



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**EL ÁCIDO RETINOICO ALL-TRANS (ATRA) ATENÚA LA INFLAMACIÓN Y LA  
FIBROGÉNESIS EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA TEMPRANA**

**M. en C. Edith Sierra Mondragón**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

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

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Dr. José Pedraza Chaverri

Ciudad de México (CDMX)

Noviembre, 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría 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 en laboratorio de fisiología renal L-36.

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

**Dr. José Pedraza Chaverri**, Facultad de Química, UNAM. Asesor externo

**Dr. Profirio Nava Domínguez**, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

**Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido**, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

**Dr. Gerardo Contreras Patiño**, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

**Dr. José Segovia Vila**, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV

**Dr. Pablo Muriel de la Torre**, Departamento de Farmacología del CINVESTAV.

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

Mis estudios de doctorado fueron apoyados por la beca otorgada por el Conacyt No. 267840.

## **Abreviaturas**

**AGE:** Productos finales de glicosilación avanzada

**ATRA:** Ácido retinoico all-trans

**DBT:** Diabetes

**ERET:** Enfermedad renal en etapa terminal

**FeNa:** Fracción excretada de sodio

**H&E:** Hematoxilina-eosina

**HMGB1:** Proteína del grupo de alta movilidad box1

**HSP:** Proteína de choque térmico

**I.V:** Intravenosa

**ICAM-1:** Molecula de adhesión intracelular 1

**ILs:** Interleucinas

**KB:** Krebs-bicarbonato

**MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos 1

**MEC:** Matriz extracelular

**MyD88:** Factor de dimerización mieloide 88

**Na<sup>+</sup>:** Sodio

**ND:** Nefropatía diabética

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**PBS:** Solución amortiguadora fosfato salino

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**RAGE:** Receptor de los productos finales de glicosilación avanzada

**RAR:** Receptor a ácido retinoico

**RIPA:** amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

**Smad:** (por su sigla en inglés Mothers Against Decantaplegic homolog

**STZ:** Estreptozotocina

**TEM:** Transición epitelio mesénquima

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TIRAP:** Proteína asociada a TIR

**TLRs:** Receptor tipo toll

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TRAF6:** Factor asociado al receptor de TNF 6

**TRAM:** Molécula adaptadora que contiene TIR

**T $\beta$ R:** Receptor de TGF- $\beta$ 1

**VCAM-1:** Molécula de adhesión celular vascular 1

**WB:** Western blot

**$\alpha$ -SMA:** Alfa actina de músculo liso

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Resumen.....   | 7         |
| Abstract .....   | 9         |
| <b>I. Introducción.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1. Diabetes Mellitus .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2. Nefropatía diabética.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3. Mecanismos y mediadores implicados en la nefropatía diabética .....</b>                        | <b>16</b> |
| <b>3.1 La inflamación en la nefropatía diabética .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3.2 Vía de señalización implicada en la inflamación.....</b>                                      | <b>18</b> |
| <b>4. Fibrosis y daño renal diabético .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>4.1 El TGF-<math>\beta</math>1 está implicado en la señalización fibrótica durante la ND.....</b> | <b>21</b> |
| <b>5. Potencial terapéutico del ácido retinoico all trans en la protección del daño renal .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>II. Justificación .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>III. Hipótesis.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>IV. Objetivo general.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>V. Objetivos particulares .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>VI. Materiales y métodos .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>1. Reactivos .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>2. Animales experimentales .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3. Diabetes experimental .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>4. Diseño experimental.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>5. Obtención muestras de orina y suero .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>6. Parámetros de función renal.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>7. Obtención del tejido renal.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>8. Histología en cortes de tejido renal .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>9. Aislamiento de glomérulos.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>10. Aislamiento de túbulos proximales y distales .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>11. Análisis de Western blot .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>12. Inmunofluorescencia.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>13. Arreglo de anticuerpos inflamatorios en una matriz (RatCytokine) .....</b>                    | <b>34</b> |
| <b>14. Inmunoprecipitación.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>15. Análisis estadístico.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>VII. RESULTADOS .....</b>   | <b>36</b> |

|   |    |
|---|----|
| 1. El ácido retinoico all-trans (ATRA) reduce el daño renal en ratas con ND temprana.....   | 36 |
| 2. Efecto del tratamiento de ATRA en las lesiones patológicas de la ND temprana.....  | 38 |
| 3. La administración de ATRA aminora la sobreexpresión de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en glomérulos y túbulos proximales aislados de ratas con ND temprana ..... | 40 |
| 4. La administración de ATRA reduce el proceso inflamatorio inducido por la ND temprana.....  | 42 |
| 5. La administración de ATRA disminuye la respuesta inflamatoria inducida por la diabetes a través de la señalización: TLR4-NF- $\kappa$ B.....   | 45 |
| 6. El tratamiento con ATRA reduce la acumulación de macrófagos en tejido renal de ratas diabéticas .....  | 52 |
| 7. El tratamiento de ATRA disminuye la presencia de miofibroblastos durante la ND temprana.....   | 54 |
| 8. El tratamiento con ATRA previene la expresión de marcadores de matriz extracelular durante la nefropatía diabética temprana .....  | 56 |
| 9. El tratamiento con ATRA aminora la fibrogénesis al suprimir la vía de señalización TGF- $\beta$ 1/Smad3 en glomérulos y túbulos proximales de ratas diabéticas. ....   | 58 |
| 10. El tratamiento con ATRA exógeno inhibe la fosforilación y la pérdida de la expresión del receptor de ácido retinoico alfa (RAR- $\alpha$ ) mediado por la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK).....               | 61 |
| VIII. Discusión.....  | 63 |
| IX. Conclusión .....  | 71 |
| X. Referencias .....  | 73 |
| X. Anexos .....   | 79 |
| 1. Arreglo de moléculas inflamatorias en una matriz (RatCytokine) .....   | 79 |
| 2. Publicaciones derivadas de la tesis.....   | 80 |

