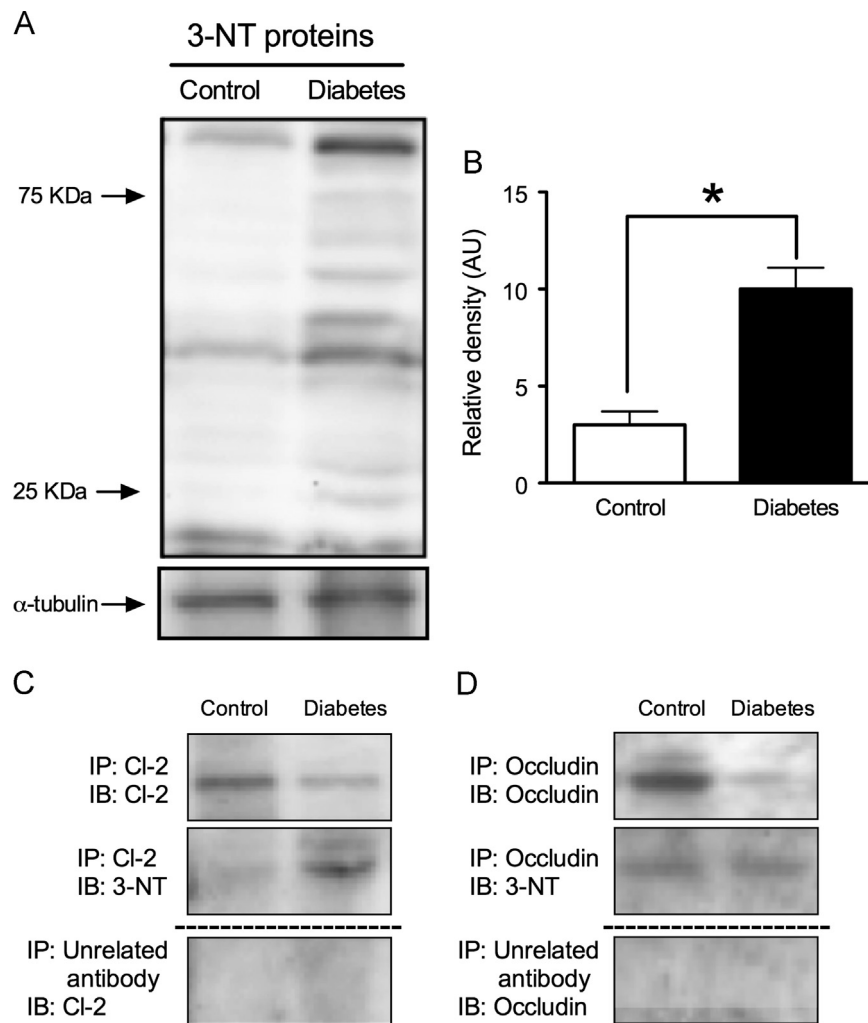
the nephron. We found increased ROS production, lipid peroxidation (evaluated by three procedures, colorimetric, Western blot, and immunofluorescence, with similar results), and protein carbonylation and decreased GSH content. Also, several sources of superoxide production were analyzed separately in the different segments of the nephron. Superoxide production was measured by the lucigenin-enhanced chemiluminescence assay. In recent papers it has been pointed out that most of the known analytical approaches (chemiluminescence, fluorescence) have some limitations [49]. However, as suggested by Zhao et al. [50], detection of the specific product 2-hydroxyethidium by HPLC/fluorescence

assay using hydroethidine is more suitable for quantifying intracellular superoxide production, and further experiments might be addressed to confirm the data found herein by using this technique. Oxidative stress induced by hyperglycemia in diabetic GL has been previously reported [51]. Satoh et al. [51] reported that this oxidative stress is triggered mainly by increased NADPH oxidase and NOS activities. We found that both NADPH oxidase and uncoupled eNOS systems are the main sources of oxidative stress in GL and PTs and to a lesser extent in DTs, at this early stage of diabetes. Additionally, PKC $\beta$ 2 expression was increased in GL and PTs but not in DTs (Fig. 4), thus indicating a major production of





**Fig. 6.** Diabetes caused redistribution of zonula occludens 1 and increased the expression and membrane localization of claudin-4 and -8 in distal tubules. Twenty-one days after streptozotocin injection localization (confocal microscopy) and expression (Western blot of soluble and insoluble fractions of renal cortex homogenates) of ZO-1, claudin-1, claudin-4, and claudin-8 were assessed in DTs. Diabetes redistributed ZO-1 from membrane to cytosol as shown by (A) immunofluorescence (green) and (B) Western blot analyses of soluble and insoluble fractions. No changes were observed in the (C) localization and (D) expression of claudin-1 in diabetic rats. In contrast, diabetes increased (E and G) membrane localization (green) and expression in insoluble fraction of (F) claudin-4 and (H) claudin-8 compared to control group. Desmoplakin (DMPK 1/2, red) was used as a marker of the DT cells. Densitometric analyses of Western blots from control (white bars) and diabetic (black bars) rats are shown at the bottom of (B), (D), (F), and (H). Data are expressed as relative density from four rats/group normalized to  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . Scale bar, 50  $\mu$ m. AU, arbitrary units.



**Fig. 7.** Diabetes increases tyrosine nitration of claudin-2, but not that of occludin in proximal tubules. (A) Twenty-one days after streptozotocin injection, the amount of nitrated proteins in renal cortex homogenates was increased in diabetic rats. (B) Densitometric analysis of Western blot from control and diabetic rats. Data are expressed as relative density from four rats/group normalized to  $\alpha$ -tubulin as loading control. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . Immunoprecipitation and Western blot of (C) claudin-2 and (D) occludin and 3-NT in isolated membranous fraction of PTs of control and diabetic rats are shown. Increased tyrosine nitration of claudin-2 was found in the diabetic group compared to control. In contrast, diabetes did not induce occludin tyrosine nitration. Immunoprecipitation with unrelated antibodies was used as negative control. Representative images of three separate experiments are shown.

ROS in GL and PTs that is probably dependent on PKC $\beta$ -dependent activation of NADPH oxidase. We found increased renal expression of eNOS together with decreased NO production; also a decreased eNOS dimer-to-monomer ratio was found in diabetic rats, suggesting eNOS uncoupling. It has been reported that under these conditions peroxynitrite synthesis is increased owing to the reaction between NO and superoxide anion, thus increasing the severity of oxidative stress [52]. Peroxynitrite is a reactive species that induces nitration of proteins in tyrosine residues, altering its structure and function that may lead to its degradation [52]. Next, we explored the nitration level of claudin-2 under diabetic conditions and we found an increased amount of nitrated claudin-2 (Fig. 7), which may cause structural and functional changes. Herein we propose claudin-2 nitration as a novel mechanism through which natriuresis is increased in the diabetic rats. In contrast, occludin expression was decreased in diabetic rats; however, no changes were found in its nitration state. This finding suggests that loss of occludin may occur by a mechanism independent of protein nitration.

Proteinuria has been used as an early marker of diabetic nephropathy [5]. In the present study, decreased expression of glomerular claudin-5 (an endothelial claudin also present in podocytes) was found under diabetic conditions. The loss of

claudin-5 in podocytes, which are the major constituents of the glomerular filtration barrier [25], might explain a possible mechanism that leads to early proteinuria in the diabetic state. Also, endothelial claudin-5 loss might explain early endothelial dysfunction reported in diabetic patients [7].

On the other hand, in DTs we found an increased expression of claudin-4 and -8 in the aldosterone-sensitive distal nephron. Previous in vitro studies reported an increase in claudin-4 [53] and claudin-8 phosphorylation mediated via aldosterone [54]. These claudins are barriers for cation absorption and would be an additional mechanism in the distal nephron to diminish sodium absorption and augment its urinary loss, contributing to increased natriuresis through decreased absorption both in proximal and in distal segments. To our knowledge, this mechanism is described for the first time in the diabetic kidney. Activation of WNK4 (with no lysine) kinases has been suggested to participate in claudin-4 phosphorylation [53,55].

ZO-1, a protein that is more abundantly expressed in the distal nephron, was redistributed from the membrane to the cytosolic fractions under diabetic conditions. Delocalization of ZO-1 from the TJ in the GL was also observed to contribute to proteinuria in diabetic rats [31]. Here we suggest that the delocalization of ZO-1 from the TJ in the DTs might contribute to the state of claudin

polymerization [56], leading to the modification of the permeability properties of distal nephron under diabetic conditions.

Claudin-5 and -2 and occludin were decreased, whereas claudin-4 and -8 were increased. Claudin-1 is constitutively expressed in epithelia, whereas in the kidney it is mainly expressed in glomerular parietal epithelium and in the distal nephron [10]. In this study, no changes were found in the expression of this claudin. These findings suggest that diabetes affects differentially the expression of renal claudins along the distinct sections of the nephron, which might be associated with the early stage of diabetes establishment. These differential changes might partially explain the functional alterations that we observed in regulation of sodium and glucose.

## Conclusion

In conclusion, here we report for the first time that diabetes induces differential changes in TJ protein expression in GL, PTs, and DTs. Those changes in GL and PTs are associated with increased oxidative stress in these nephron segments, which leads to alterations in the intercellular TJ and, as a consequence, to altered renal regulation of sodium.

## Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico (Grants 0179870 to J.L.R. and 129838 and PAPIIT IN210713 to J.P.Ch.). E.M.J. is the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (255413).

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040>.

## References

- [1] Stanton, R. C. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr. Diabetes Rep.* **11**:330–336; 2011.
- [2] Caramori, M. L.; Mauer, M. Diabetes and nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12**:273–282; 2003.
- [3] Reutens, A. T.; Atkins, R. C. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **170**:1–7; 2011.
- [4] Mogensen, C. E. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **28**:91–100; 1971.
- [5] Najafian, B.; Mauer, M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **83**:1–8; 2009.
- [6] Komers, R.; Cooper, M. E. Renal sodium handling in experimental diabetes: role of NO. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**:2170–2177; 1996.
- [7] Bitar, M. S.; Wahid, S.; Mustafa, S.; Al-Saleh, E.; Dhaunsi, G. S.; Al-Mulla, F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **511**:53–64; 2005.
- [8] Inoguchi, T.; Sonta, T.; Tsubouchi, H.; Etoh, T.; Kakimoto, M.; Sonoda, N.; Sato, N.; Sekiguchi, N.; Kobayashi, K.; Sumimoto, H.; Utsumi, H.; Nawata, H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**:S227–S232; 2003.
- [9] Wolf, G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**:785–796; 2004.
- [10] Hou, J.; Rajagopal, M.; Yu, A. S. Claudins and the kidney. *Annu. Rev. Physiol.* **75**:479–501; 2013.
- [11] Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S.; Tsukita, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**:1777–1788; 1993.
- [12] Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K.; Tsukita, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* **141**:1539–1550; 1998.
- [13] Kwon, O.; Myers, B. D.; Sibley, R.; Dafoe, D.; Alfrey, E.; Nelson, W. J. Distribution of cell membrane-associated proteins along the human nephron. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:1423–1434; 1998.
- [14] Reyes, J. L.; Lamas, M.; Martin, D.; del Carmen Namorado, M.; Islas, S.; Luna, J.; Tauc, M.; Gonzalez-Mariscal, L. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* **62**:476–487; 2002.
- [15] Lal-Nag, M.; Morin, P. J. The claudins. *Genome Biol.* **10**:235; 2009.
- [16] Mineta, K.; Yamamoto, Y.; Yamazaki, Y.; Tanaka, H.; Tada, Y.; Saito, K.; Tamura, A.; Igarashi, M.; Endo, T.; Takeuchi, K.; Tsukita, S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* **585**:606–612; 2011.
- [17] Fanning, A. S.; Jameson, B. J.; Jesaitis, L. A.; Anderson, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**:29745–29753; 1998.
- [18] Howarth, A. G.; Stevenson, B. R. Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **31**:323–332; 1995.
- [19] Umeda, K.; Matsui, T.; Nakayama, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Tsukita, S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* **279**:44785–44794; 2004.
- [20] Enck, A. H.; Berger, U. V.; Yu, A. S. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**:F966–F974; 2001.
- [21] Kiuchi-Saishin, Y.; Gotoh, S.; Furuse, M.; Takasuga, A.; Tano, Y.; Tsukita, S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**:875–886; 2002.
- [22] Rosenthal, R.; Milatz, S.; Krug, S. M.; Oelrich, B.; Schulzke, J. D.; Amasheh, S.; Gunzel, D.; Fromm, M. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* **123**:1913–1921; 2010.
- [23] Gonzalez-Mariscal, L.; Namorado Mdel, C.; Martin, D.; Sierra, G.; Reyes, J. L. The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**:2391–2398; 2006.
- [24] Wen, H.; Watry, D. D.; Marcondes, M. C.; Fox, H. S. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Cell. Biol.* **24**:8408–8417; 2004.
- [25] Koda, R.; Zhao, L.; Yaoita, E.; Yoshida, Y.; Tsukita, S.; Tamura, A.; Nameta, M.; Zhang, Y.; Fujinaka, H.; Magdeldin, S.; Xu, B.; Narita, I.; Yamamoto, T. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res.* **343**:637–648; 2011.
- [26] Prozialeck, W. C.; Niewenhuis, R. J. Cadmium (Cd<sup>2+</sup>) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**:81–97; 1991.
- [27] Jacquillet, G.; Barbier, O.; Cugnon, M.; Tauc, M.; Namorado, M. C.; Martin, D.; Reyes, J. L.; Poujeol, P. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**:F127–F137; 2006.
- [28] Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L. M.; Mendoza-Garrido, M. E.; Martin, D.; Namorado, M. C.; Calderon-Salinas, J. V.; Reyes, J. L. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol. Lett.* **191**:279–288; 2009.
- [29] Reyes, J. L.; Molina-Jijon, E.; Rodriguez-Munoz, R.; Bautista-Garcia, P.; Debray-Garcia, Y.; Namorado, M. D. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *BioMed Res. Int.* **2013**:730789; 2013.
- [30] Meyer, T. N.; Schwesinger, C.; Ye, J.; Denker, B. M.; Nigam, S. K. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* **276**:22048–22055; 2001.
- [31] Rincon-Choles, H.; Vasylyeva, T. L.; Pergola, P. E.; Bhandari, B.; Bhandari, K.; Zhang, J. H.; Wang, W.; Gorin, Y.; Barnes, J. L.; Abboud, H. E. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes* **55**:894–900; 2006.
- [32] Arreola-Mendoza, L.; Reyes, J. L.; Melendez, E.; Martin, D.; Namorado, M. C.; Sanchez, E.; Del Razo, L. M. Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* **218**:237–246; 2006.
- [33] Bautista-Garcia, P.; Reyes, J. L.; Martin, D.; Namorado, M. C.; Chavez-Munguia, B.; Soria-Castro, E.; Huber, O.; Gonzalez-Mariscal, L. Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**:F77–F87; 2013.
- [34] Zou, M. H.; Shi, C.; Cohen, R. A. Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* **109**:817–826; 2002.
- [35] Gonzalez-Ramirez, R.; Morales-Lazaro, S. L.; Tapia-Ramirez, V.; Mornet, D.; Cisneros, B. Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *J. Cell. Biochem.* **105**:735–745; 2008.
- [36] Molina-Jijon, E.; Tapia, E.; Zazueta, C.; El Hafidi, M.; Zatarain-Barron, Z. L.; Hernandez-Pando, R.; Medina-Campos, O. N.; Zarco-Marquez, G.; Torres, I.; Pedraza-Chaverri, J. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **51**:1543–1557; 2011.
- [37] Orozco-Ibarra, M.; Medina-Campos, O. N.; Sanchez-Gonzalez, D. J.; Martinez-Martinez, C. M.; Floriano-Sanchez, E.; Santamaria, A.; Ramirez, V.; Bobadilla, N. A.; Pedraza-Chaverri, J. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* **229**:123–135; 2007.
- [38] Gorin, Y.; Block, K.; Hernandez, J.; Bhandari, B.; Wagner, B.; Barnes, J. L.; Abboud, H. E. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J. Biol. Chem.* **280**:39616–39626; 2005.
- [39] Kramer, A. B.; van Timmeren, M. M.; Schuur, T. A.; Vaidya, V. S.; Bonventre, J. V.; van Goor, G.; Navis, G. Reduction of proteinuria in adriamycin-induced

- nephropathy is associated with reduction of renal kidney injury molecule (Kim-1) over time. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**:F1136–F1145; 2009.
- [40] Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**:3265–3268; 2009.
- [41] Bailey, C. J. Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**:63–71; 2011.
- [42] Ha, H.; Lee, H. B. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology* **10**(Suppl); 2005. (S7–10).
- [43] Mount, P. F.; Power, D. A. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol.* **187**:433–446; 2006.
- [44] Forstermann, U.; Munzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**:1708–1714; 2006.
- [45] Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4003–4008; 2004.
- [46] Berry, C. A.; Rector Jr. F. C. Mechanism of proximal NaCl reabsorption in the proximal tubule of the mammalian kidney. *Semin. Nephrol.* **11**:86–97; 1991.
- [47] Vallon, V.; Thomson, S. C. Anomalous role for dietary salt in diabetes mellitus? *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**:377–378; 2011.
- [48] Ekinci, E. I.; Clarke, S.; Thomas, M. C.; Moran, J. L.; Cheong, K.; Maclsaac, R. J.; Jerums, G. Dietary salt intake and mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **34**:703–709; 2011.
- [49] Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts 2nd L. J.; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**:1–6; 2012.
- [50] Zhao, H.; Joseph, J.; Fales, H. M.; Sokoloski, E. A.; Levine, R. L.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:5727–5732; 2005.
- [51] Satoh, M.; Fujimoto, S.; Haruna, Y.; Arakawa, S.; Horike, H.; Komai, N.; Sasaki, T.; Tsujioka, K.; Makino, H.; Kashihara, N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**:F1144–F1152; 2005.
- [52] Daiber, A.; Daub, S.; Bachschmid, M.; Schildknecht, S.; Oelze, M.; Steven, S.; Schmidt, P.; Megner, A.; Wada, M.; Tanabe, T.; Munzel, T.; Bottari, S.; Ullrich, V. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite—strategies to prevent these oxidative modifications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**:7542–7570; 2013.
- [53] Le Moellic, C.; Boulkroun, S.; Gonzalez-Nunez, D.; Dublineau, I.; Cluzeaud, F.; Fay, M.; Blot-Chabaud, M.; Farman, N. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**:C1513–C1521; 2005.
- [54] Amasheh, S.; Milatz, S.; Krug, S. M.; Bergs, M.; Amasheh, M.; Schulzke, J. D.; Fromm, M. Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**:45–50; 2009.
- [55] Yamauchi, K.; Rai, T.; Kobayashi, K.; Sohara, E.; Suzuki, T.; Itoh, T.; Suda, S.; Hayama, A.; Sasaki, S.; Uchida, S. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4690–4694; 2004.
- [56] Yamazaki, Y.; Tokumasu, R.; Kimura, H.; Tsukita, S. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol. Biol. Cell* **22**:1495–1504; 2011.