## Resumen

La nefropatía diabética (ND) es la principal causa de insuficiencia renal en todo el mundo y sus complicaciones se han convertido en un problema de salud pública. La inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis desempeñan papeles centrales en la progresión de la ND que conducen a insuficiencia renal. El efecto de inflamación y fibrogénesis en la evolución temprana de ND no se ha descrito completamente. Por lo tanto, es importante estudiar terapias que pueden modular estos procesos y así reducir o retardar la progresión de la ND. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos antiinflamatorios, antifibrogénicos y nefroprotectores del ácido retinoico all-trans (ATRA) en glomérulos, túbulos proximales y túbulos distales de ratas diabéticas. La diabetes fue inducida por una inyección única de estreptozotocina (STZ, 60 mg / Kg). El ATRA (1 mg / Kg) se administró diariamente por sonda gástrica, desde los días 3 a 21 después de la inyección de STZ. El tratamiento con ATRA atenuó la lesión renal a través de la reducción de la proteinuria, la hipertrofia renal, el volumen glomerular y el aumento de la natriuresis, así como marcadores de daño renal tempranos como la  $\beta$ 2 microglobulina y la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL). Además, la diabetes indujo un aumento de las interleucinas [IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-16, IL-13, IL-2, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], quimiocinas (CCL2, CCL20, CXCL5 y CXCL7), moléculas de adhesión (ICAM-1 y L-selectina) y factores de crecimiento (GM-CSF, VEGF, PDGF) en glomérulos y túbulos proximales, mientras que el tratamiento con ATRA redujo notablemente estas alteraciones. Para explorar más a fondo los mecanismos a través de los cuales ATRA disminuye la respuesta inflamatoria, se estudió la señalización del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 mediada por el receptor tipo toll 4 (TLR4). Se observó que, en glomérulos y túbulos proximales el daño se asocia con la activación de TLR4/NF- $\kappa$ B, y que el efecto antiinflamatorio de ATRA se asocia con la regulación de la fosforilación y localización de NF- $\kappa$ B. Los siguientes parámetros aumentaron en la ND

temprana: infiltración de macrófagos, localización de células positivas a la actina del músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA) en el tejido renal y proteínas profibróticas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), laminina beta 1 (LAM- $\beta$ 1) y colágenos IV e I. Sorprendentemente, el tratamiento con ATRA redujo estas alteraciones y atenuó la expresión y la translocación nuclear de Smad3, con un incremento de Smad7 glomerular y en túbulo proximales. La condición diabética disminuyó la expresión del receptor de ácido retinoico alfa (RAR- $\alpha$ ) a través de la fosforilación en residuos de serina mediada por la activación de la cinasa N-terminal de c-jun (JNK). La administración de ATRA restableció la expresión de RAR- $\alpha$  e inhibió las interacciones directas de JNK/RAR- $\alpha$ . El tratamiento con ATRA previno la fibrogénesis mediante la regulación negativa de la señalización de TGF- $\beta$ 1/Smad3 en ratas diabéticas. Por lo tanto, la señalización ATRA/RAR- $\alpha$  puede representar un nuevo blanco terapéutico para desarrollar enfoques para el tratamiento y la prevención de la inflamación renal y la fibrogénesis.



## Abstract

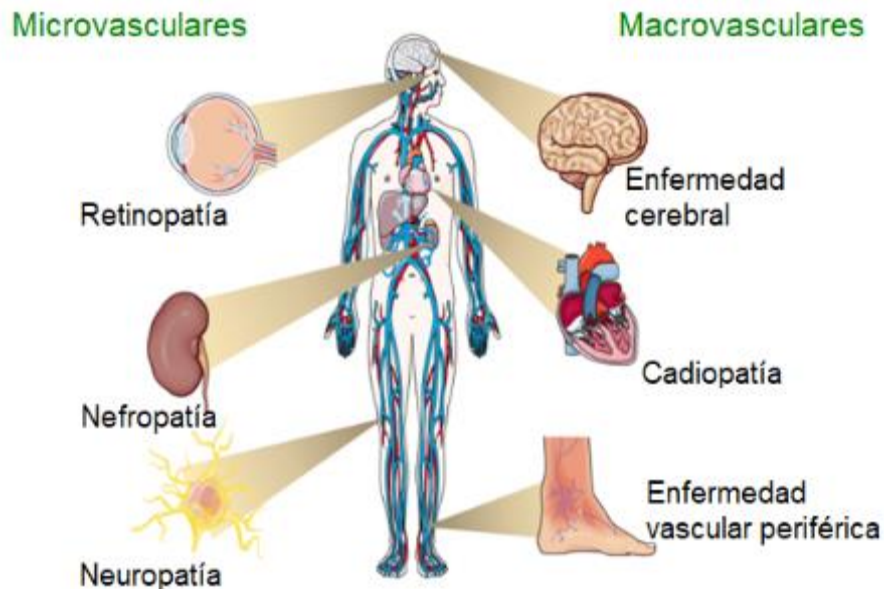
Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of renal failure worldwide and its complications have become a public health problem. Inflammation, oxidative stress and fibrosis play central roles in the progression of DN that lead to renal failure. The potential deleterious effect of inflammation and fibrogenesis in the early evolution of DN is not fully disclosed. Therefore, it is relevant to study therapies that can modulate these processes to reduce DN progression. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory, antifibrogenic and renoprotective effects of all-trans retinoic acid (ATRA) in isolated glomeruli, proximal tubules and distal tubules of diabetic rats. Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin (STZ, 60 mg/Kg). ATRA (1 mg/Kg) was administered daily by gavage, from days 3–21 after STZ injection. ATRA attenuated kidney injury through the reduction of proteinuria, renal hypertrophy, glomerular volume and increase in natriuresis, as well as early markers of damage such as  $\beta$ 2-microglobulin, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Besides, diabetes induced an increase in interleukins [IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-16, IL-13, IL-2, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )], chemokines (CCL2, CCL20, CXCL5 and CXCL7), adhesion molecules (ICAM-1, and L-selectin) and growth factors (GM-CSF, VEGF, PDGF) in glomeruli and proximal tubules, whereas ATRA treatment remarkably ameliorated these alterations. To further explore the mechanisms through which ATRA decreases inflammatory response, the nuclear factor kappa beta (NF- $\kappa$ B) signaling mediated by Toll-like receptor 4 (TLR4) was studied. We found that in glomeruli, proximal tubules cell injury was associated with TLR4/NF- $\kappa$ B activation, and that the anti-inflammatory effect of ATRA was associated with the regulation of NF- $\kappa$ B phosphorylation and localization. The following parameters increased in early DN: macrophage infiltration, localization of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)-positive cells in renal tissue, and profibrotic proteins such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), laminin beta 1 (LAM- $\beta$ 1),

and collagens IV and I. Remarkably, ATRA treatment ameliorated these alterations and attenuated expression and nuclear translocation of Smad3, with increment of glomerular and tubular Smad7. The diabetic condition decreased expression of retinoic acid receptor alpha (RAR- $\alpha$ ) through phosphorylation in serine residues mediated by the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK). ATRA administration restored the expression of RAR- $\alpha$  and inhibited direct interactions of JNK/RAR- $\alpha$ . ATRA prevented fibrogenesis through down-regulation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling. Therefore, ATRA/RAR- $\alpha$  signaling may represent a novel target for developing approaches to the treatment and prevention of renal inflammation and fibrogenesis.

## I. Introducción

### 1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica como resultado de un defecto en la secreción y/o acción de insulina, acompañada de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. La diabetes puede clasificarse como tipo 1 (destrucción autoinmune de células  $\beta$  y deficiencia absoluta de insulina), tipo 2 (deficiencia y resistencia relativa a insulina), diabetes gestacional y otros tipos (como enfermedad pancreática) (Forouhi et al; 2018). El elevado impacto socio-sanitario de esta patología se debe a su alta frecuencia y, sobre todo, a las consecuencias de sus complicaciones crónicas (Esquema 1), que se dividen en 1) microvasculares: retinopatía, nefropatía y neuropatía. 2) macrovasculares: enfermedad cardíaca, cerebral y enfermedad vascular periférica (Harding et al., 2018).



**Esquema 1.** Principales complicaciones microvasculares y macrovasculares asociadas con la diabetes mellitus. Modificado de Jiang (2017).

[10.2210/rscb\\_pdb/GH/DM/monitoring/complications](https://doi.org/10.2210/rscb_pdb/GH/DM/monitoring/complications)

## 2. Nefropatía diabética

El riñón es el órgano par que se encarga del balance global de iones y agua en el organismo, se encuentran a cada lado de la columna vertebral entre las vértebras torácicas, 8 y 12. Son órganos densos recubiertos por una fascia de tejido conectivo, que 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 uréter y las terminales nerviosas que acompañan a los vasos sanguíneos y cada riñón mide aproximadamente 11 cm de largo y pesa alrededor de 150 g (Zhang et al., 2013). Las funciones del riñón se pueden clasificar en tres: 1) Excretora: La excreción de productos de desecho, metabólicos y de sustancias exógenas, 2) Reguladora: Regula el volumen de agua en el cuerpo, la osmolaridad, el balance electrolítico, el balance ácido-base y la presión arterial, 3) Metabólica: Metaboliza la vitamina D, produce renina y eritropoyetina (Chalmers et al., 2019).

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Esquema 2), cada riñón humano contiene aproximadamente 1 millón de nefronas que se encargan del filtrar el plasma sanguíneo, alrededor de 180 L por día, así como de procesos de reabsorción y secreción que convierten al ultrafiltrado del plasma en orina, produciendo aproximadamente 1 L de orina diariamente. La estructura de la nefrona está críticamente relacionada con sus funciones complejas y contiene cinco segmentos los cuales son: el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo 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 (O'Brien et al., 2014).

**2.1 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

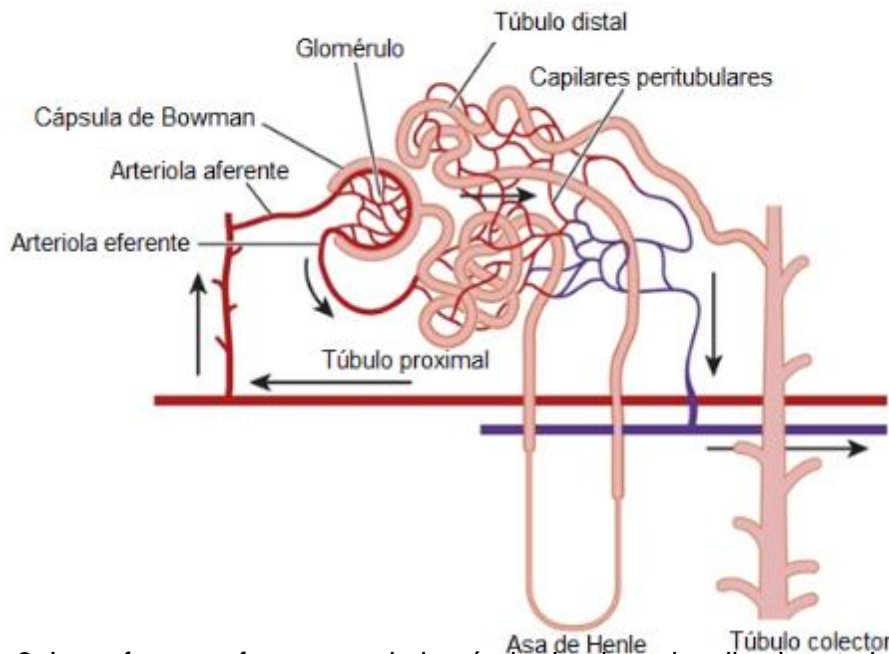
arteriolas aferente y eferente, y a las fenestraciones de los capilares glomerulares. Eso permite que los componentes plasmáticos como agua, sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y glucosa se encuentren a la misma concentración en el ultrafiltrado 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.