## All-*trans* retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model

Eduardo Molina-Jijón<sup>a</sup>, Rafael Rodríguez-Muñoz<sup>a</sup>, María del Carmen Namorado<sup>a</sup>, Pablo Bautista-García<sup>a</sup>, Omar Noel Medina-Campos<sup>b</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>, José L. Reyes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), México D.F., 07360, Mexico

<sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510 University City D.F., Mexico

Received 1 July 2014; received in revised form 7 November 2014; accepted 19 November 2014

### Abstract

We previously reported that diabetes decreased the expression of renal tight junction (TJ) proteins claudin-5 in glomerulus, and claudin-2 and occludin in proximal tubule through an oxidative stress dependent way. Now we investigated whether all-*trans* retinoic acid (atRA), a compound that plays a relevant role in kidney maintenance and that possesses antioxidant properties, prevents loss of TJ proteins in streptozotocin (STZ)-treated rats. atRA was administered daily by gavage (1 mg/kg) from Days 3–21 after STZ administration. atRA attenuated loss of body weight, proteinuria and natriuresis but it did not prevent hyperglucemia. Other metabolic alterations, such as: increased kidney injury molecule (KIM)-1, oxidative stress, protein kinase C (PKC) beta 2, NADPH oxidase subunits (p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup>) expressions and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling, and decreased nitric oxide synthesis, nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) expressions were also attenuated by atRA. *In vitro* scavenging capacity assays showed that atRA scavenged peroxy radicals (ROO•), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) and hypochlorous acid (HOCl) in a concentration-dependent manner. Decreased expressions of occludin, claudins-2 and -5 induced by diabetes were ameliorated by atRA. We also found that diabetes induced tyrosine nitration (3-NT), SUMOylation and phosphorylation in serine residues of claudin-2 and atRA prevented these changes. In conclusion, atRA exerted nephroprotective effects by attenuating oxidative stress and preventing loss of renal TJ proteins.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Diabetes; Renal tight junctions; Oxidative stress; All-*trans* retinoic acid; Claudins

### 1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN) represents the major cause of end-stage renal failure in western societies [1]. Clinically, it is characterized by the development of proteinuria with a subsequent decline in glomerular filtration rate [2] and altered renal sodium handling [3]. The pathogenesis of DN is complex, high glucose levels induce several cellular effects, which affects various kidney cells including those of the tubular and collecting duct systems [4,5]. Under diabetic conditions, excess of glucose in the glomerular filtrate, leads to enhanced proximal tubule glucose reabsorption, further augmenting the effects of hyperglycemia on intracellular glucose flux within the proximal tubule [4]. Some of the pathophysiological changes that develop in the setting of diabetes include activation of various secondary metabolic pathways leading to oxidative stress, protein kinase C (PKC) activation and increased polyol production [5,6]. It has been described that NADPH oxidase is a potential pathogenic mediator of hyperglycemia-induced reactive oxygen species (ROS) production

such as superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [6,7]. Also, there is evidence that uncoupling of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is a major source of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> at sites of diabetic complications, which is produced in preference to NO in that context [5,8].

Renal tight junction (TJ) proteins are responsible for paracellular transport of solutes and water and hence in extracellular fluid homeostasis [9]. Claudins are the major components in TJ strands, a variety of them are expressed in the kidney modulating the variability in the permeability of renal epithelia (For review see [9]). Several studies have shown that claudins are responsible for the size- and charge-selective conductance properties of the paracellular pathways. Based on whether their expression increases or decreases transepithelial electrical resistance (TER), claudins can be classified as barrier or pore proteins [9]. Furthermore, in the nephron, pore claudins are associated with leakier tubule segments such as the proximal tubule, whereas barrier claudins are expressed in tighter tubule segments such as the distal nephron. For example, claudin-2 is considered as a paracellular cation pore, its expression in the proximal tubule leads to the reabsorption of sodium and water by the paracellular route [10,11]. In contrast, claudins-4 and -8 are expressed in the distal nephron and have been considered as cation barrier claudins [9]. Claudin-5 has been classified as a cation barrier claudin

\* Corresponding author. Tel.: +55 5747 3962/3800/5147/5723; fax: +55 5747 3754.

E-mail address: [jreyes@fisio.cinvestav.mx](mailto:jreyes@fisio.cinvestav.mx) (J.L. Reyes).

expressed throughout the plasma membrane of podocytes [12]. Occludin is a tetraspan protein present in the filaments that constitute the TJ [13]. It is present in epithelial and endothelial cells, and absent both at the mRNA and protein level in cells that lack TJs such as fibroblasts [13]. In tubular renal cells, occludin is present at the cell borders, and its distribution follows the increase in TJ complexity and function displayed by the nephron. The overall distribution of occludin along the nephron agrees with the TER reported in renal segments. Thus, in regions where TER is high, occludin fluorescent signal is located at cell borders, suggesting an intimate relationship between its presence and the strength of the TJ [14]. The impact of diabetes on renal TJ and its association with the pathogenesis of DN has been poorly explored. In animal models where diabetes was induced with streptozotocin (STZ), an altered localization and a decreased content and phosphorylation of zonula occludens (ZO)-1, a peripheral protein of the TJ, is observed in kidney glomerular epithelial cells [15]. Our group recently reported that diabetes decreased protein levels of claudin-2 and occludin in proximal tubules, and claudin-5 in glomeruli, while increased levels of claudins-4 and -8 in distal tubules were found [8]. Diabetes-induced oxidative stress was associated with decreased levels of claudin-2, since increased tyrosine nitration of this protein was found.

Dietary vitamin A and its metabolites, known generally as retinoids, participate in renal development and its deficiency in the embryologic state influences tubulogenesis and determine the number of glomeruli per kidney [16,17]. At the cellular levels, retinoids exert its effects through two families of intracellular receptors termed retinoic acid receptors (RARs), which binds all-trans retinoic acid (atRA) and 9-cis-RA, and retinoid X receptors (RXRs), which bind 9-cis-RA. Upon ligand binding, homo- and heterodimeric receptors recruit coactivator proteins and initiate gene transcription by binding to retinoic acid response elements located within the promoters of several genes [18]. Retinoids have been proposed as potential renal therapeutic agents because its administration alleviates renal damage in the anti-Thy 1.1 model of acute immune-mediated renal disease by reducing the expression of TGF- $\beta$ 1 [19]. Also, retinoids have antioxidant effects by blocking lipid peroxidation in STZ-induced diabetic rats [20]. It has been described that atRA suppressed inflammation by decreasing monocyte chemoattractant peptide (MCP)-1 up-regulation in the podocytes in the early stages of DN [21]. atRA is believed to be an obligatory component in the differentiation of epithelial cells that leads to the establishment of the epithelial integrity, since it has been described that atRA up-regulates ZO-1 and occludin expression in human retinal pigment epithelial cells, suggesting its role in the barrier function in a process involving a specific increase in these TJ proteins [22].

The aim of this work is to explore whether atRA improves damage to renal TJ proteins by attenuating oxidative stress. Our results demonstrate that atRA reduced loss of claudin-2 and occludin in proximal tubules and claudin-5 in glomeruli by decreasing oxidative stress. Improvements of claudins-2 and -5 levels were associated with decreased natriuresis and proteinuria, respectively. atRA prevented loss of claudin-2 by decreasing its nitration, serine phosphorylation and SUMOylation. However, atRA did not have effect on increased expressions of claudins-4 and -8 in the distal tubules. These results suggest that this compound might be a potential nephroprotective agent against glomerular and tubular dysfunctions in early stages of DN.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The rabbit anti-claudins-2, -4, -5, and -8, rabbit anti-occludin, peroxidase-conjugated anti-rabbit, peroxidase-conjugated anti-mouse, Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat, Alexa Fluor® 594 donkey anti-mouse antibodies and recombinant protein G agarose were purchased from Invitrogen

(Carlsbad, CA, USA). The rabbit anti-sodium glucose cotransporter (SGLT1), rabbit anti-facilitative glucose transporter (GLUT1), rabbit anti-GLUT2, mouse anti-glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) and mouse anti-3-nitrotyrosine (3-NT) antibodies were purchased from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). The goat anti-SGLT2, rabbit anti-eNOS, mouse anti-vascular endothelial-cadherin (VE-Cad), rabbit anti-SUMO-1, goat anti-p47<sup>phox</sup>, goat anti-gp91<sup>phox</sup>, and peroxidase-conjugated anti-goat antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), atRA, Percoll, STZ, rabbit anti-protein kinase C  $\beta$ 2 (PKC $\beta$ 2), rabbit anti-heme oxygenase-1 (HO-1), rabbit anti-nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) and rabbit anti-phospho serine (pSer) antibodies, fluorescein, 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF), *p*-aminobenzoic acid, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KOH, butylated hydroxytoluene (BHT), xylenol orange, ammonium ferrous sulfate, methanol, ascorbic acid, FeCl<sub>3</sub>, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na<sub>2</sub>-EDTA), terephthalic acid, KNO<sub>2</sub>, NaOH, MnO<sub>2</sub>, diethylenediaminepentaacetic acid, xanthine, xanthine oxidase, nitroblue tetrazolium (NBT), dinitrophenylhydrazine (DNPH), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, lipoic acid, Trolox, glutathione reduced form (GSH), tetramethoxypropene, streptomycin sulfate, vitamin C, pyruvate, dimethyl thiourea (DMTU), penicillamine, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), bovine serum albumin (BSA) and 1-metil-2-phenylindol were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCDFDA) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Monochlorobimane was purchased from Fluka (Schnellendorf, Germany). The mouse anti-dipeptidylpeptidase-IV (DppIV) antibody was purchased from AbD serotec (Raleigh, NC, USA). The goat anti-kidney injury molecule (KIM)-1 was purchased from R&D systems (McKinley Place, MN, USA). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich Co. unless otherwise stated.

### 2.2. Experimental design

Animal experiments were performed in accordance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999, and institutional animal care committee (UPEAL) guidelines (approved protocol for this study #491). Female Wistar rats with an initial body weight of 200–250 g were housed with 12/12 h light/dark cycles at 22±1 °C and 50±5% humidity. Animals received water and food *ad libitum*. Rats were fed with PicoLab® Rodent Diet 20 (St. Louis, MO, USA) which contains 15 IU/g of vitamin A. Type-1 diabetes was induced by a single tail vein injection of STZ (60 mg/kg body weight) diluted in citrate buffer, pH 6.0. Non-diabetic control rats were injected with equal volume of citrate buffer. After 3 days, blood glucose was measured with OneTouch® Ultra blood glucose meter (Milpitas, CA, USA). atRA was dissolved in peanut oil and given daily by gavage (1 mg/kg body weight) at a volume 250  $\mu$ l to STZ-, atRA- and vehicle-treated groups. Rats were sacrificed 21 days after STZ or vehicle administration. Four groups of rats were studied ( $n=10$ /group): (1) control group, treated daily via oral gavage with peanut oil (atRA-vehicle) from Days 3–21 after a single injection of citrate buffer (STZ vehicle); (2) Diabetic (DBT) (STZ-treated) group, treated daily via oral gavage with peanut oil from Days 3–21 after STZ administration; (3) DBT+atRA group, atRA was given daily via oral gavage from Days 3–21 after STZ injection; and (4) atRA group, atRA was given daily via oral gavage from Days 3–21 after injection of citrate buffer. Rats were kept in metabolic cages from days 20–21 to collect 24 h urine for the measurements of proteinuria, creatinine and sodium.

### 2.3. Biochemical and physiological parameters

Blood glucose and body weight were monitored at Days 3, 7, 14 and 21 throughout the study. At Day 21, blood was collected by cardiac puncture under anesthesia with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) and serum was separated. Total urinary protein was measured by the Lowry method (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Urinary and serum creatinine were measured by the modified Jaffé reaction as previously described [23]. The urinary protein to creatinine ratio was obtained by dividing the urine protein concentration by the urine creatinine concentration, both expressed in mg/dl. Proximal tubular function was estimated by measuring fractional excretion of sodium (FeNa). Urinary and serum sodium concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 3100 with an air-acetylene flame, Norwalk, CT, USA) as previously described [23]. Sodium fractional excretion was calculated according to the following equation: Fractional excretion of sodium (%)=(sodium clearance/creatinine clearance) $\times$ 100. Urinary nitrate (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrite (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) excretion was measured by the nitric oxide (NO) colorimetric assay kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA).

### 2.4. Extraction of renal tissues and total proteins of renal cortex

Kidneys from the four experimental groups were perfused with isotonic saline solution (0.9% NaCl), excised, and placed on ice-cold saline solution. Kidneys were decapsulated, and the cortex was removed. For total protein extraction, renal cortex was placed in 15 ml of ice-cold Krebs-Bicarbonate solution (KB, mM): 110 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 0.7 MgSO<sub>4</sub>, 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 sodium acetate, 5.5 glucose, 5 alanine, and 0.5 g/L BSA, pH 7.4, osmolality 290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, washed three times, and resuspended in 10 ml of ice-cold KB, containing 15 mg of type II collagenase (from Clostridium histolyticum, type II; Sigma-Aldrich Co.). Samples were gassed with 95% air/5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath for 20 min at 37 °C. After digestion, approximately 30 ml of ice-cold KB with the protease inhibitor cocktail Complete 1 $\times$  and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 1 mM) were added, and the suspension was

gently agitated to disperse tissue fragments. Suspension was filtered to remove collagen fibers, and the tissue suspension was gently centrifuged ( $18\times g$  for 30 s). Pellet was resuspended in 30 ml of ice-cold KB containing protease inhibitor cocktail. This washing procedure was repeated three times. Tissue pellets were suspended and incubated for 30 min at 4 °C in 500  $\mu$ l of lysis buffer (RIPA, mM): 40 Tris-HCl pH 7.6, 150 NaCl, 2 EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Thereafter, samples were sonicated three times for 30 s each in a high-intensity ultrasonic processor (Vibra cell; Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA), centrifuged at  $20,000\times g$ , at 4 °C, for 40 min and supernatants were collected.

### 2.5. Isolation of glomeruli (GL), proximal (PT) and distal (DT) tubules

GL were isolated as previously described [8]. Briefly, kidney cortex was separated from medulla and minced on a glass dish. The homogenized tissue was pushed through a stainless sieve with a pore size of 117  $\mu$ m (cat. no. 8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) applying gentle pressure with the bottom of a glass flask. The sieve was rinsed several times with phosphate-buffered solution (PBS). The sieved tissue containing a preparation enriched in glomeruli was transferred to a second sieve with a pore opening of 74  $\mu$ m (cat. no. 8321A58; Thomas Scientific). After several washings with ice-cold PBS the material that remained on top of the sieve, which contained the glomeruli, was collected in ice-cold PBS and centrifuged at  $20,000\times g$  for 10 min. The supernatant was decanted and the pellet containing the glomeruli was resuspended in PBS.