**2.2 Túbulo proximal:** La mayor parte del filtrado glomerular se reabsorbe en los túbulos. 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  $\text{Na}^+$  no varía a lo largo del túbulo porque su reabsorción se lleva a la par con la de agua; la concentración de  $\text{Cl}^-$  aumenta un poco, 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 bicarbonato de calcio disminuye hasta un 50%; la glucosa y los aminoácidos desaparecen por completo, porque son reabsorbidos completamente en este segmento de la nefrona.

**2.3 Asa de Henle:** Esta porción tubular reabsorbe del 15 al 20% del filtrado glomerular, 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 cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) a través del co-transportador sodio-potasio-dos cloros.

**2.4 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  $\text{NaCl}$  a través del transportador de  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ .

**2.5 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 (Chalmers et al., 2019).



**Esquema 2.** La nefrona se forma por el glomérulo donde se localiza la arteriola eferente y aferente, la cápsula de Bowman, por un túbulo proximal, el asa del Henle, el túbulo distal y el túbulo colector. Tomado y modificado de Meyer (2006) DOI: 10.13140/RG.2.2.17761.35682

La nefropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones asociadas a la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, que eventualmente progresa a un estado de enfermedad renal en etapa terminal (ERET). En diversos estudios epidemiológicos se ha encontrado que aproximadamente del 30% al 35% de los pacientes diabéticos manifiestan nefropatía,

a nivel mundial la ND es la principal causa de enfermedad renal crónica y de fase terminal, además, 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 diabetes mellitus tipo 1, 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 ND desarrollan hiperfiltración glomerular seguida de un periodo prolongado de disminución en la función glomerular que culmina en ERET.

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 (Xue et al., 2017; Ilyas et al., 2017).

Se definen 5 estadios en la evolución de la ND (Ghaderian et al. 2015): **Estadio I** o inicial, en el que existe un aumento de la filtración glomerular e hipertrofia renal; **Estadio II**, que se define por engrosamiento de la membrana basal glomerular y la matriz mesangial, sin alteración de la excreción proteica, por lo que ambos pertenecen a una fase preclínica de la enfermedad; **Estadio III** o nefropatía incipiente, se define por la aparición de microalbuminuria que suele aparecer después de los 10-15 años de evolución de la diabetes mellitus; estadio **IV o nefropatía establecida**, fase en la que existe glomeruloesclerosis y proteinuria (definida como valores de proteínas en orina superiores a

500 mg/24 h o excreción urinaria de albúmina mayor de 200 mg/min o más de 300 mg/24 h), **estadio V o insuficiencia renal**, se define por niveles de creatinina sérica superiores o iguales a 1,4 mg/dl en varones y 1,3 mg/dl en mujeres, lo que se alcanza tras 7-10 años de la aparición de proteinuria persistente. La ND se ha relacionado con alteraciones renales funcionales y morfológicas específicas en los diferentes segmentos de la nefrona.

### **3. Mecanismos y mediadores implicados en la nefropatía diabética**

La patogénesis de la ND es multifactorial donde participan diferentes factores metabólicos como la alteración en la producción de la energía celular, la activación de diferentes enzimas como la aldosa reductasa y la proteína cinasa C (PKC), el aumento en el flujo de polioles y la vía de las hexosaminas, la generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), factores hemodinámicos como la angiotensina II, endotelina I y el estrés oxidante (Forbes et al., 2013).

#### **3.1 La inflamación en la nefropatía diabética**

Cada vez más evidencias sugieren que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la nefropatía diabética. Se produce una acumulación de macrófagos y células T en el glomérulo y el espacio túbulointersticial. Estos leucocitos se adhieren al endotelio con la ayuda de las selectinas y moléculas de adhesión que promueven el reclutamiento de nuevas células, así como la activación de las células residentes renales, que a su vez producen y liberan moléculas proinflamatorias implicadas en la migración leucocitaria y la proliferación. De esta manera se inicia un círculo vicioso de amplificación del proceso inflamatorio que agrava y perpetúa el daño renal (Doante-Correa et al., 2015; Iwata et al., 2014).

Las moléculas de adhesión son proteínas involucradas en la unión entre células o con la matriz extracelular durante los procesos de adhesión celular. En primer lugar, actúan las selectinas, que son las encargadas de anclar y reducir la velocidad circulante de los



leucocitos del vaso sanguíneo. A continuación, la fuerte adhesión de leucocitos al endotelio está mediada por las moléculas de adhesión intercelulares ejemplo la molécula de adhesión intermolecular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1). Se ha demostrado un aumento significativo de la expresión de moléculas de adhesión en modelos de nefropatía diabética (Hegazy et al., 2019). Entre las diversas citocinas inflamatorias implicadas en el daño renal asociado a diabetes destacan las interleucinas (ILs) como IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Se ha demostrado que IL-1 e IL-6 aumenta en el daño renal experimental y es capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, mesangiales, túbuloepiteliales y la migración de leucocitos (Pichler et al., 2016). Por su parte, el TNF $\alpha$  es producida mayoritariamente por monocitos, macrófagos y células T y también por las células residentes renales. Estudios experimentales han relacionado el aumento de TNF $\alpha$  en células glomerulares y tubulares de ratas diabéticas con la hipertrofia y la hiperfuncionalidad renal, dos alteraciones de la etapa inicial de la nefropatía diabética (Pérez-Morales et al., 2019).