Renal tubules were isolated by Percoll gradients as previously described [8,24]. Briefly, renal cortex was placed in 15 ml of ice-cold KB solution, washed three times, and resuspended in 10 ml of KB containing 15 mg of type-II collagenase and 0.5 ml of 10% BSA. Samples were gassed with 95% air/5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath for 20 min at 37 °C. After digestion, approximately 20 ml of ice-cold KB solution with a protease inhibitor cocktail Complete 1 $\times$  (Boehringer Mannheim, Germany) and PMSF (1 mM) were added, and the suspension was gently agitated to disperse tissue fragments. Suspension was filtered to remove collagen fibers, and tissue suspension was gently centrifuged ( $18\times g$  for 30 s). Pellet was resuspended in 10 ml of ice-cold KB with the protease inhibitor cocktail. This washing procedure was repeated three times. The tissue pellet was then resuspended in 5% BSA with protease inhibitors for 5 min, at 4 °C and centrifuged for 1 min, and supernatant was discarded. Tissue pellets were suspended in 30 ml of a freshly prepared mixture of ice-cold Percoll and KB (1:1, v/v). Thereafter, the suspension was centrifuged ( $1071\times g$  for 30 min), resulting in separation of four bands. The first was enriched with distal tubules; the second with glomeruli, and the third contained a mixture of isolated tubular segments. The fourth (deepest) band was significantly enriched in proximal tubules. Bands content was confirmed by light microscopy observation and by Western blot analysis of claudin-5, DppD and aquaporin-2, as previously described [8].

### 2.6. Western blot analysis

Western blot was performed as previously described [8]. Briefly, samples were denatured by boiling for 12 min and then diluted 1:5 in 5 $\times$  Laemli buffer with 20 mM urea. Proteins were loaded on SDS-PAGE 12% gels. Molecular weight standards (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) were run in parallel. Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosci, Uppsala, Sweden). Nonspecific protein binding was blocked by incubation with 5% non-fat dry milk in PBS 1 $\times$  containing 0.5% Tween 20, for 1 h, at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies against claudins-2, -4, -5, -8, SGLT1, SGLT2, GLUT1, GLUT2, occludin, PKC $\beta$ 2, eNOS, KIM-1, 3-NT, Nr2f, HO-1, p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>, pSer, and SUMO-1 (dilution 1:1,000). Thereafter, membranes were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat (dilution 1:30,000) for 1 h, after washing, immunoblots were developed using the ECL<sup>TM</sup> prime Western blotting detection reagent (Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Chemiluminescence was detected in an EC3 Imaging System (UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, UK). Protein band density was quantified by transmittance densitometry (UVP Bioluminescence Systems software, Cambridge, UK).

### 2.7. Assay of eNOS dimer/monomer

eNOS dimers and monomers were assayed by using low-temperature SDS-PAGE as described previously [8,25]. Briefly, total proteins from renal cortex were mixed with loading buffer and loaded on gels without boiling. Proteins were separated with low-temperature SDS-PAGE under reducing conditions (with  $\beta$ -mercaptoethanol). Gels and buffers were kept at 4 °C during the whole procedure.

### 2.8. Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of claudin-2 was performed in isolated PT with anti-claudin-2 (10  $\mu$ g of mouse anti-claudin-2; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as previously described [8]. Briefly, proximal tubule extracts (1 mg) were precleared with 20  $\mu$ l of recombinant protein G-agarose beads overnight at 4 °C. The beads were removed by centrifugation at  $16,000\times g$  for 5 min, and precleared extracts were incubated overnight at 4 °C with 2.5 mg of the immunoprecipitating antibody previously bound to protein G-agarose. As negative control, parallel incubations with an irrelevant antibody

(polyclonal anti- $\beta$ -dystroglycan antibody) were performed. Immune complexes were collected by centrifugation at  $16,000\times g$  for 5 min and washed three times with 1 ml of RIPA buffer and then, eluted by boiling in 300  $\mu$ l of RIPA buffer. Immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot as described above.

### 2.9. Immunofluorescence

Kidney samples were prepared for immunofluorescence as previously described [8,26]. Briefly, cubes of 0.5 cm/side were cut and immediately immersed for 5 min in 2-methylbutane (Aldrich M3, 263-1; Milwaukee, WI, USA), which was immediately cooled in liquid nitrogen. Next, 6  $\mu$ m sections were cut in a Leica CM 1510 cryostat (Wetzlar, Germany) and mounted on gelatin-coated slides that were then kept frozen at -70 °C. For the immunofluorescence experiments, the sections were fixed for 10 min with methanol and subsequently incubated for 5 min at room temperature in 0.2% (vol/vol) Triton X-100. Then, the tissue sections were washed thrice with PBS, blocked for 1 h at room temperature with 0.2% (wt/vol) IgG-free albumin (1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, USA), and incubated overnight at 4 °C with one of the following primary polyclonal antibodies: anti claudins-2, -5, VE-cad, KIM-1, and occludin (dilution 1:100) and DppD (dilution 1:300). GL were double-labeled for claudin-5 and VE-cad (dilution 1:100). To label the brush border of PT, DppD antibody was used. Secondary antibodies Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-goat and Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 donkey anti-mouse (dilution 1:500) were used. Immunofluorescence was evaluated using a confocal inverted microscope (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Germany). Immunofluorescence experiments were performed at least three times in samples from three different animals per group. Nonspecific labeling was assessed by exclusion of the primary antibodies.

### 2.10. Oxidative stress markers

ROS production, lipid peroxidation, protein carbonylation and GSH content were measured in homogenates from renal cortex, as previously described [27]. Briefly, renal cortex was dissected out and homogenized in a Polytron (Model PT 2000; Brinkmann, Westbury, NY, USA) for 10 s in ice-cold PBS (50 mM) containing: 0.1% Triton X-100 pH 7.0, BHT (0.5 M), leupeptin (5  $\mu$ g/ml), pepstatin (7  $\mu$ g/ml), and aprotinin (5  $\mu$ g/ml). Homogenates were centrifuged at  $19,000\times g$  for 30 min at 4 °C and supernatant was separated to measure total protein by Lowry method and oxidative stress markers.

ROS formation was estimated according to previous reports [28]. Briefly, aliquots of 1.5 ml of renal cortex homogenates (50 mg) were incubated with 0.5 ml of 5  $\mu$ M DCFHDA at 37 °C for 1 h. Fluorescence signals were recorded at the end of the incubation at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm using a Synergy HT multimode microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). A standard curve was obtained using increasing concentrations of dichlorofluorescein (DCF) incubated in parallel. Results are expressed as fluorescence arbitrary units (FAU)/mg of protein.

Lipid peroxidation was assessed by malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) measurements by using a standard curve of tetramethoxypropane as previously described [27]. Briefly, a solution of 1-methyl-2-phenylindole in a mixture of acetonitrile:methanol (3:1) was added to the samples and the reaction was started by adding 37% of HCl. Optical density was measured at 586 nm after 1 h of incubation at 45 °C. Data are expressed as nmol MDA+4-HNE/mg protein.

Assessment of carbonyl formation was performed on the basis of formation of protein hydrazone by reaction with DNPH. Briefly, kidney homogenates were incubated overnight with 10% (wt/vol) streptomycin sulfate to remove nucleic acids. Later, homogenates were treated with 10 mM DNPH. After addition of 20% (vol/vol) trichloroacetic acid, and centrifugation at  $3000\times g$  for 10 min pellets were washed three times with ethyl acetate/ethanol (1:1, v/v). After centrifugation at  $3000\times g$  for 10 min pellets were resuspended with 6 M guanidine hydrochloride. The absorbance was measured at 370 nm. Protein carbonylation is expressed as nmol/mg protein as previously described [27].

GSH levels were measured using monochlorobimane as previously described [27]. The fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 385 and 478 nm, respectively, using a Synergy HT multimode microplate reader. GSH levels are expressed as  $\mu$ mol/mg protein.

### 2.11. In vitro antioxidant activity

The experiments were performed on atRA and reference compounds using a Synergy HT multimode microplate reader. The data are expressed as IC<sub>50</sub> (mM) for atRA and reference compounds. The reference compounds used were: Trolox (for ROO<sup>•</sup>), lipoic acid (for <sup>1</sup>O<sub>2</sub>), vitamin C (for HOCl), pyruvate (for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DMTU (for <sup>•</sup>OH), penicillamine (for ONOO<sup>-</sup>) and NDGA (for O<sub>2</sub><sup>-•</sup>).

#### 2.11.1. Peroxyl radicals (ROO<sup>•</sup>) scavenging assay

The scavenging activity of atRA was determined by the stability of the fluorescence of fluorescein by ROO<sup>•</sup>. Briefly, a solution of 25  $\mu$ l of atRA (0-3.125  $\mu$ g/ml of ethanol) or 75 mM phosphate buffer, pH 7.4 [0% scavenging tube (blank)] was added to the solution composed by 23 nM fluorescein and 19 mM 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. Fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively for 1.5 h at 37 °C. At the end of the assay the area under the curve (AUC) was obtained by Gen 5 software (Biotek Instruments). This assay depends on ROO<sup>•</sup> damage to fluorescein that results in a decrement of fluorescence

intensity (FI). The antioxidant effect of atRA results in the inhibition of ROO• damage to the fluorescein molecule. The scavenging capacity for ROO• was calculated from the values of the AUC given by the trolox standards (0–10 μM). The scavenging capacity was calculated by using the following equation: [(AUC atRA–AUC blank)/(AUC trolox 10 μM–AUC blank)]×100.

#### 2.11.2. Singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) scavenging assay

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> was generated from HOCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as previously described [29]. The reaction consisted of 25 μl of atRA (0–300 μg/ml of ethanol) or 45 mM phosphate buffer pH 7.0 [0% scavenging tube (blank)] to 275 μl of the reaction mixture (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 mM HOCl and 1 mM DPBF). <sup>1</sup>O<sub>2</sub> causes a reduction in DPBF fluorescence that was measured at excitation and emission wavelengths of 410 and 455 nm, respectively. The change in FI of DPBF in absence of atRA was considered as the 100% of generation of reactive oxygen species and the scavenging capacity value was calculated as follows: [(FI<sub>blank</sub>–FI<sub>atRA</sub>)/(FI<sub>blank</sub>)]×100.

#### 2.11.3. Hypochlorous acid (HOCl) scavenging assay

The ability of atRA to scavenge HOCl was determined using *p*-aminobenzoic acid which reacts with HOCl to produce the fluorescent compound 3-chloro-4-aminobenzoic acid [30]. Briefly, 30 μl of atRA (0–300 μg/ml of ethanol) or buffer [0% scavenging tube (blank)] were mixed with 270 μl of the reaction mixture (0.05 mM HOCl, 0.1 mM *p*-aminobenzoic acid in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH buffer, pH 7.4) and fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 280 and 340 nm, respectively. The change in fluorescence intensity of *p*-aminobenzoic acid in absence of atRA was considered as the 100% of generation of reactive oxygen species and the scavenging capacity value was calculated as follows: [(FI<sub>blank</sub>–FI<sub>atRA</sub>)/(FI<sub>blank</sub>)]×100.

#### 2.11.4. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) scavenging assay

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured by the method reported by Long et al. [31]. Briefly, 9 volumes of 4.4 mM BHT in HPLC-grade methanol were mixed with 1 volume of 1 mM xylenol orange and 2.56 mM ammonium ferrous sulfate in 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to give the “working” FOX reagent. Forty five microliters of dilutions of atRA (0–22.5 μg/ml of ethanol), and 45 μl of 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were pipetted in Eppendorf tubes and mixed with 10 μl of HPLC-grade methanol immediately followed by the addition of 0.9 ml of FOX reagent, vortexed for 5 s and then incubated at room temperature for 10 min. The tubes were centrifuged at 15,000×g for 10 min and absorbance at 560 nm was read against methanol blank.

#### 2.11.5. Hydroxyl (•OH) scavenging assay

•OH was generated by the Fenton reaction [32]. Twenty μl of a solution of atRA (0–22.5 μg/ml of ethanol) or ethanol (0% scavenging) were added to 180 μl of the reaction mixture (0.2 mM ascorbic acid, 0.2 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.208 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.4 mM terephthalic acid, and 20 mM phosphate buffer, pH 7.4). The mixture was incubated for 30 min at room temperature to obtain a fluorescent product that was measured at excitation and emission wavelengths of 326 and 432 nm, respectively.

#### 2.11.6. Peroxynitrite (ONOO<sup>–</sup>) scavenging assay

ONOO<sup>–</sup> was synthesized as previously described [33]. Five ml of an acidic solution (0.6 M HCl) and of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.7 M) was mixed with 5 ml of 0.6 M KNO<sub>2</sub> on ice bath for 1 s and the reaction was quenched with 5 ml of ice-cold 1.2 M NaOH. Residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was removed using granular MnO<sub>2</sub> prewashed with 1.2 M NaOH and the reaction mixture was then left overnight at –20 °C. The resulting yellow liquid layer on the top of the frozen mixture was collected for the experiment. Concentrations of ONOO<sup>–</sup> were determined before each experiment at 302 nm using a molar extinction coefficient of 1,670 M<sup>–1</sup> cm<sup>–1</sup>. ONOO<sup>–</sup> scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCDHFDA to the fluorescent product DCF at excitation and emission wavelengths of 502 and 523 nm, respectively. The reaction mixture (in a final volume of 0.2 ml in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) consisted of 33 μM diethylenetriaminepentaacetic acid, 6 μM DCDHFDA, 20 μM ONOO<sup>–</sup> and different concentrations of atRA (0–22.5 μg/ml of ethanol).

#### 2.11.7. Superoxide (O<sub>2</sub><sup>•–</sup>) scavenging assay

The scavenging activity of atRA was determined by evaluating its ability to decrease formazan production from NBT induced by O<sub>2</sub><sup>•–</sup> generated by the xanthine–xanthine oxidase system. Briefly, 100 μl of a solution composed of atRA (0–22.5 μg/ml of ethanol) or 50 mM phosphate buffer pH 7.0 (0% scavenging tube) were added to 800 μl of the reaction mixture (90 μM xanthine, 16 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 22.8 μM NBT and 18 mM phosphate buffer, pH 7.0). The reaction started by adding 100 μl of xanthine oxidase (168 U/L). Finally, the optical densities at 295 and 560 nm were read to measure uric acid and O<sub>2</sub><sup>•–</sup>, respectively [29].

### 2.12. Data analysis

Results are expressed as mean±standard error of the mean (SEM). One way analysis of variance (ANOVA) was used for multiple comparisons among groups. Bonferroni post hoc test was performed. *P*<.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. atRA prevents body weight loss but not hyperglycemia in diabetic rats

Our first aim was to determine the effect of atRA on body weight and blood glucose in diabetic rats. As shown in Fig. 1A, atRA partially prevents loss of body weight compared with DBT group. Also, as shown in Fig. 1B, DBT+atRA group, showed similar blood glucose level compared to DBT group. atRA group showed similar body weight and blood glucose concentration compared to control group. These findings indicate that atRA improved body weight without affecting blood glucose levels.

### 3.2. atRA treatment improves diabetes-induced renal dysfunction and KIM-1 expression

Next, we analyzed the effect of atRA on renal and tubular dysfunction and tubular injury induced by diabetes. As shown in Fig. 1C, atRA significantly decreased proteinuria/creatinine ratio compared to DBT group. Increased natriuresis (Fig. 1D) and FeNa (Fig. 1E) return to control values when diabetic rats were treated with atRA. atRA group did not show differences compared to control group. To evaluate tubular injury, KIM-1 (a sensitive marker of tubular damage that is overexpressed when proximal tubule is injured), expression was assessed by confocal microscopy (Fig. 2A) and Western blot (Fig. 2B and C) in kidneys from the four experimental groups. We found that diabetes increased KIM-1 expression in proximal tubules (label of KIM-1 co-localized with Dppd, a marker of proximal tubular brush border), and that atRA significantly decreased KIM-1. atRA group had similar labeling of KIM-1 to that of control group. These findings suggest that atRA provided nephroprotective effects related to the preservation of renal morphology and function of diabetic animals.

### 3.3. atRA treatment does not have effect on glucose transporters expression

Renal glucose reabsorption is carried out in proximal tubules by SGLT2 and SGLT1 and by GLUT1 and GLUT2 [34]. We previously reported that expressions of SGLT1, SGLT2 and GLUT2 are increased while GLUT1 is decreased under diabetic conditions [8]. The next aim of this study was to explore the effect of atRA on glucose transporters expressions in proximal tubules. As shown in Fig. 3A–E, diabetes increased the expression of SGLT1, SGLT2 and GLUT2 and decreased expression of GLUT1, these changes were not attenuated by atRA. atRA group showed similar levels of glucose transporters compared to control group. These findings suggest that atRA does not affect the reabsorption of glucose in the proximal tubule of diabetic rats; this correlates with the fact that atRA did not improve hyperglycemia, which is the main factor that induces glucose transporters expression.

### 3.4. atRA treatment decreased oxidative stress of the diabetic kidney by increasing the expression of the transcription factor Nrf2 and the scavenging of ROS

We previously described increased renal oxidative stress in diabetic rats 21 days after STZ-injection [8]. We study whether atRA prevents oxidative stress; ROS production, lipid peroxidation, protein carbonylation and GSH content in the kidneys of the four experimental groups were measured. As shown, atRA decreased ROS production (Fig. 4A), lipid peroxidation (Fig. 4B) and protein carbonylation (Fig. 4C) and also increased GSH levels (Fig. 4D) in the diabetic rats. Also, protein tyrosine nitration was evaluated by assessing Western blot of 3-NT, as shown in Fig. 4E, atRA decreased diabetes-induced 3-NT, suggesting a protective antioxidant effect of atRA.

It has been described that compounds with antioxidant properties, can exert its effects by direct or indirect properties [35]. Compounds with direct antioxidant properties are able to scavenge ROS while its indirect



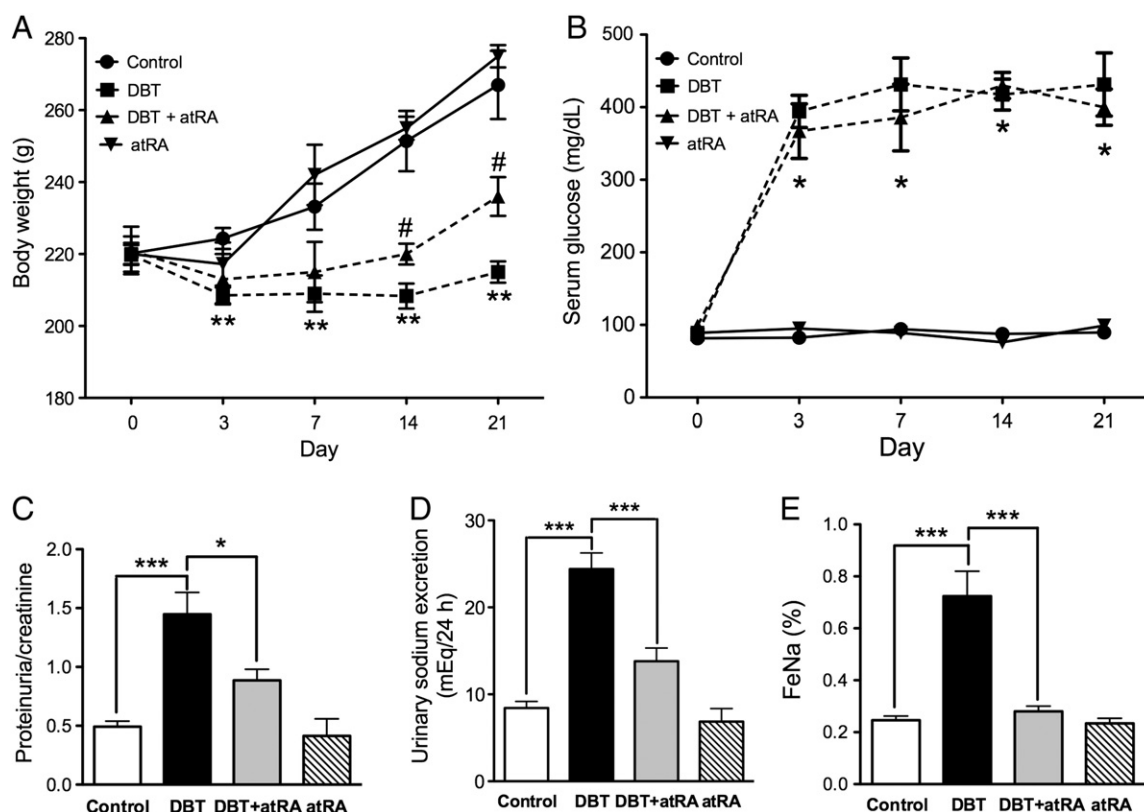


Fig. 1. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment ameliorated body weight loss, proteinuria, urinary sodium excretion and fractional excretion of sodium (FeNa) induced by diabetes. Body weight and blood glucose levels were monitored at 0, 3, 7, 14 and 21 days after streptozotocin (STZ)-injection. As shown in panel A, atRA prevented loss of body weight induced by diabetes. In contrast, atRA was unable to modify hyperglycemia induced by STZ administration (B). Diabetes-induced proteinuria was partially attenuated by atRA (C). Urinary sodium excretion (D) and FeNa (E) were increased 3 weeks after STZ-injection, atRA markedly decreased both, urinary sodium excretion and FeNa. No changes were found in atRA group compared to control rats. Data are mean  $\pm$  SEM from five to six rats per group. # $P < .05$  vs DBT group, and \*\* $P < .01$  vs control group (Panel A). \* $P < .05$  vs. control group (Panel B). \*\*\* $P < .001$ .

effects are mediated by the induction of Nrf2 transcription factor, which is involved in the transcription of a battery of antioxidant genes [35]. Compounds that possess both direct and indirect properties are named bifunctionals. Since atRA protects against diabetes-induced oxidative stress, next set of experiments were performed to evaluate whether atRA exerts direct, indirect or bifunctional antioxidant properties. As shown in Fig. 4F, diabetes significantly decreased renal Nrf2 levels (Fig. 4F and G), and atRA increased Nrf2 expression in diabetic rats. On the other hand, HO-1 expression (Fig. 4F and H) was evaluated because is a well-known enzyme whose expression is regulated by Nrf2 [35]. Accordingly, diabetic rats that showed decreased Nrf2 levels showed decreased HO-1 expression, atRA also improved HO-1 levels. These results suggest that atRA exerts indirect antioxidant properties. To evaluate direct antioxidant properties of atRA, *in vitro* scavenging capacity assays were performed. atRA was tested against next ROS:  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ , HOCl,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . As shown in Fig. 5, atRA was able to scavenge  $\text{ROO}^\bullet$  (Fig. 5A),  $^1\text{O}_2$  (Fig. 5B) and HOCl (Fig. 5C) with different  $\text{IC}_{50}$  values (Table 1), reference compounds used in every assay is also shown. Based on these data, atRA scavenges with higher affinity ROS in the next order:  $\text{ROO}^\bullet > ^1\text{O}_2 > \text{HOCl}$ . In contrast, atRA did not show scavenging capacity against  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Table 1). To our knowledge this is the first study that analyzes scavenging capacity of atRA. The results described above, suggest that atRA exerts bifunctional antioxidant properties.

### 3.5. atRA treatment decreased PKC $\beta$ 2-induced NADPH oxidase p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> subunits and diabetes-induced eNOS uncoupling

Other authors and we have described that under diabetic conditions increased PKC $\beta$ 2-dependent activation of NADPH oxidase

and eNOS uncoupling, constitutes the major source of ROS in the diabetic kidney [8,36]. Also, PKC $\beta$ 2 has been characterized as an activator of NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> subunits, by promoting the phosphorylation on serine residues of subunits involved in the membrane translocation and assembly of NADPH oxidase active complex, increasing  $\text{O}_2^{\bullet-}$  synthesis and oxidative stress [37]. To assess this point, Western blot analysis of PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> were performed in isolated proximal tubules. It was found that atRA significantly decreased PKC $\beta$ 2 (Fig. 6A and B), p47<sup>phox</sup> (Fig. 6A and C) and gp91<sup>phox</sup> (Fig. 6A and D) expressions, suggesting that atRA decreased NADPH oxidase active complex. Also, diabetes decreased eNOS dimer-to-monomer ratio, and atRA improved these changes (Fig. 6E and F). In the same fashion, atRA improved total eNOS expression (Fig. 6G and H). Although total eNOS is increased, the dimers of eNOS (the catalytically active form [38]) are decreased under diabetic conditions, which is consistent with the finding that diabetes decreased urinary excretion of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  (used as markers of NO synthesis) and atRA improved NO levels (Fig. 6I). The findings described above suggest a protective role of atRA against diabetes-induced eNOS uncoupling.

### 3.6. atRA treatment improved claudin-2 and occludin expressions in proximal tubules and claudin-5 in glomeruli but not claudins-4 and -8 expressions in distal tubules

We previously reported the association between increased oxidative stress and the loss of renal TJ proteins in diabetic rats [8]. As described above, atRA decreased oxidative stress, PKC $\beta$ 2 expression and eNOS uncoupling. To test whether oxidative stress is involved

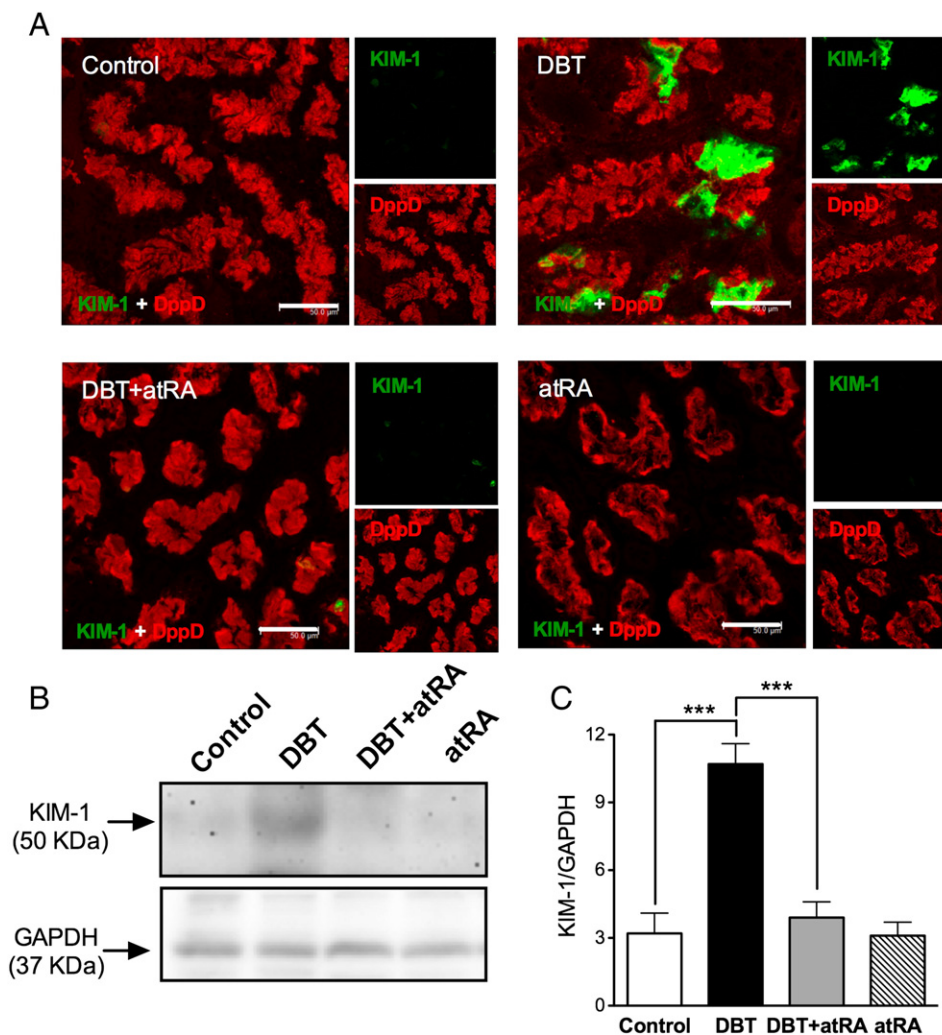


Fig. 2. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment improved kidney injury molecule (KIM)-1 overexpression in diabetic rats. (A) Immunofluorescence analysis shows that 3 weeks after diabetes induction, increased KIM-1 expression (green label) was found in proximal tubular cells, atRA decreased KIM-1 label in proximal tubule. Dipeptidylpeptidase (DppD)-IV (red label) was used as a marker of proximal tubules. (B) Western blots from renal cortex homogenates of KIM-1 in the four experimental groups was studied, DBT+atRA group showed decreased KIM-1 compared to DBT group, GAPDH was used as loading control. (C) Densitometric analysis of Western blots from the four experimental groups are shown. No changes were found in atRA group compared to control rats. Data are mean±S.E.M. from five to six rats per group. \*\*\**P*<.001.

in the loss of TJ proteins, we analyzed the effect of atRA on the expression of TJ proteins. Immunofluorescence and Western blot assays of claudins-2, -5 and occludin, and Western blot of claudins-4 and -8 were performed. As shown, atRA improved claudin-2 (Fig. 7A), claudin-5 (Fig. 7B) and occludin (Fig. 7C) expressions evaluated by immunofluorescence. In a similar fashion, Western blot analysis of claudin-2 (Fig. 7D and E) and occludin (Fig. 7D and F) from isolated proximal tubules, and claudin-5 (Fig. 7D and G) from isolated glomeruli, showed that atRA improved TJ proteins. In contrast, Western blots of claudins-4 and -8 (Fig. 7H-J) from isolated distal tubules showed that diabetes induced the expression of claudins-4 and -8 and that atRA did not have effect.

### 3.7. Diabetes-induced nitration, serine phosphorylation and SUMOylation of claudin-2 were improved by atRA treatment

As described above, atRA improved claudin-2 levels, which may be associated with decreased oxidative stress. However, until now, direct evidence about the effect of atRA on claudin-2 is missing. To explore this point, claudin-2 was immunoprecipitated from isolated proximal tubules

of the four experimental groups. As shown in Fig. 8A and B, atRA improved claudin-2 nitration and expression induced by diabetes (Fig. 7A, D and E) suggesting that nitration of this protein is related to its increased degradation and that atRA maintains claudin-2 expression by inhibiting its nitration. However, additional mechanisms may be involved in diabetes-induced loss of claudin-2; it is known that phosphorylation of TJ components by conventional PKC isoforms participates in junctional disassembly [39]. In the immunoprecipitation assays of claudin-2, we found increased phosphorylation of this protein in serine residues (Fig. 8C), together with increased co-immunoprecipitation with PKC $\beta$ 2 (a conventional PKC isoform) (Fig. 8E), suggesting that this kinase interacts directly with claudin-2 inducing its phosphorylation on serine residues and in consequence mislocalizes claudin-2 of the TJ strands under diabetic conditions. In agreement with the findings described above, atRA decreases PKC $\beta$ 2 expression, and as found, claudin-2 co-immunoprecipitation and serine phosphorylation were also decreased with atRA (Fig. 8C-F). Van Itallie et al. analyzed C-terminal cytoplasmic tail of human claudin-2, and its interaction with proteins that regulates its function [40]. The results suggest that claudin-2 is a substrate for SUMOylation, leading to decrease of claudin-2 levels. Based on the

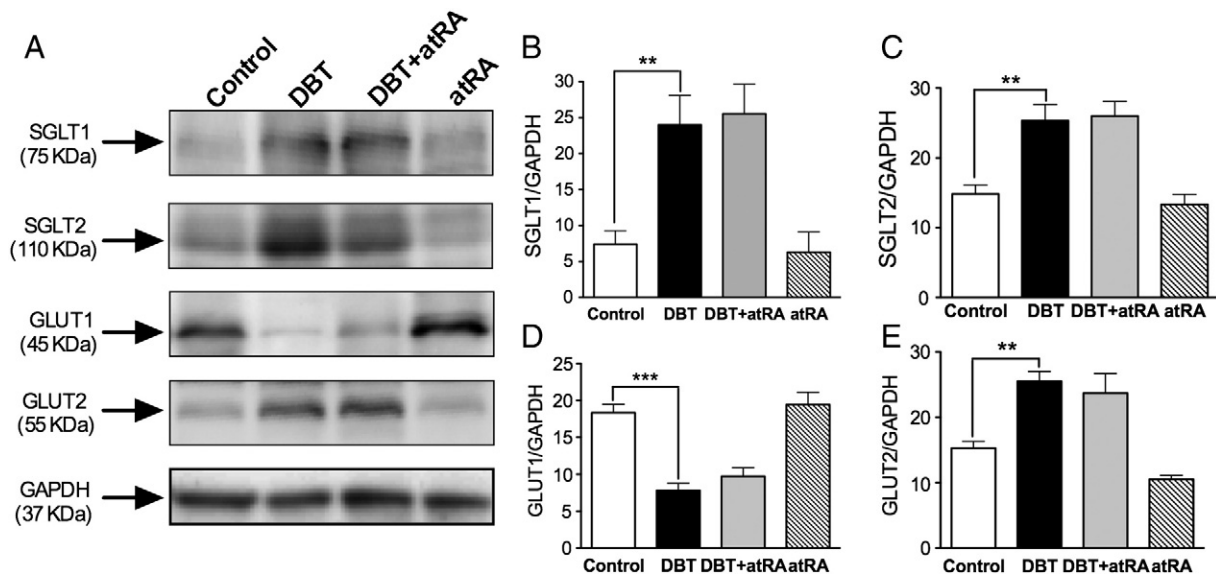


Fig. 3. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment did not have effect on glucose transporters expression in the proximal tubule. (A) Western blot analysis from sodium-glucose cotransporters (SGLT1 and 2) and facilitative glucose transporters (GLUT1 and 2) were performed in the four experimental groups studied. As shown, atRA did not have effect on the increased expressions of SGLT1 and 2 and GLUT 2 and the decreased expression of GLUT1 induced by diabetes. GAPDH was used as loading control. Densitometric analysis of (B) SGLT1, (C) SGLT2, (D) GLUT1 and (E) GLUT2 in the four experimental groups are shown. Data are mean±SEM from three to four rats per group. \*\* $P<.01$  and \*\*\* $P<.001$ .

findings described above, we aimed to analyze whether claudin-2 can be SUMOylated *in vivo* under diabetic conditions. As shown in Fig. 8G and H, diabetes induced claudin-2 interaction with small ubiquitin modifier (SUMO)-1 protein, indicating that increased SUMOylation of claudin-2 occurs. atRA decreased SUMOylation of claudin-2 which may be associated with the improvement of claudin-2 levels. To our knowledge this is the first report that describes that SUMOylation of claudin-2 occurs *in vivo* in diabetes.