Las quimiocinas son pequeñas citocinas quimioatrayentes que estimulan la migración dirigida de leucocitos y participan en procesos de angiogénesis, desarrollo embrionario y homeostasis celular, así como en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Dentro de esta familia se distinguen cuatro subfamilias, en función de la disposición de sus dos primeros residuos de cisteína: C (p. ej. CXCL1 y CXCL2), CC (p. ej. CCL2 y CCL5), CXC (p. ej. IL-8 y CX3C) y CX3C (p. ej. CX3CL1). La proteína quimioatrayente de monocitos-1, también conocida como CCL2 o MCP-1, es la principal quimiocina de la subfamilia CC, con un amplio espectro de acción y potente capacidad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T. Además, induce en monocitos la expresión de integrinas, favoreciendo su migración. Se ha observado que los niveles de CCL2 están aumentados en células glomerulares en cultivo, así como en el tejido renal y la orina de

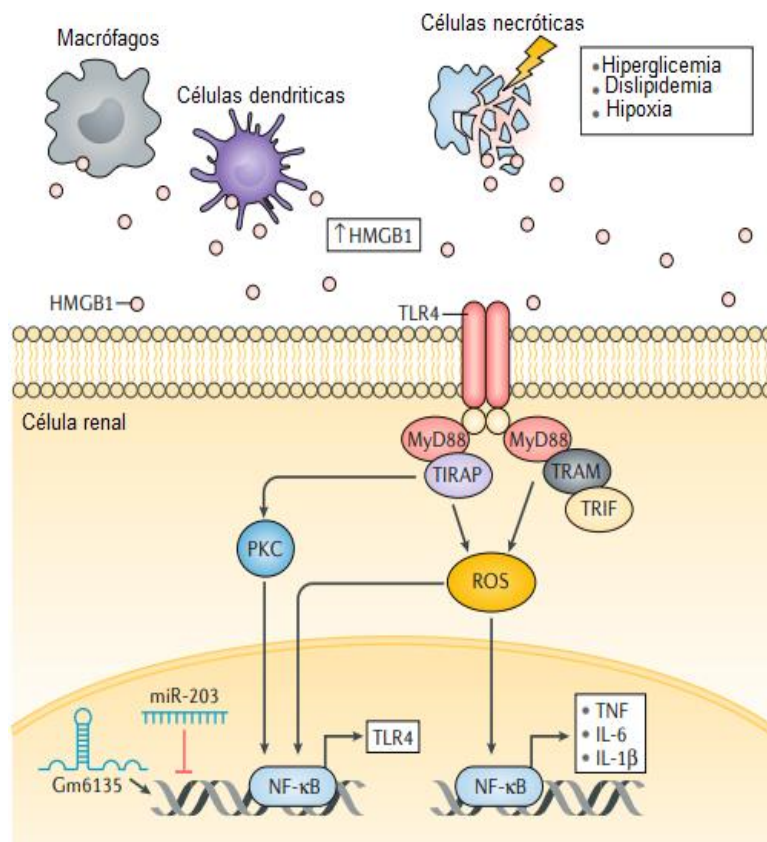
pacientes renales y modelos experimentales, en correlación con el infiltrado inflamatorio y las lesiones renales. Otra quimicina importante es CCL5 o RANTES, un factor quimiotáctico para células T, eosinófilos y basófilos, que se expresa en varios tipos celulares renal (mesangiales glomerulares y túbuloepiteliales), cuyos niveles se encuentran elevados en modelos experimentales y pacientes con diabetes (Chang et al., 2020).

### **3.2 Vía de señalización implicada en la inflamación**

La respuesta inflamatoria es mediada por diversas vías de señalización intracelular que regulan la activación de factores nucleares que coordinan la transcripción de diversas moléculas inflamatorias. El factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), es un factor clave en la transcripción de numerosos genes que promueven el daño renal durante la ND. Está integrado por cinco miembros (p50, p52, p65/RelA, c-Rel y RelB) que comparten un dominio N-terminal de homología Rel responsable de la unión al DNA y de la homo- y heterodimerización. Entre los numerosos estímulos que activan la vía NF- $\kappa$ B destacan varias citocinas, factores de crecimiento, moléculas asociadas a patógenos y a daño como los receptores tipo toll (TLRs) y Receptores tipo Nod (NLR), el estrés metabólico como glucosa elevada, AGE, lipoproteínas, especies reactivas de oxígeno (ROS), diversos mediadores inmunes como las inmunoglobulinas e incluso la proteinuria (Sanz et al., 2010; Song et al., 2019).

La activación de los TLRs a través de la unión de sus ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico (HSP), fibronectina, la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) entre otros conducen a la activación de NF- $\kappa$ B. El ligando promueve la dimerización de TLR4, que lleva al acoplamiento y una serie de fosforilaciones de proteínas adaptadoras como el factor de dimerización mieloides 88 (MyD88), la proteína asociada que contiene el dominio del receptor toll/IL-1 (TIRAP) y la proteína adaptadora que contiene el dominio del receptor toll/IL-1 (TRAM) y/o TRIF, que ocurren en el dominio del receptor

toll/IL-1 de los TLRs. Dependiendo de la naturaleza del adaptador que se emplee, éste se une a la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK4, IRAK1, IRAK2, TBK1 y IKK), las cuales, a su vez, se unen al factor asociado al receptor del TNF-6 (TRAF-6) para activarlo y estimular a la cinasa 1 activada por TGF- $\beta$ 1 (TAK1); esta cinasa pone en marcha la señalización por la proteína cinasa MAKK, quien fosforila a otras cinasas generar la activación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Esquema 3) e iniciar la sobrerregulación de moléculas proinflamatorias. TLR4 es expresado en células renales como podocitos, células mesangiales y tubulares epiteliales (Panchapakesan et al., 2018).