#### 4. Discussion

Our group previously reported that damage to renal TJ proteins occurs in initial DN, those alterations included: decreased expression of claudin-5 in glomeruli, claudin-2 and occludin in proximal tubules, and increased expressions of claudins-4 and -8 in distal tubules. Loss of claudins and occludin occurred in renal sections where oxidative stress was induced by a PKC $\beta$ 2 and eNOS uncoupling dependent pathways. In contrast, in the distal tubules where oxidative stress was less severe; increments in claudins-4 and -8 expressions were found. The purpose of this study was to explore whether those alterations in TJ proteins might be ameliorated by atRA (a derivative from vitamin A) in an oxidative stress-dependent way. Since it has been described that oxidative stress induces an alteration on the redox status of proteins of TJ (for review see [41]), studies should be designed to correlate oxidative stress to increased epithelial and endothelial permeability and to decreased expression levels of occludin, claudins and ZO proteins.

In this study, the role of atRA in DN was analyzed based on the current knowledge of its role in nephrogenesis, development and cellular maintenance and differentiation of the kidney [16,17,42].

Vitamin A can be provided from the cleavage of provitamin A carotenoids (of vegetal origin) in the small intestine or by consumption of preformed vitamin A (retinyl palmitate) in food of animal origin. In humans, another non-negligible and increasingly frequent source of vitamin A over the last 20 years has been food supplements and/or enriched food in industrialized countries [43]. Excess or deficiency of atRA has adverse effects, such as abnormal fetal

development and disruptions in regulation of energy balance [44]. Importantly, decreased renal levels of atRA in the diabetic mouse kidney have been described [45]. In this study, authors described that retinoic acid metabolism is significantly dysregulated in diabetic kidneys, and suggest that a shift in atRA metabolism is a novel feature in diabetic renal disease. This finding suggests that if endogenous atRA levels are decreased, exogenous treatment with this retinoid may improve diabetic kidney metabolism. In this study, although rats were fed with a diet that contains 15 IU/mg of vitamin A (a precursor of atRA), we administered exogenous atRA at a dose of 1 mg/kg of body weight daily, which did not show adverse effects. So, the results found herein must be interpreted in light of the dietary supply of vitamin A.

Previous studies describe that atRA improved renal inflammatory response and proteinuria of diabetic rats treated with STZ by decreasing MCP-1 up-regulation [21], and its potential and nephroprotective properties have been assessed [19,46–51]. Herein we started atRA treatment 3 days after STZ-injection, at this time hyperglycemia was established (Fig. 1A), atRA treatment continued daily until sacrifice (21 days after STZ-injection). atRA did not have effect on blood glucose levels, but significantly improved loss of body weight induced by diabetes, suggesting that atRA might improve the general state of the diabetic rats independently of blood glucose levels.

The results of proteinuria, natriuresis and FeNa (Fig. 1), reinforce the vision of atRA acting as a nephroprotector against diabetes-induced renal dysfunction. In agreement with these findings, tubular injury evaluated by KIM-1 expression was reduced by atRA. As shown in Fig. 3, atRA did not have effect on increased expressions of SGLT1, SGLT2 and GLUT2 and decreased expression of GLUT1 induced by diabetes in proximal tubules, which agrees with the fact that hyperglycemia, is the stimulus that induces glucose transporters expressions, which was not improved by atRA.

Some studies have suggested that atRA has antioxidant properties [20]; to assess this point, oxidative stress markers were evaluated. As shown in Fig. 4, atRA attenuates ROS production, lipid peroxidation, protein carbonylation and 3-NT of diabetic rats. Consistently, the decrease in GSH levels was ameliorated in diabetic rats treated with

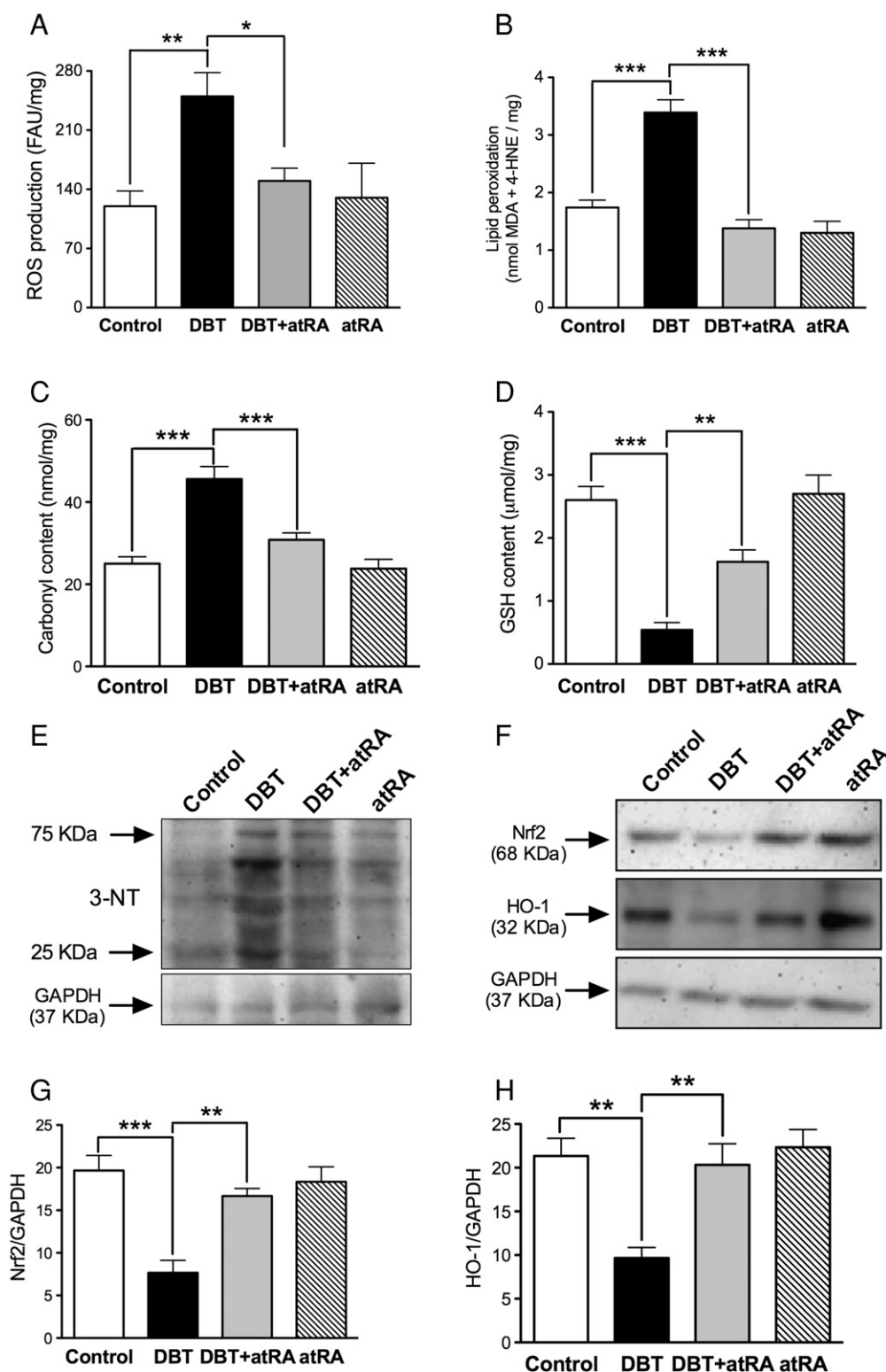


Fig. 4. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment ameliorated oxidative stress in diabetic rats. As shown in panels A–D, atRA decreased renal oxidative stress induced by diabetes, evaluated by (A) reactive oxygen species (ROS) production; (B) lipid peroxidation by measuring MDA and 4-HNE; (C) protein carbonylation and (D) GSH content. Protein tyrosine nitration was evaluated by Western blot analysis of 3-nitrotyrosine (NT), as shown in panel E, diabetes-induced 3-NT was ameliorated by atRA, as shown by several bands between 25 and 75 KDa. Also, Nrf2 and HO-1 expressions were performed by Western blot. As shown in panel F, diabetes-induced decrease in renal Nrf2 and HO-1 expressions were significantly ameliorated by atRA. Densitometric analysis is shown in panels G and H. atRA alone did not have effect on oxidative stress markers. GAPDH was used as loading control. atRA group did not have effect on oxidative stress markers. Data are mean  $\pm$  SEM from five to six rats per group. FAU, fluorescence arbitrary units; MDA, malondialdehyde; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; GSH, reduced glutathione; 3-NT, 3-nitrotyrosine; Nrf2, nuclear factor-erythroid-2-related factor 2; HO-1, heme oxygenase-1. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$ .

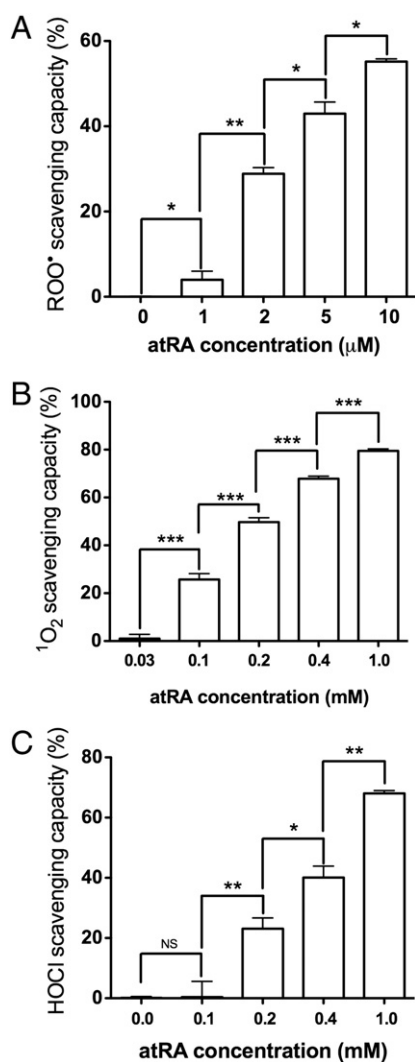


Fig. 5. *In vitro* scavenging capacity of all-*trans* retinoic acid (atRA). *In vitro* assays were performed to evaluate atRA scavenging capacity against reactive oxygen species (ROS). As shown, atRA scavenges in a concentration-dependent manner (A) peroxy radicals (ROO•), (B) singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), and (C) hypochlorous acid (HOCl). Data are mean±SEM from 4 independent assays. \**P*<.05, \*\**P*<.01 and \*\*\**P*<.001. NS, non-significant.

atRA. These findings suggest a strong antioxidant effect of atRA in diabetic kidney. However, antioxidants can be classified as direct, indirect or bifunctionals based on its ability to induce Nrf2 transcription factor, to scavenge ROS or both [35]. In this study, Nrf2 and HO-1 expressions were explored to assess indirect antioxidant properties of atRA. It was found that diabetes decreased Nrf2 and its target protein HO-1; this latter is regarded as an antioxidant enzyme. In agreement with the findings described above, atRA improved Nrf2 and HO-1 levels. However, it is interesting to remark that in the group treated with atRA alone, no changes in Nrf2 and HO-1 levels were found, compared to

control group, suggesting that atRA induces both proteins under oxidative stress but not under normal conditions.

To explore a possible role of atRA as a direct antioxidant, *in vitro* scavenging capacity assays were performed. atRA scavenges ROO•, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and HOCl in a concentration-dependent manner, and based on IC<sub>50</sub> values has a higher affinity for ROO•, this is in agreement with a previous report showing that retinoids scavenges this radical [52]. In contrast, we were unable to find scavenging ability of atRA against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •OH, ONOO<sup>-</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. In conclusion, atRA might be considered as a bifunctional antioxidant. This characteristic augments its beneficial effect on the initial alterations of DN.

Previously, we reported that diabetes induced PKCβ2 expression in glomeruli and proximal tubules but not in distal tubules [8]. Herein we decided to analyze PKCβ2 expression in isolated proximal tubules and additionally NADPH subunits p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> were also studied. atRA decreased PKCβ2 expression and consequently p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup>, which have been described as substrates of PKC phosphorylation [37]. PKC induces NADPH subunits phosphorylation promoting the assembly of the active complex in the cell membrane, increasing O<sub>2</sub><sup>•-</sup> production and oxidative stress [37].

eNOS uncoupling is an additional factor that promotes oxidative stress in diabetes. Accordingly, we decided to evaluate the effect of atRA on eNOS uncoupling. As previously reported, diabetes induces eNOS uncoupling, under this condition eNOS dimers are dissociated and monomers are increased, producing O<sub>2</sub><sup>•-</sup> instead of NO; as a result decreased bioavailability of NO is found, which might be an additional mechanism of endothelial dysfunction observed in diabetes [53]. As shown in Fig. 6, atRA improved diabetes-induced eNOS uncoupling, showed by decreased eNOS dimers and NO levels and increased eNOS monomers and total eNOS expression. It is important to note that although total eNOS expression is induced, eNOS dimers are decreased in diabetes, which agrees with previous reports [8]. These findings provide evidence for a beneficial effect of atRA on eNOS enzyme.

The findings above described suggest that atRA inhibits oxidative stress by: a) inducing Nrf2 transcription factor, b) scavenging ROS, c) inhibiting PKCβ2 and in consequence the assembling of NADPH oxidase active complex and d) ameliorating eNOS uncoupling.

Once we described the mechanisms involved in the antioxidant effect of atRA against diabetes-induced oxidative stress, we aimed to explore the impact of atRA on TJ proteins expressions. As shown in Fig. 7, atRA improved claudin-5 in glomeruli and claudin-2 and occludin in proximal tubules, which might be closely associated with the prevention of oxidative stress. As previously reported [8], proteinuria was associated with loss of claudin-5, herein we found that atRA improved claudin-5 levels and proteinuria, suggesting a possible association of both phenomena. In a similar way, atRA improved claudin-2 levels, natriuresis and FeNa. As reported, claudin-2, acts as a sodium and water channel in the renal proximal tubule [10,11], and reabsorbs almost one-third of the filtered sodium through the paracellular pathway; its loss decreases sodium reabsorption and increases natriuresis [10]. The effect of atRA on claudin-2 levels might be closely related to renal sodium handling because decreased natriuresis and FeNa compared to diabetic group was found. However, in the group treated with atRA alone, no effect was observed on

Table 1

*In vitro* scavenging capacity of all-*trans*-retinoic acid (atRA) and reference compounds.

ROS	ROO•	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	HClO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	•OH	ONOO <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Scavenging capacity	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative
atRA IC <sub>50</sub> (mM)	0.0077±0.0006	0.23±0.004	0.54±0.04	ND	ND	ND	ND
RC	Trolox	Lipoic acid	Vitamin C	Pyruvate	DMTU	Penicillamine	NDGA
RC IC <sub>50</sub> (mM)	0.0035±0.0004	2.80±0.18	0.64±0.04	2.5±0.009	25±5.9	6.77±1.74	0.6±0.06

Data are expressed as mean±SEM from 4 independent experiments. ROS, reactive oxygen species; ROO•, peroxy; <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, singlet oxygen; HClO, hypochlorous acid; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; •OH, hydroxyl; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide; ND, not determined; RC, reference compound; DMTU, dimethylthiourea; NDGA, nordihydroguaiaretic acid.

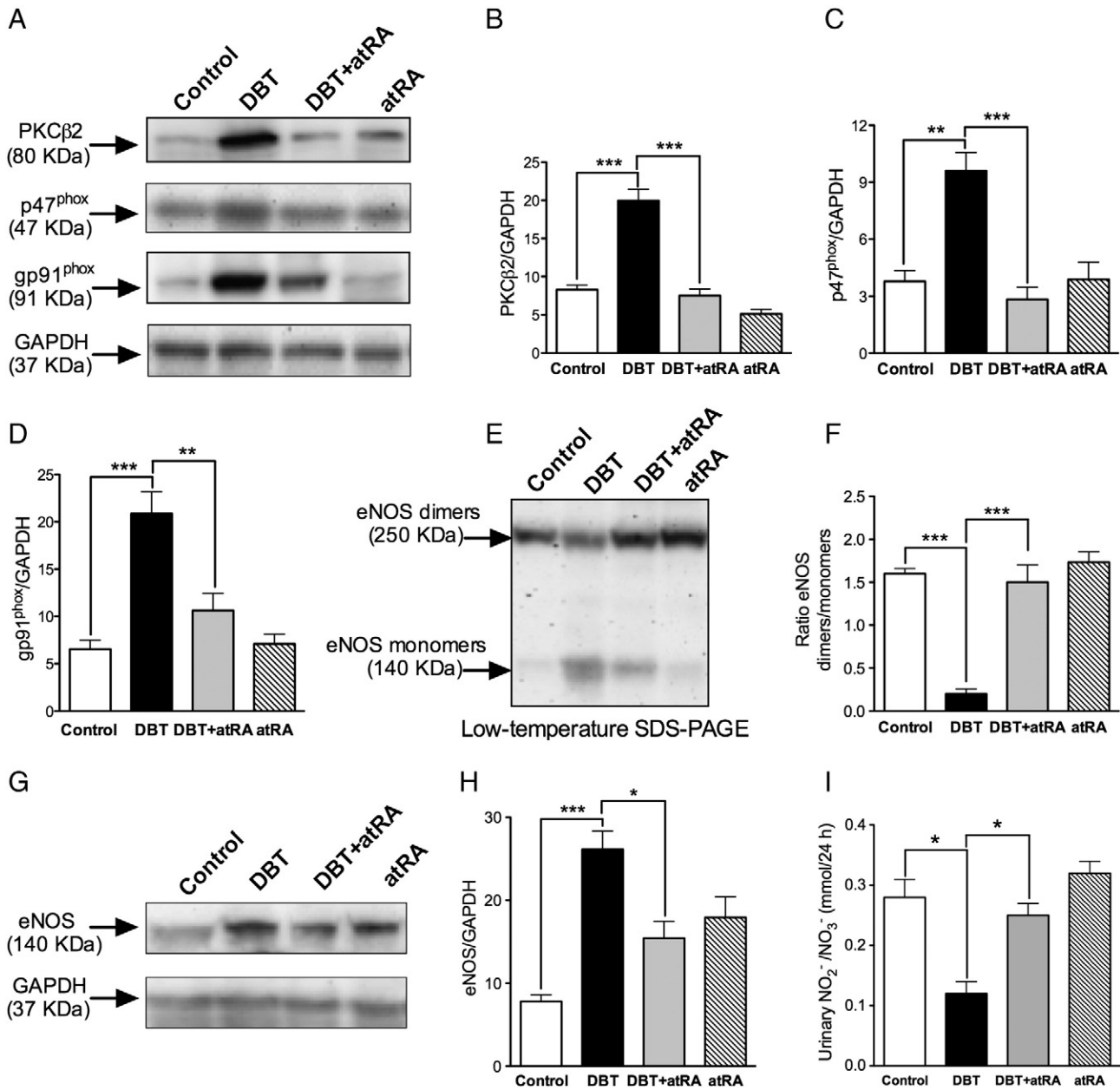


Fig. 6. All-*trans* retinoic acid (atRA) decreased diabetes-induced PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> expressions and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling. Western blot analysis of PKC $\beta$ 2, NADPH oxidase subunits p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> and eNOS in the four experimental groups were performed. As shown in panel A, diabetes induced the expression of PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup>. atRA prevented those changes. Densitometric analysis of (B) PKC $\beta$ 2, (C) p47<sup>phox</sup> and (D) gp91<sup>phox</sup> shows that atRA significantly ameliorated diabetes-induced expressions of PKC $\beta$ 2, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup>. Also, eNOS dimer-to-monomer ratio was assessed to explore eNOS uncoupling. As shown by low temperature SDS-PAGE and Western blot, diabetes decreased eNOS dimer and increased eNOS monomer (panel E). atRA improved eNOS uncoupling by increasing eNOS dimers (panels E and F). Western blot from total eNOS expression showed that diabetes-induced eNOS expression was ameliorated by atRA (G). Densitometric analysis is shown in panel H. Urinary nitrate (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrite (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) excretion was performed to evaluate nitric oxide (NO) synthesis, decreased NO levels induced by diabetes was improved by atRA (I). atRA group was similar to control group. GAPDH was used as loading control. Data are mean $\pm$ SEM from three to four rats per group. \**P*<.05, \*\**P*<.01, and \*\*\**P*<.001.

claudins expression, suggesting that oxidative stress might regulate claudins and that under this condition atRA prevents loss of TJ proteins by attenuating oxidative stress but not by inducing renal TJ proteins under normal conditions. In contrast, in distal tubules, atRA did not have effect on claudins-4 and -8 expressions, suggesting that atRA does not have effect on distal nephron; this might be due to the absence of RAR and RXR receptors in the distal nephron. Although it has been reported that increased endogenous retinoic acid activity exists in principal cells and intercalated cells of the mouse collecting duct system after birth and persists into adulthood [54] and despite it has been reported mRNAs levels for RXR receptors in immortalized

distal convoluted tubule cells by RT-PCR [55]. Nevertheless, the expression of RXR and RAR receptors at the protein levels in distal and connecting tubules has not been explored yet. These findings suggest that increased expression of claudins-4 and -8 induced by diabetes in the distal nephron may be regulated by different mechanisms such as aldosterone signaling [56–58].

In order to explore the direct effect of atRA on claudin-2 expression, immunoprecipitation assays of claudin-2 from isolated proximal tubules were performed. As previously reported [8] and shown herein, diabetes induced claudin-2 nitration and atRA decreased tyrosine nitration of this protein which is related to the

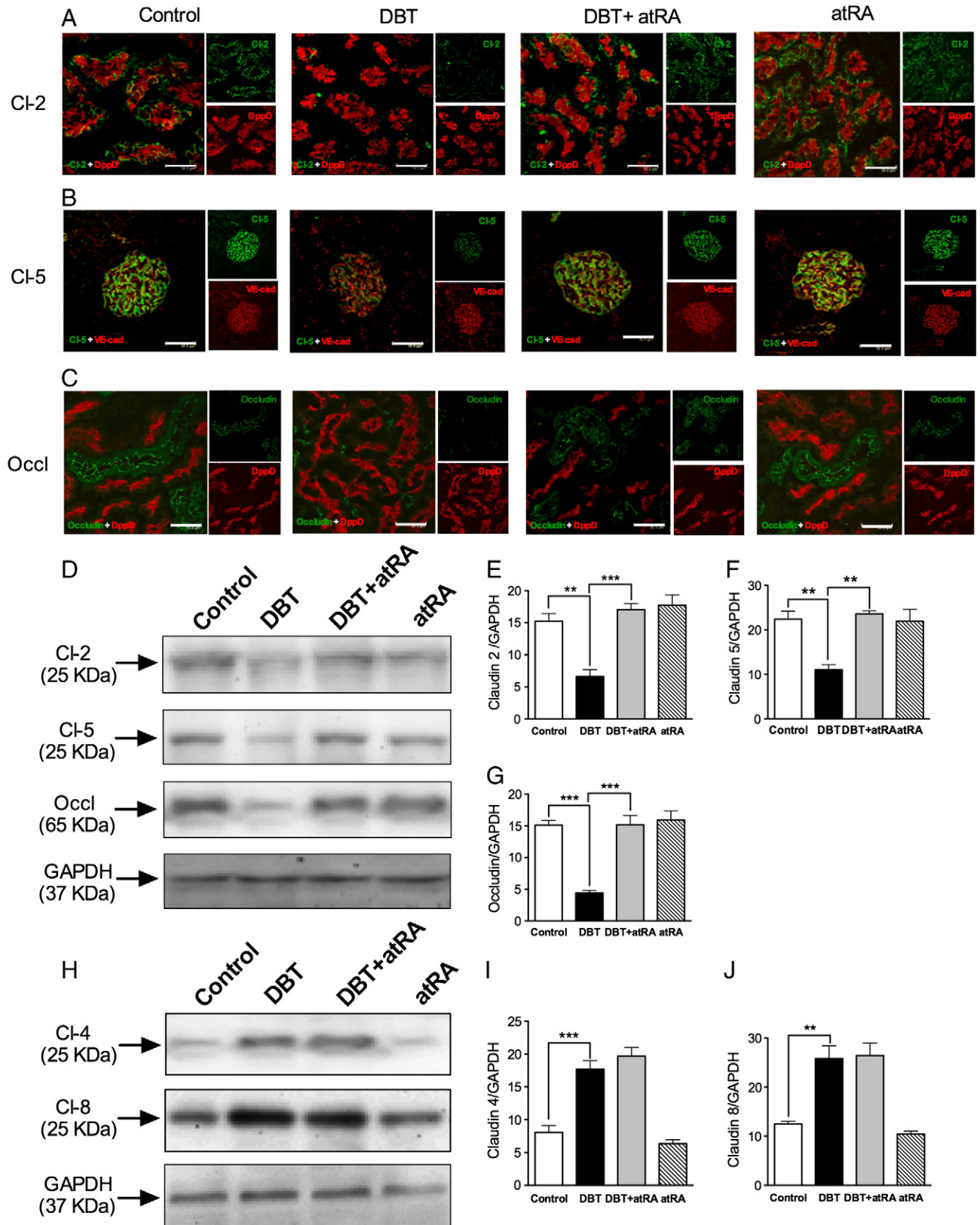


Fig. 7. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment prevented diabetes-induced loss of claudins-2, -5 and occludin but not claudins-4 and -8. Western blot and immunofluorescence analysis were performed to evaluate the effect of atRA on renal tight junction (TJ) proteins. Claudin-2 (Cl-2) (green label, panel A), claudin-5 (Cl-5) (green label, panel B) and occludin (Occl) (green label, panel C) in renal sections of control, diabetes (DBT), DBT+atRA, and atRA groups is shown, atRA prevented diabetes-induced loss of Cl-2 and occludin in proximal tubules (A and C) and Cl-5 (B) in glomeruli. Dipeptidylpeptidase-IV (DppD, red label) was used as a marker of proximal tubules and vascular endothelial cadherin (VE-Cad, red label) was used as a marker of glomerular capillaries. Bars=50  $\mu$ m. Western blot analysis of claudins-2, -4, -5, -8 and occludin is shown in panels D and H. As shown, atRA significantly improved diabetes-induced loss of cl-2, cl-5 and occl (D). Densitometric analysis is shown in panels E-G. In contrast, atRA did not have effect on diabetes-induced overexpression of cl-4 and cl-8 in distal tubules (H). Densitometric analysis is shown in panels I and J. atRA group was similar to control group. GAPDH was used as loading control. Data are mean  $\pm$  SEM from three to four rats per group. \*\* $P$ <.01 and \*\*\* $P$ <.001.

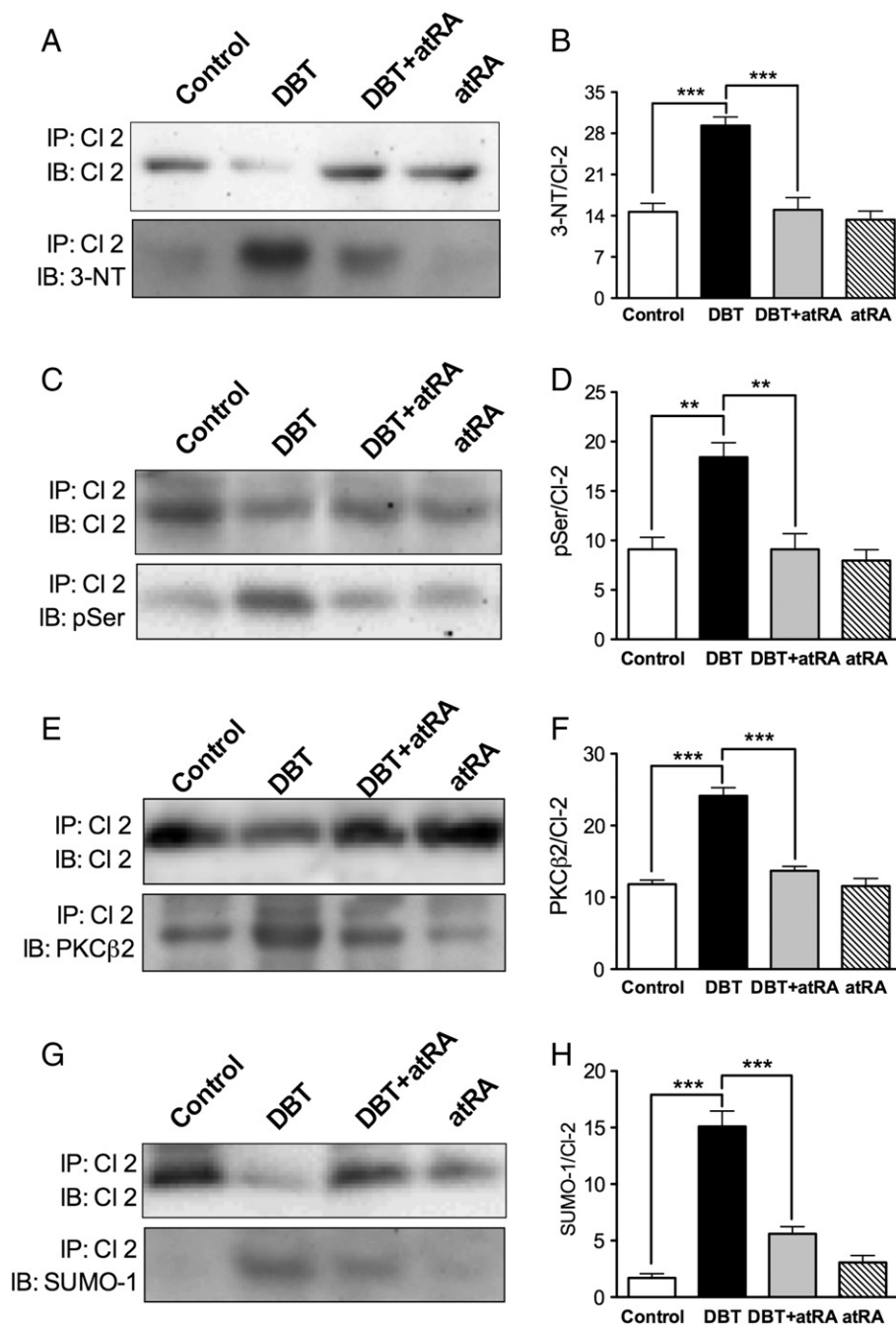


Fig. 8. All-*trans* retinoic acid (atRA) treatment ameliorated diabetes-induced claudin-2 nitration, serine phosphorylation and SUMOylation. In order to explore posttranslational modifications induced by diabetes on claudin-2 (Cl-2) and the effect of atRA, immunoprecipitation of Cl-2 from isolated proximal tubules in the four experimental groups studied was performed. Nitration (3-NT), serine phosphorylation (pSer) and SUMOylation of claudin-2 were explored. As shown in panel A, diabetes-induced nitration of claudin-2 was improved by atRA (B). Increased serine phosphorylation of Cl-2 was found under diabetic conditions (C), atRA ameliorated phosphorylation of Cl-2 in serine residues (D). Also, PKCβ2 co-immunoprecipitate with Cl-2 under diabetic condition (E), atRA decreased PKCβ2 association with Cl-2 (F). SUMOylation of Cl-2 was also explored; diabetes increased Cl-2 SUMOylation by inducing the association of Cl-2 with SUMO-1 (G), atRA decreased diabetes-induced Cl-2 SUMOylation (H). Densitometric analysis of (B) 3-NT, (D) pSer, (F) PKCβ2 and (H) SUMO-1 is shown. atRA group was similar to control group. Immunoprecipitation with an unrelated antibody was used as negative control. Representative images of three different experiments are shown. Data are mean±SEM from 3 different experiments per group. \*\* $P<.01$  and \*\*\* $P<.001$ . 3-NT, 3-nitrotyrosine; SUMO-1, small ubiquitin modifier-1.

preservation of protein levels. Since increased  $O_2^{\bullet-}$  production induces ONOO<sup>-</sup> synthesis, which is the ROS that nitrates target proteins [59], here we suggest that atRA reduces ONOO<sup>-</sup> levels by decreasing  $O_2^{\bullet-}$  production by attenuating NADPH oxidase activity and eNOS uncoupling, but not by a direct scavenging of this ROS, because of its incapacity to scavenge  $O_2^{\bullet-}$ .