**Esquema 3.** Activación y señalización de TLR4 en células renales en la ND. En respuesta a un estímulo diabético como la hiperglicemia, la dislipidemia, la hipoxia, macrófagos, células dendríticas y células necróticas liberan ligandos endógenos que llevan a la activación y dimerización del TLR4 y el reclutamiento de moléculas adaptadoras como MyD88, TRAM, TIRAP, TRIF que fosforilan e inducen la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la síntesis de moléculas proinflamatorias. Tomado y modificado de Sydney (2020) DOI: 10.1038 / s41581-019-0234-4

Se ha destacado el papel esencial de los TLRs, especialmente el TLR2 y TLR4 en la ND, por lo tanto, la reducción de la respuesta inflamatoria asociada con los TLRs puede proporcionar un nuevo enfoque terapéutico en la enfermedad renal diabética. En un modelo de ratón de ND avanzada. La administración del antagonista de TLR4 disminuyó significativamente la albuminuria, el nitrógeno ureico en sangre, la hipertrofia glomerular, la glomeruloesclerosis y la lesión tubulointersticial, con un efecto relacionado con el deterioro en los niveles de CCL-2, CCL5, TGF- $\beta$ 1 y la actividad de NF- $\kappa$ B (Lin et al., 2013).

#### **4. Fibrosis y daño renal diabético**

Además de la inflamación y el estrés oxidante, muchos grupos han propuesto que atacar a la fibrosis puede ser una forma efectiva de retrasar aún más el deterioro funcional de la ND. La fibrosis renal generalmente resulta de la inflamación crónica a través de la producción de varias moléculas, como factores de crecimiento, angiogénicos, citocinas profibrogénicas y proteinasas. Todos estos factores estimulan la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) como colágenos, fibronectina, y lamininas, entre otros a través, de la activación de miofibroblastos, macrófagos y la transición epitelio mesénquima (TEM), lo que resulta en fibrosis renal y se reconoce como una característica patológica común de enfermedades renales crónicas que conducen al desarrollo de ERET (Lv et al., 2018).

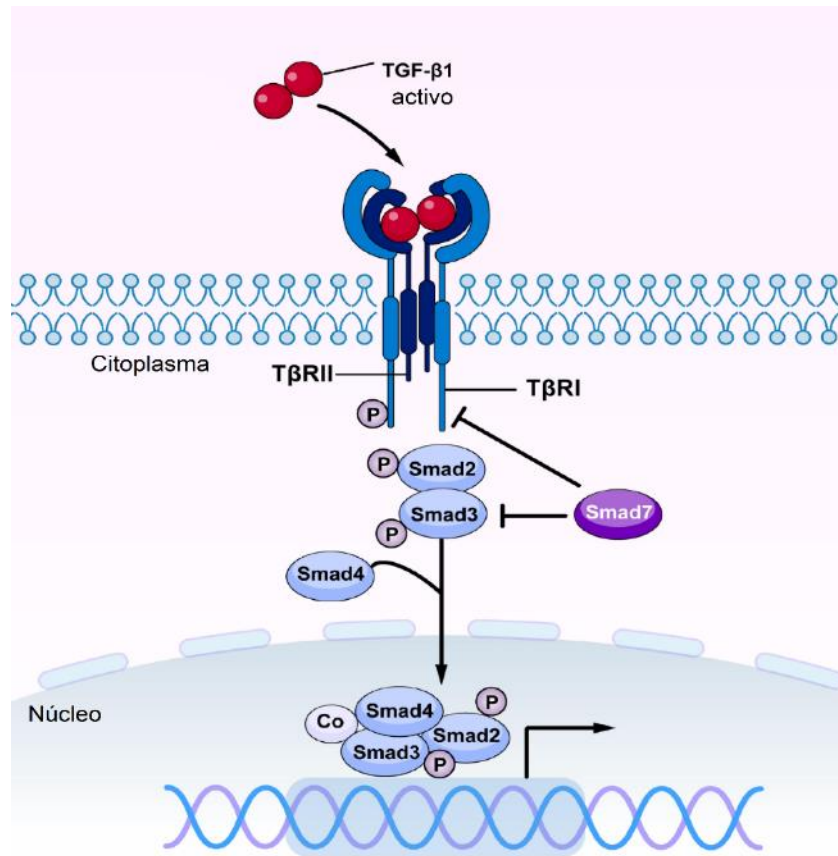
La mayoría de los estudios asignan un papel clave en la progresión fibrótica la señalización mediada por TGF- $\beta$ 1, que ejecuta su función biológica mediante la activación y fosforilación de una familia de proteínas Smads (por su sigla en inglés Mothers Against Decantaplegic homolog). El TGF- $\beta$ 1 es el más abundante y puede ser secretada por células renales y células inflamatorias infiltradas y su acción es autocrina o paracrina. Los factores que regulan la expresión y señalización de TGF- $\beta$ 1 son la hiperglicemia, angiotensina II, AGEs, proteínas del complemento y el estrés oxidante (Chen et al., 2018).

#### 4.1 El TGF- $\beta$ 1 está implicado en la señalización fibrótica durante la ND

La señalización de mediada por TGF- $\beta$  (Esquema 4) es a través de la unión a su receptor de membrana tipo II (T $\beta$ RII), esta unión da como resultado la fosforilación y reclutamiento del receptor TGF- $\beta$ 1 tipo I (T $\beta$ RI) formando un complejo el cual fosforila a Smad2 y Smad3 que se unen a Smad4. Este complejo de Smads se transloca al núcleo y se une a elementos de unión Smad y regula la transcripción de genes como colágenos, fibronectina, actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA) y Smad7 (Ma et al., 2019).

Las proteínas Smad se clasifican en tres subgrupos. Smads reguladas por receptor (R-Smads) donde se incluyen Smad 1, 2, 3, 5 y 8. El segundo subgrupo son Smad cooperadoras (co-Smad) como Smad4 que forma un complejo heterotrimérico con las R-Smads fosforiladas, este complejo se transloca al núcleo y regula la expresión de genes. El tercer subgrupo son las Smads inhibitoras (I-Smads) como Smad7 que inhiben la señalización de la familia TGF- $\beta$ 1 a través de la interacción de los receptores tipo I y así compiten con los R-Smads (Gu et al., 2020). El ratón Knockout de Smad 3 o un inhibidor específico retrasa la transición epitelio mesénquima de las células tubulares y la fibrosis en un modelo de diabetes inducida por estroptozotocina (Li et al., 2010). Esto sugiere que la señalización TGF- $\beta$ 1/Smad3 tienen actividades críticas en la fibrosis renal diabética

Los mecanismos de la fibrosis regulada por TGF- $\beta$ 1 en la ND son multifactoriales e implican (1) el reclutamiento y activación de macrófagos, (2) la activación de miofibroblastos, (3) la sobreexpresión de componentes de MEC, (4) la reducción en la degradación de componentes de la MEC y la (5) Transición epitelio-mesénquima de las células endoteliales. Por lo tanto, TGF- $\beta$ 1 tiene una función crítica durante los eventos fibróticos en la ND (Zhao et al., 2020).



**Esquema 4.** Activación y señalización de TGF-β1 en la fibrosis renal. La forma TGF-β1 activa se une a su receptor II (TβRII), que activa la cinasa del receptor I (TβRI) que fosforila a Smad2 y Smad3 formando un complejo que se unen con Smad4 y se translocan al núcleo. TGF-β1 también activa el factor regulador de ubiquitina Smad (Smurf) para degradar Smad7 a través de la modificación post-transcripcional, mejorando así la señalización de TGF-β / Smad3. Por lo tanto, el desequilibrio de las señales de Smads es una clave para la fibrogénesis. Tomado de Gu (2020) doi:10.3389/fcell.2020.00187

## 5. Potencial terapéutico del ácido retinoico all trans en la protección del daño renal

El ácido retinoico all-trans (ATRA), un metabolito activo de la vitamina A, pertenece a la familia de retinoides. El ATRA juega un papel clave en la nefrógenesis durante la ramificación de la yema uretral y contribuye al número final de nefronas (Mallipattu et al., 2015). Las actividades pleiotrópicas de ATRA están mediadas por dos clases de receptores nucleares, el receptor de ácido retinoico (RAR; α, β y γ) y los receptores de retinoide X (RXR; α, β y γ), que conducen a la activación de los elementos de respuesta al ácido

retinoico (RARE) (Das et al., 2013). El ATRA 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 ATRA. Se ha descrito el potencial terapéutico al reducir la progresión de enfermedades renales (Kinoshita et al., 2003; Juang et al., 2014). Previamente reportamos que el ATRA es un agente nefroprotector en un modelo de falla renal aguda (Pérez et al., 2004) y su administración ha mostrado un efecto antioxidante que previene la pérdida de las proteínas de la unión estrecha Claudina 2 y Claudina 5 en la ND (Molina-Jijón et al., 2015). Se ha demostrado que alteraciones en algunos componentes de la señalización del ATRA están involucrados en la evolución de la ND. Basu and Basualdo (1999) han reportado baja concentraciones de vitamina A plasmática en pacientes con ND y baja cantidad de la proteína de unión a retinol (siglas en inglés RBP) en tejido renal de ratas diabéticas. Starkey y cols (2010), describieron que existen alteraciones en el metabolismo del ATRA en condiciones diabéticas, que conllevan a una disminución en la concentración renal de ATRA y sugirieron que esto sucede de manera frecuente en pacientes con diabetes tipo 2 que manifiestan daño renal. Se ha informado que el RAR- $\alpha$  y RXR- $\alpha$  están regulados negativamente en cardiomiocitos expuestos a altas concentraciones de glucosa y en ratas diabéticas (Guleria et al., 2013). Estos hallazgos sugieren que la administración exógena de ATRA podría ejercer un efecto terapéutico en el daño renal inducido por la diabetes. Con base en los hallazgos previamente descritos, se utilizó al ATRA para evaluar su efecto sobre el daño renal, la inflamación, la fibrogénesis y su señalización durante la nefropatía diabética temprana.

## **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. Se han descrito diversos mecanismos en la progresión de la ND, entre los que se destacan: el estrés oxidante, la inflamación y la fibrosis, los cuales llevan a la disfunción renal. Una vez establecida esa disfunción, no es posible revertirla. Por lo anterior, es importante proponer terapias que modulen estos mecanismos y así disminuir su progresión desde etapas tempranas de la enfermedad.

Por esta razón, en el presente estudio se evaluó si el ATRA ejerce efecto antiinflamatorio y antifibrogénico en la ND temprana y en consecuencia si reduce la progresión del daño renal.



### **III. Hipótesis**

El ATRA disminuirá el proceso inflamatorio inducido por la hiperglucemia, mediante la inhibición de la señalización TLR4/NF- $\kappa$ B y por lo tanto atenuará un evento fibrogénico al regular de forma negativa la señalización de TGF- $\beta$ 1/Smad3 en etapas iniciales de la nefropatía diabética.

#### **IV. Objetivo general**

Evaluar el proceso inflamatorio y fibrogénico en la nefropatía diabética experimental temprana y su posible modificación por el ácido retinoico all-trans.

#### **V. Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto del ATRA en el daño renal durante la ND temprana.
- Evaluar el proceso inflamatorio en la ND temprana y analizar el efecto del ATRA sobre la expresión de proteínas pro-inflamatorias (citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento) en los diferentes segmentos de la nefrona (glomérulo, túbulo proximal, túbulo distal).
- Estudiar un posible mecanismo molecular de acción del ATRA en el proceso inflamatorio a través de la regulación negativa de la señalización TLR-4/NF- $\kappa$ B en la ND temprana.
- Evaluar la fibrogénesis renal en un modelo de diabetes experimental temprana y su posible modificación por el ATRA sobre: el reclutamiento de macrófagos, aumento de células  $\alpha$ -SMA+ y la expresión de colágeno tipo I y IV, Laminina- $\beta$ 1.
- Estudiar un posible mecanismo molecular de acción del ATRA en el proceso fibrogénico a través de inhibir la señalización TGF $\beta$ 1 /Smad3.
- Evaluar la expresión del receptor a ácido retinoico alfa (RAR- $\alpha$ ) en el tejido renal de ratas diabéticas y su posible modificación a través de su fosforilación.