Diabetes induces PKCβ2 expression and it is known that conventional PKC isoforms participate in junctional disassembly, while novel

isoforms regulate junction formation [39]. Therefore, we analyze the phosphorylation state of claudin-2. It was found that diabetes increased serine phosphorylation of claudin-2 that might be mediated by PKCβ2, because an increased co-immunoprecipitation of both proteins was found under diabetic conditions. atRA reduced claudin-2 phosphorylation probably by decreasing PKCβ2 expression. This finding provide an additional mechanism through which atRA prevents loss of claudin-2 and its disassembly from the TJ strands.



Claudins function including, barrier properties, assembly, trafficking and half-lives may be regulated by posttranslational modifications or through binding of other proteins to their C-terminal cytoplasmic sequences. Van Itallie et al. [40] using a yeast two-hybrid (Y2H) screening with the C-terminal tail of human claudin-2 demonstrated that this protein might be modified by SUMO-1 protein, a change like ubiquitination which decreased claudin-2 levels *in vitro*. However, authors were unable to demonstrate SUMOylation *in vivo*. Herein we explored *in vivo* SUMOylation of claudin-2; we found that diabetes induces claudin-2 SUMOylation that might be related to its decreased level. atRA improved claudin-2 levels by decreasing SUMOylation and degradation of this protein. To our knowledge this is the first time that *in vivo* SUMOylation of claudin-2 is described and that this occurs in diabetes.

In conclusion, our results demonstrate that atRA reduced loss of claudin-2 and occludin in proximal tubules and claudin-5 in glomeruli by decreasing oxidative stress. Improvements of claudin-2 and -5 levels were associated with improvement of natriuresis and proteinuria, respectively. atRA prevented loss of claudin-2 by decreasing its nitration, serine phosphorylation and SUMOylation. However, atRA did not have effect on increased expressions of claudins-4 and -8 in distal tubules. These findings suggest that this compound might be a potential nephroprotective agent against glomerular and tubular dysfunctions in early stages of DN.

## Disclosure

All the authors declared no competing interests.

## Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico (Grant 0179870 to JLR and 224642 and PAPIIT IN210713 to JPCH). EMJ is a recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (255413).

## References

- Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, Louis TA, Solid CA, Ebben JP, et al. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3736–41.
- Najafian B, Mauer M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;83:1–8.
- Komers R, Cooper ME. Renal sodium handling in experimental diabetes: role of NO. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:2170–7.
- Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol* 2012;74:351–75.
- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 2013;93:137–88.
- Stanton RC. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep* 2011;11:330–6.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S227–32.
- Molina-Jijón E, Rodríguez-Munoz R, Namorado Mdel C, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2014;72:162–75.
- Hou J, Rajagopal M, Yu AS. Claudins and the kidney. *Annu Rev Physiol* 2013;75:479–501.
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:875–86.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010;123:1913–21.
- Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, et al. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res* 2011;343:637–48.
- Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, et al. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 1997;73:222–31.
- Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, et al. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 2000;57:2386–402.
- Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, et al. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55:894–900.
- Merlet-Benichou C, Vilar J, Lelievre-Pegorier M, Gilbert T. Role of retinoids in renal development: pathophysiological implication. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:39–43.
- Vilar J, Gilbert T, Moreau E, Merlet-Benichou C. Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. *Kidney Int* 1996;49:1478–87.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940–54.
- Wagner J, Dechow C, Morath C, Lehrke I, Amann K, Waldherr R, et al. Retinoic acid reduces glomerular injury in a rat model of glomerular damage. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1479–87.
- Nishimura C, Kuriyama K. Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats: effect of vitamin A administration. *Jpn J Pharmacol* 1985;37:365–72.
- Han SY, So GA, Jee YH, Han KH, Kang YS, Kim HK, et al. Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy. *Immunol Cell Biol* 2004;82:568–76.
- Rong J, Liu S. Effect of all-trans retinoic acid on the barrier function in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407:605–9.
- Arreola-Mendoza L, Reyes JL, Melendez E, Martin D, Namorado MC, Sanchez E, et al. Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* 2006;218:237–46.
- Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 2002;62:476–87.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 2002;109:817–26.
- Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, Calderon-Salinas JV, et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol Lett* 2009;191:279–88.
- Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barron ZL, Hernandez-Pando R, et al. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1543–57.
- Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Floriano-Sanchez E, Santamaria A, et al. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 2007;229:123–35.
- Cervantes MI, de Oca Balderas PM, de Jesus Gutierrez-Banos J, Orozco-Ibarra M, Fernandez-Rojas B, Medina-Campos ON, et al. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chem* 2013;140:343–52.
- Van Antwerpen P, Neve J. In vitro comparative assessment of the scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxamic and sulfoanilide families. *Eur J Pharmacol* 2004;496:55–61.
- Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:605–9.
- Gaona-Gaona L, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernandez-Pando R, Calderon-Oliver M, et al. Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 2011;286:20–7.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo S. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food Chem Toxicol* 2007;45:622–7.
- Bailey CJ. Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:63–71.
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(Suppl 1):S128–38.
- Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F1144–52.
- Deng B, Xie S, Wang J, Xia Z, Nie R. Inhibition of protein kinase C beta(2) prevents tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and oxidative stress in endothelial cells: the role of NADPH oxidase subunits. *J Vasc Res* 2012;49:144–59.
- Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708–14.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:729–56.
- Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. SUMOylation of claudin-2. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:60–4.
- Gonzalez-Mariscal L, Quiros M, Diaz-Corangué M. ZO proteins and redox-dependent processes. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1235–53.
- Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 2008;9:541–53.
- Sauvant P, Fearat C, Atgie C. Vitamin A supply to mothers and children: challenges and opportunities. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15:310–4.

- [44] Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 2006;83:191–201.
- [45] Starkey JM, Zhao Y, Sadygov RG, Haidacher SJ, Lejeune WS, Dey N, et al. Altered retinoic acid metabolism in diabetic mouse kidney identified by O isotopic labeling and 2D mass spectrometry. *PLoS One* 2010;5:e11095.
- [46] Liebler S, Uberschar B, Kubert H, Brems S, Schnitger A, Tsukada M, et al. The renal retinoid system: time-dependent activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F458–65.
- [47] Wagner J. Potential role of retinoids in the therapy of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:441–4.
- [48] Oseto S, Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Ando A, et al. Therapeutic effect of all-trans retinoic acid on rats with anti-GBM antibody glomerulonephritis. *Kidney Int* 2003;64:1241–52.
- [49] Hu P, Qin YH, Pei J, Lei FY, Hu B, Lu L. Beneficial effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on glomerulosclerosis rats via the down-regulation of the expression of alpha-smooth muscle actin: a comparative study between ATRA and benazepril. *Exp Mol Pathol* 2010;89:51–7.
- [50] Schaier M, Liebler S, Schade K, Shimizu F, Kawachi H, Grone HJ, et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid X receptor specific agonists reduce renal injury in established chronic glomerulonephritis of the rat. *J Mol Med* 2004;82:116–25.
- [51] Moreno-Manzano V, Mampaso F, Sepulveda-Munoz JC, Alique M, Chen S, Ziyadeh FN, et al. Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br J Pharmacol* 2003;139:823–31.
- [52] Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 1999;26:746–61.
- [53] Gilbert RE. The endothelium in diabetic nephropathy. *Curr Atheroscler Rep* 2014;16:410.
- [54] Wong YF, Kopp JB, Roberts C, Scambler PJ, Abe Y, Rankin AC, et al. Endogenous retinoic acid activity in principal cells and intercalated cells of mouse collecting duct system. *PLoS One* 2011;6:e16770.
- [55] Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, Friedman PA. Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem* 1998;8:261–77.
- [56] Le Moellic C, Boulkroun S, Gonzalez-Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, et al. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C1513–21.
- [57] Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, et al. Na<sup>+</sup>-absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:45–50.
- [58] Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, et al. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4690–4.
- [59] Daiber A, Daub S, Bachschmid M, Schildknecht S, Oelze M, Steven S, et al. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications. *Int J Mol Sci* 2013;14:7542–70.

## Protective effects of Retinoic acid on Streptozotocin-induced Type I Diabetes

Eduardo Molina-Jijón, Rafael Rodríguez-Muñoz, and José L. Reyes\*

Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), México D. F., 07360, Mexico

\*Correspondence author: José L. Reyes, MD, PhD. Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies, National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), Mexico D. F., 07360, Mexico, Phone: +55 5747 3962/3800/5147/5723, Fax: + 55 5747 3754, E-mail:

jreyes@fisio.cinvestav.mx

Rec date: 04 Apr 2014, Acc date: 26 July 2014, Pub date: 28 July 2014

Copyright: ©2014 Molina-Jijón, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

All-trans-retinoic (atRA) acid is a biologically active derivative of vitamin A that regulates numerous physiological processes through its interaction with nuclear retinoid receptor proteins, termed as retinoid acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXR). Retinoid signaling is diverse and its role in embryonic development, adult growth and development, maintenance of immunity and epithelial barriers, and vision has been elucidated. An increased body of evidence suggests that altered metabolism of retinoic acid under experimental type-1 diabetes conditions induced with streptozotocin (STZ) is related to insulin deficiency. In several experimental approaches the role of atRA treatment in STZ-induced diabetes has been tested. This review summarizes current knowledge on the role of retinoids and atRA in the improvement of pathological alterations in STZ-induced experimental type-1 diabetes in kidney, retina, skin and nervous system.

**Keywords:** All-trans-retinoic acid; Diabetes, Streptozotocin;  $\beta$  cell injury; Kidney damage

### Introduction

Vitamin A or retinol is a fat-soluble compound derived from [beta]-carotene found in plants and retinyl esters from animal sources. The human body obtains vitamin A from two sources: preformed vitamin A (retinol and retinyl esters) and provitamin A carotenoids ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin) [1,2].

All-trans-retinoic acid (atRA) is a derivative of vitamin A and it is required for almost all essential physiological processes and functions because of its involvement in transcriptional regulation of over 530 different genes [3,4]. atRA exerts its actions by serving as an activating ligand of nuclear atRA receptors [retinoid acid receptor (RAR)  $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$ ] and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\beta/\delta$  which form heterodimers with retinoid X receptors (RXR) [5,6]. atRA plays a relevant role in tissue development and differentiation [7]. This review focuses on the role of atRA in the alterations secondary to  $\beta$  cell damage induced by streptozotocin.

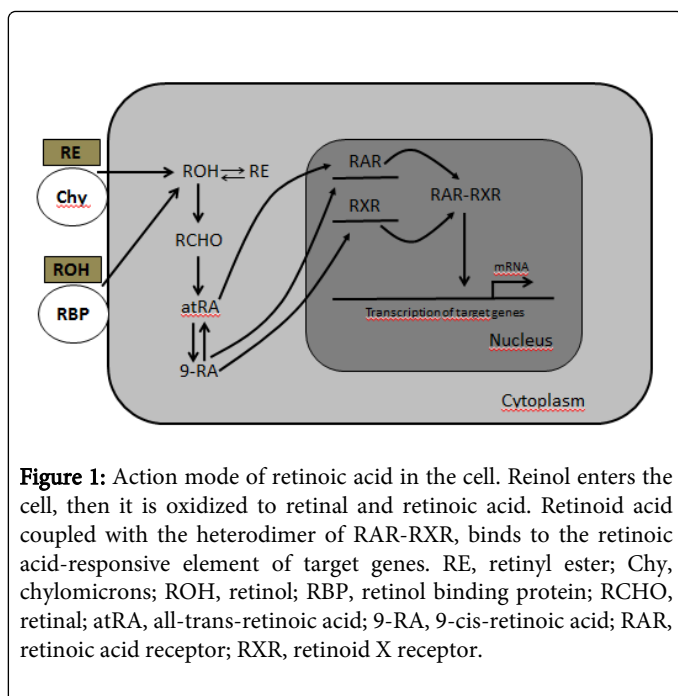
### Retinoids

Vitamin A and its metabolites (retinoids) are a group of potent natural or synthetic molecules which exert a number of biological activities, including embryonic development, adult growth and development, maintenance of immunity, maintenance of epithelial barriers, and vision [8]. Dietary retinyl esters are hydrolyzed in the intestine, and retinol taken into the enterocyte is reesterified. Retinyl ester is further secreted into the circulation and transported as retinol bound to retinol-binding protein (RBP4) to its target cells [9]. Studies have shown that retinol enters by diffusion [10]. However, in 2007, a cell surface receptor for RBP4 termed STRA6 (stimulated by retinoic acid 6) was identified, STRA6 is a widely expressed multi-transmembrane domain protein, it binds to RBP with high affinity and

has robust vitamin A uptake activity from the vitamin A-RBP complex. It is widely expressed in embryonic development and in adult organ systems [11]. A human genetic study found that mutations in the human STRA6 gene are associated with widespread birth defects in multiple organ systems [12]. This is consistent with the expression of STRA6 and the diverse functions of vitamin A in embryonic development.

Most of Vitamin A actions depend on its active metabolites, mainly atRA and 9-cis-RA [13,14], formed in the target tissues mostly through the intracellular oxidative metabolism [15]. Intracellularly, retinoic acid (RA) is subsequently converted to atRA, which can be isomerized through non-enzymatic process to form 9-cis-RA isomer. atRA is produced from retinol in two oxidative steps: first, retinol is oxidized to retinaldehyde, and then retinaldehyde is oxidized to atRA. The first step, the oxidation of retinol to retinaldehyde is catalyzed by two enzyme families, the cytosolic alcohol dehydrogenases (ADHs) and microsomal retinol dehydrogenases (RDHs) and is generally considered rate-limiting [16]. Retinaldehyde can be converted back to retinol, but the oxidation of retinaldehyde to atRA is irreversible, this latter reaction is catalyzed by three retinaldehyde dehydrogenases (RALDH1, RALDH2 and RALDH3).

Two forms of retinoic acid, atRA and 9-cis retinoic acid (9-RA), serve as ligands for two families of nuclear receptors: RAR (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) and RXR (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ). In vitro binding studies have demonstrated that RARs bind to atRA with high affinity, whereas 9-RA is a bifunctional ligand, which can bind to and activate both RARs and RXRs. However, it has not been demonstrated a relationship between the structure of atRA and 9-cis-RA with the affinity for RARs and RXRs. Following ligand binding, these compounds interact with cis acting DNA sequences called retinoic acid responsive elements in the promoter regions of target genes, thereby regulating gene expression (Figure 1) [17].



## Experimental diabetes induced by streptozotocin

Streptozotocin (STZ) (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopyranose) is a naturally occurring compound, produced by the soil bacterium streptomyces achromogenes, that exhibits broad spectrum of antibacterial properties [18]. STZ is a cytotoxic glucose analogue. After its discovery, it was used as a chemotherapeutic alkylating agent in the treatment of metastasizing pancreatic islet cell tumors and other malignancies such as: small cell lung cancer, lymphomas, mycosis fungoides, multiple myeloma, glioma and malignant melanoma [19]. Rakieten and colleagues reported the diabetogenic properties of STZ in 1963 [20]. From that time of discovery till date, STZ has been one of the chemical agents for the induction of diabetes in experimental animals. STZ induces diabetes in rats, mice, monkeys, hamsters, rabbits and guinea pigs [18]. STZ is cytotoxic to pancreatic  $\beta$ -cells and its effects are present within seventy two hours after administration depending on the dose used [21]. STZ toxic action involves its uptake into cells.

The selective pancreatic beta cell toxicity and the diabetic condition, resulting from STZ induction, are related to the glucose moiety in its chemical structure, which enables STZ to enter the beta cell via the low affinity glucose 2 transporter (GLUT2) in the plasma membrane. In contrast, in insulin-producing cells not expressing the GLUT2, the cellular uptake of STZ is very slow. Correspondingly low is the toxicity [22] because the  $\beta$ -cells of the pancreas are more active than other cells in taking up glucose and so are more sensitive than other cells to STZ challenge.

STZ is a structural analogue of glucose (Glu) and N-acetyl Glucosamine (GlcNAc). STZ causes  $\beta$ -cell death by DNA fragmentation due to the nitrosourea moiety. Three major pathways associated with cell death are: (i) DNA methylation resulting in the activation of the nuclear enzyme poly ADP-ribose synthetase as part of the cell repair mechanism and consequently, NAD<sup>+</sup> depletion; (ii) Nitric oxide production, and (iii) Free radical generation such as hydrogen peroxide [23,24]. The American Diabetes Association

established an etiologic classification of Diabetes mellitus and based on their classification, four groups were proposed: 1) Type 1 (5–10%); 2) Type 2 (90–95%); 3) Other specific types and 4) Gestational. Thus, STZ-induced diabetes belongs to the category of other specific types or drug (chemical) induced diabetes.

The type of diabetes induced by STZ is controversial since STZ-hyperglycemia can be similar to either type I or type II diabetes mellitus [25]. Type I diabetes is an autoimmune disease leading to the destruction of the insulin producing pancreatic beta cells in the islets of Langerhans. Type I diabetes is most commonly diagnosed in children and young adults, and by the time of diagnosis, patients have very little endogenous insulin production, many researchers conclude that STZ produces type I diabetes mellitus [26,27].

On the other hand, the dose of STZ required for inducing diabetes depends on the animal species, age of animal, route of administration, weight of animal, nutritional status and different responses to xenobiotics.

## Protective effects of all-trans-retinoic acid (atRA) in STZ-induced type-1 diabetes

Several studies have pointed out that atRA acts as an important signaling molecule for mesenchymal/epithelial interactions in the development of kidney, lung, central nervous system and gut [28-31]. Also, retinoids have been considered as insulinotropic factors [32,33] or its deficiency is related to the cause of type-1 diabetes [34,35]. It has been shown that at embryonic day (e) 11.5 of mice, atRA is endogenously and exclusively present in pancreatic mesenchyme, made evident by mRNA and protein expression of retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2) enzyme. In the presence of exogenous atRA, pancreatic rudiments differentiate into ducts and endocrine cells and inhibit acini. Furthermore, atRA upregulates pancreatic duodenum homeobox (PDX)-1, an important transcription factor in pancreatic development. These data suggest the important roles of atRA in determining the cell fate of pancreatic progenitor cells, leading to the proper formation of endocrine versus exocrine pancreas during organogenesis [36].

Also, it is possible to induce pancreatic differentiation of mouse Embryoid Body-Like Sphere (EBS) by simultaneous stimulation with activin and retinoic acid [37]. In fact, using activin to induce the differentiation of undifferentiated Embryonic Stem (ES) cells into endoderm and induction of pancreatic differentiation with retinoic acid are important elements that are common to almost all of the methods for obtain pancreatic  $\beta$  cells from human ES cells and induced Pluripotent Stem Cells (iPS) [38].

There is scant information about the metabolism of atRA in diabetes, including diabetic nephropathy. Starkey and colleagues [39] recently described altered retinoic acid metabolism under diabetic conditions and suggested that a shift in atRA metabolism is a novel feature in type-2 diabetic renal disease. Ingenuity Pathway Analysis identified altered retinoic acid as a key-signaling axis that was altered in the diabetic renal cortical proteome. Western blotting and real-time PCR confirmed diabetes-induced upregulation of RALDH1, which was localized by immunofluorescence predominantly to the proximal tubule in the diabetic renal cortex, while PCR confirmed the down regulation of Alcohol Dehydrogenase (ADH) identified by mass spectrometry. Despite increased renal cortical tissue levels of retinol and RALDH1 in db/db versus control mice, atRA was significantly decreased in association with a significant decrease in PPAR $\beta$ / $\delta$

mRNA [39]. Also, plasma, and kidney concentrations of Retinol Binding Protein (RBP) are significantly lower in STZ-treated rats compared to controls, suggesting that STZ-induced diabetes is associated with a depressed plasma concentration of retinol which may be due, at least in part, to its impaired metabolic transport from the liver [40]. It has long been established that 66–75% of dietary retinoid (chylomicron and chylomicron remnant retinoid) is taken up by the liver where it is stored in Hepatic Stellate Cells (HSCs) [41]. Evidence to date suggests that reduced metabolic availability of vitamin A occurs predominantly as a result of insulin deficiency.

The role of atRA treatment on STZ-induced experimental diabetic nephropathy has been tested by Han et al., who described that atRA treatment decreased diabetes-induced renal expression and urinary excretion of monocyte chemoattractant peptide (MCP)-1 and Albumin: Creatinine Ratio (ACR). Also, in cultured podocytes, high glucose stimuli rapidly increased MCP-1 mRNA and protein expression, which was attenuated by atRA, suggesting an anti-inflammatory and renoprotective role of atRA in the early stages of diabetic nephropathy [42].

A protective role of atRA has been shown in diabetic and nondiabetic proteinuric diseases [42] and a link between a cytochrome P450 enzyme known to metabolize atRA and increased mitochondrial oxidative stress in type 1 diabetic rat kidneys has been established, since P450 enzyme increases the elimination of atRA from the body [43]. Recently, atRA has been shown to bind PPAR $\beta/\delta$  and act as a ligand to activate transcription, suggesting that altered retinoic metabolism could provide a potential link to insulin resistance and fatty acid [43].

Glucose-induced Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) expression and NO production in mesangial cells may contribute to hyperfiltration in diabetes and RA may exert beneficial effects by downregulation of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) and store-operated Ca<sup>2+</sup> influx (SOC) [44].

On the other hand, it has been reported that skin disorders in STZ-induced type 1 diabetes might be partially due to the reduced levels of vitamin A, which might exert protective effects against skin changes induced by diabetes. Treatment with vitamin A or RA influences various physiological processes in skin tissues, including enhancement of cell communication, and inhibition of metabolic activation. RA treatment reduced the activity of metalloproteinase and hyaluronidase in the skin tissues of diabetic rats. Also, blood retinol levels in STZ-treated rats were lower than controls, suggesting that type-1 diabetic rats could be vitamin A-deficient [45]. Also, superficial skin wounds in diabetic rats heal more rapidly in animals that have been pretreated with a regimen of topical atRA. At the histological level, recently healed skin from vehicle-treated diabetic rats contains a thin, wispy provisional matrix in which many of the embedded cells were round and some of them were pycnotic. In contrast, a much denser provisional matrix with large numbers of embedded spindle-shaped cells was observed in healed wounds from diabetic skin that had been pretreated with atRA. The atRA-treated diabetic skin was histologically similar to vehicle-treated skin from nondiabetic animals. In light of these findings, prophylactic use of retinoid-containing preparations might be useful in preventing the development of non-healing skin ulcers resultant from minor traumas in at-risk skin [46].

In a model of diabetic mice neuropathy induced by STZ administration, atRA treatment reverted the ultrastructural morphologic changes, as observed by the improvement in sensibility

and the reduction in neuropathy by increasing the Neural Growth Factor (NGF) concentrations in nerve terminals [47,48]. Also, in a mouse model of STZ-induced dementia of Alzheimer's type, atRA attenuated memory deficits by virtue of its neuroprotective, anti-cholinesterase, anti-oxidative, anti-inflammatory and probably amyloid lowering potential [49]. Retinol treatment decreased lipid peroxidation in the retina of STZ-treated animals, and improved the loss of fat-soluble antioxidants determined by the ferric chloride-bipyridyl reaction. It seems permissible to assume that retinoids may be involved in physiological protective mechanisms against lipid peroxidation in the retina in addition to their photo-receptive functions as visual pigment [50]. Also, atRA treatment decreased the number of apoptotic cells in the retina of STZ-treated mice evaluated by TdT-dUTP terminal nick-end labeling assay [51]. It was found that atRA exerts immunomodulatory actions in a number of inflammatory and autoimmune conditions, atRA reduced emergence of primed (autoreactive) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and reduced Th1/Th17 response and nitric oxide production in peripheral lymphoid tissues thus shifting the balance towards the anti-inflammatory cytokines [52].

Several doses have been used to test the protective effect of atRA on STZ-induced alterations, which are in the range of 1-20 mg/kg/day at times between 1-8 weeks [42,46-52] in animal models. However, the results of several classical clinical studies showed that chronic administration of vitamin A in slight excess of 5,000 IU/d is associated with a reduction in bone density and increased risk for osteoporotic fractures in the older individuals [53]. Also, castrated mice injected intraperitoneally with 10 mg/kg daily during 3 weeks with atRA showed significant bone loss, this effect was more pronounced in testosterone-deficient animals. Testosterone deficiency as occurs following castration may sensitize the bone to resorption mediated by atRA. Therefore, chronic vitamin A administration may be a risk factor for osteoporosis in rodents [54].

## Conclusion

Retinoids have many important and diverse functions throughout the body, including roles in vision, regulation of cell proliferation and differentiation. The experiments described above provide evidence that atRA supplementation under diabetic conditions exerts protective effects and ameliorates pathological alterations in diabetes by modulating several signaling pathways including anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory and antiapoptotic properties, thus suggesting a promising role of atRA as a potential chemo-therapeutic or chemo-preventive agent against diverse complications in diabetes.

## Acknowledgements

With partial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). México (Grant 179870 to JLR)

## References

1. Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Doucette S, et al. (2011) Vitamin A and retinoid derivatives for lung cancer: a systematic review and meta analysis. See comment in PubMed Commons below *PLoS One* 6: e21107.
2. Van DE, Kulier R, Gulmezoglu AM, Villar J (2002) Vitamin A supplementation during pregnancy. The Cochrane database of systematic reviews CD001996.
3. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2009) Function of retinoic acid receptors during embryonic development. See comment in PubMed Commons below *Nucl Recept Signal* 7: e002.

4. Clagett-Dame M, Knutson D (2011) Vitamin A in reproduction and development. See comment in PubMed Commons below *Nutrients* 3: 385-428.
5. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 46:451-480.
6. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. See comment in PubMed Commons below *Cell* 129: 723-733.
7. Vilar J, Gilbert T, Moreau E, Merlet-Bénichou C (1996) Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. See comment in PubMed Commons below *Kidney Int* 49: 1478-1487.
8. Wald G (1968) Molecular basis of visual excitation. See comment in PubMed Commons below *Science* 162: 230-239.
9. Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS (1995) Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. See comment in PubMed Commons below *J Biol Chem* 270: 17850-17857.
10. During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH (2002) Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. See comment in PubMed Commons below *J Lipid Res* 43: 1086-1095.
11. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, et al. (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. See comment in PubMed Commons below *Science* 315: 820-825.
12. Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillessen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, et al. (2007) Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *American journal of human genetics*, 80(3):550-560.
13. Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? See comment in PubMed Commons below *Cell* 83: 859-869.
14. Iwata M, Eshima Y, Kagechika H (2003) Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *International immunology*, 15(8):1017-1025.
15. Duester G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. See comment in PubMed Commons below *Eur J Biochem* 267: 4315-4324.
16. Napoli JL (1986) Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of retinoic acid synthesis by an established mammalian cell line. See comment in PubMed Commons below *J Biol Chem* 261: 13592-13597.
17. Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. See comment in PubMed Commons below *FASEB J* 10: 940-954.
18. Rerup CC (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. See comment in PubMed Commons below *Pharmacol Rev* 22: 485-518.
19. Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. See comment in PubMed Commons below *Diabetologia* 51: 216-226.
20. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer chemotherapy reports Part 1*, 29:91-98.
21. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, et al. (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. See comment in PubMed Commons below *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 201-205.
22. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S (2000) Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. See comment in PubMed Commons below *Diabetologia* 43: 1528-1533.
23. Tesch GH, Allen TJ (2007) Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. See comment in PubMed Commons below *Nephrology (Carlton)* 12: 261-266.
24. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN (2013) Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. See comment in PubMed Commons below *J Diabetes Metab Disord* 12: 60.
25. Arias-Díaz J, Balibrea J (2007) [Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes]. See comment in PubMed Commons below *Nutr Hosp* 22: 160-168.
26. Boroujeni NB, Hashemi SM, Khaki Z, Soleimani M (2011) The reversal of hyperglycemia after transplantation of mouse embryonic stem cells induced into early hepatocyte-like cells in streptozotocin-induced diabetic mice. See comment in PubMed Commons below *Tissue Cell* 43: 75-82.
27. King AJ (2012) The use of animal models in diabetes research. See comment in PubMed Commons below *Br J Pharmacol* 166: 877-894.
28. Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, et al. (2001) Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. See comment in PubMed Commons below *Nat Genet* 27: 74-78.
29. Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV (2000) Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. See comment in PubMed Commons below *Development* 127: 3057-3067.
30. LaMantia AS, Bhasin N, Rhodes K, Heemskerk J (2000) Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. See comment in PubMed Commons below *Neuron* 28: 411-425.
31. Plateroti M, Freund JN, Leberquier C, Kedinger M (1997) Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. See comment in PubMed Commons below *J Cell Sci* 110: 1227-1238.
32. Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Wang J, Fernandez-Mejia C (1999) Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. See comment in PubMed Commons below *Endocrinology* 140: 3091-3096.
33. Chertow BS, Blaner WS, Baranetsky NG, Sivitz WI, Cordle MB, et al. (1987) Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. See comment in PubMed Commons below *J Clin Invest* 79: 163-169.
34. Basu TK, Basualdo C (1997) Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. See comment in PubMed Commons below *Nutrition* 13: 804-806.
35. Figueroa DJ, Hess JF, Ky B, Brown SD, Sandig V, Hermanowski-Vosatka A, Twells RC, Todd JA, Austin CP (2000) Expression of the type I diabetes-associated gene LRP5 in macrophages, vitamin A system cells, and the Islets of Langerhans suggests multiple potential roles in diabetes. *J Histochem Cytochem*, 48(10):1357-1368.
36. Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, et al. 2003 All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes*, 52(1):76-84.
37. Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M (2007) Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. See comment in PubMed Commons below *Differentiation* 75: 1-11.
38. Hosoya M, Kunisada Y, Kurisaki A, Asashima M (2012) Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. See comment in PubMed Commons below *Int J Dev Biol* 56: 313-323.
39. Starkey JM, Zhao Y, Sadygov RG, Haidacher SJ, Lejeune WS, et al. (2010) Altered retinoic acid metabolism in diabetic mouse kidney identified by O isotopic labeling and 2D mass spectrometry. See comment in PubMed Commons below *PLoS One* 5: e11095.
40. Tuitoek PJ, Ritter SJ, Smith JE, Basu TK (1996) Streptozotocin-induced diabetes lowers retinol-binding protein and transthyretin concentrations in rats. See comment in PubMed Commons below *Br J Nutr* 76: 891-897.

41. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011) Vitamin A metabolism: an update. See comment in PubMed Commons below *Nutrients* 3: 63-103.
42. Han SY, So GA, Jee YH, Han KH, Kang YS, et al. (2004) Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy. See comment in PubMed Commons below *Immunol Cell Biol* 82: 568-576.
43. Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG. (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*, 53(1):185-194.
44. Zhang W, Meng H, Li ZH, Shu Z, Ma X, et al. (2007) Regulation of STIM1, store-operated Ca<sup>2+</sup> influx, and nitric oxide generation by retinoic acid in rat mesangial cells. See comment in PubMed Commons below *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1054-1064.
45. Takahashi N, Takasu S (2011) A close relationship between type 1 diabetes and vitamin A-deficiency and matrix metalloproteinase and hyaluronidase activities in skin tissues. See comment in PubMed Commons below *Exp Dermatol* 20: 899-904.
46. Lateef H, Abatan OI, Aslam MN, Stevens MJ, Varani J (2005) Topical pretreatment of diabetic rats with all-trans retinoic acid improves healing of subsequently induced abrasion wounds. See comment in PubMed Commons below *Diabetes* 54: 855-861.
47. Hernandez-Pedro N, Ordonez G, Ortiz-Plata A, Palencia-Hernandez G, Garcia-Ulloa AC, Flores-Estrada D, Sotelo J, Arrieta O. (2008) All-trans retinoic acid induces nerve regeneration and increases serum and nerve contents of neural growth factor in experimental diabetic neuropathy. *Transl Res*, 152(1):31-37.
48. Arrieta O, García-Navarrete R, Zúñiga S, Ordóñez G, Ortiz A, et al. (2005) Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice. See comment in PubMed Commons below *Eur J Clin Invest* 35: 201-207.
49. Sodhi RK, Singh N (2013) All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. See comment in PubMed Commons below *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 38-46.
50. Nishimura C, Kuriyama K (1985) Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats: effect of vitamin A administration. See comment in PubMed Commons below *Jpn J Pharmacol* 37: 365-372.
51. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Inatomi S, et al. (2008) Experimental effect of retinoic acids on apoptosis during the development of diabetic retinopathy. See comment in PubMed Commons below *Clin Ophthalmol* 2: 233-235.
52. Stosić-Grujčić S, Cvjetičanin T, Stojanović I (2009) Retinoids differentially regulate the progression of autoimmune diabetes in three preclinical models in mice. See comment in PubMed Commons below *Mol Immunol* 47: 79-86.
53. Michaëlsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H (2003) Serum retinol levels and the risk of fracture. See comment in PubMed Commons below *N Engl J Med* 348: 287-294.
54. Broulák PD, Račka I, Brouliková K (2013) Prolonged overdose of all-trans retinoic acid enhances bone sensitivity in castrated mice. See comment in PubMed Commons below *Nutrition* 29: 1166-1169.