## VI. Materiales y métodos

### 1. Reactivos

El ácido retinoico all-trans, la estreptozotocina, el percoll, la albúmina de suero bovino (BSA), el aceite de cacahuete, el metanol, el citrato, el sulfato de amonio, la colagenasa tipo II, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y el anticuerpo anti-TGF $\beta$ 1 (ratón) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Los anticuerpos primarios no conjugados anti- $\beta$ 2 microglobulina (ratón), anti-lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, conejo), anti-deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH, ratón), anti-cotransportador de sodio-glucosa 2(SGLT2, cabra), anti-claudina-8 (ratón), anti-laminina  $\beta$ 1 (conejo), anti-claudina-2 (conejo), anti-RAR- $\alpha$  (ratón), anti-colágeno tipo I (conejo), anti-colágeno tipo IV(ratón) se compraron en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EUA). Los anticuerpos anti-p65 fosforilado en la serina 536 (NF- $\kappa$ B, conejo), anti-TLR4 (ratón), anti-IL-6 (ratón), anti-I $\kappa$ B total (conejo), anti-F4/80 (conejo), anti-Smad3 fosforilado en la serinas 423 y 425), y anti-Samd7 (ratón) se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (conejo), anti-HMGB1 (ratón), y anti-JNK fosforilado en la treonina 183 y tirosina 185) se compraron en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). anti- $\alpha$ -SMA (ratón) y anti-serina fosforilada se compraron en Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa anti-conejo, anti-ratón y los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 594 anti ratón, anti-conejo y anti-cabra, el anticuerpo primario anti-occludina (conejo), la proteína G recombinante agarosa se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). El arreglo de anticuerpos inflamatorios en una matriz (RatCytokine) se compró en Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Albumina libre de IgG se adquirió en Research Organics (Cleveland, OH, EUA).

## 2. Animales experimentales

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 #0178-16).

Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar con un peso corporal entre 200-250 g. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12 h/12 h) a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura ambiente y  $50\pm 5\%$  de humedad ambiental. La ingesta de agua y alimento estándar de roedor (PicoLa® Rodent Diet 20, St Louis, MO, EUA), que contiene 15 unidades internacionales de vitamina A/g fue administrado *ad libitum*.

## 3. Diabetes experimental

El modelo experimental de diabetes tipo 1 se indujo mediante la inyección intravenosa de una dosis única de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal) diluida en amortiguador de citratos fresco, pH 6.0. Los animales no diabéticos se inyectaron vía intravenosa con un volumen igual de amortiguador de citratos, pH 6.0. La inducción de la diabetes fue confirmada tres días después de la inyección con STZ, se midió el nivel de glucemia con un glucómetro de la marca OneTouch Ultra® (Milpitas, CA, EUA), las ratas se consideraron diabéticas cuando los niveles de glucemia fueron  $\geq 300$  mg/dL en condición de ayuno. Se monitorio el peso y lo niveles de glucosa de los animales antes (día 0) y a los días 3, 7, 14 y 21 después de la administración de STZ.

## 4. Diseño experimental

Las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos experimentales:

- i. Control (**CTL**): Se inyectó el vehículo de la STZ (amortiguador de citratos pH 6.0) vía intravenosa.
- ii. Diabético (**DBT**): Se inyectó STZ (60 mg/kg del peso del animal) vía intravenosa.

- iii. Diabético tratado con ácido retinoico all-trans (**DBT+ATRA**): Animales diabéticos tratados con una dosis diaria intragástrica de ATRA (1mg/kg de peso del animal) del día 3 al 21 después de la inyección de STZ vía intravenosa.
- iv. Control tratado con ATRA (**ATRA**): Animales sanos tratados con dosis diaria de ATRA (1mg/kg de peso del animal) del día 3 al 21 después de la inyección de amortiguador de citratos pH 6.0 vía intravenosa.

El ATRA se disolvió en aceite de cacahuete. Todos los animales se sacrificaron en el día 21 después de la inyección con STZ.

### **5. Obtención muestras de orina y suero**

Para recolectar las muestras urinarias de 24 h, las ratas se metieron individualmente en jaulas metabólicas 24 h previas al sacrificio y se midió el volumen urinario. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital de sodio (30 mg/kg vía intraperitoneal) y se recolectó la sangre antes del sacrificio por punción cardiaca. La sangre se centrifugó (800x g durante 10 min) para obtener el suero. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta el momento del ensayo.

### **6. Parámetros de función renal**

Para evaluar la función renal se midió la proteinuria, la tasa de filtración glomerular a través de la depuración de creatinina y la natriuresis (excreción anormal de sodio).

- i. Proteinuria: La concentración total de proteínas urinarias se analizó mediante el método de Lowry (BioRad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

- ii. La depuración de creatinina: Se evaluó la concentración de creatinina en suero y en orina mediante la reacción colorimétrica de Jaffé usando ácido pícrico (Hervey et al., 1953), se estimó la tasa de filtración glomerular a través de la ecuación estándar:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{[\text{Creatinina}]_{\text{Urinaria}}}{[\text{Creatinina}]_{\text{Plasmática}}} \times \text{Flujo urinario}$$

- iii. Natriuresis: La excreción urinaria de sodio y su concentración sérica se midió por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3100 con una llama de acetileno), y se calculó la fracción excretada de  $\text{Na}^+$  (FeNa) usando la ecuación estándar:

$$\text{Fracción excretada de sodio (FeNa)} = \frac{\text{Depuración de Na}^+}{\text{Depuración de creatinina}} \times 100$$

## 7. Obtención del tejido renal

Los riñones de cada animal se removieron y criopreservaron con 2-metilbutano. Finalmente se realizó un aislamiento y enriquecimiento de la fracción glomerular y tubular, las cuales se procesaron para Western blot (WB). Se realizaron cortes de tejido renal para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

## 8. Histología en cortes de tejido renal

El tejido renal fue fijado por inmersión en formaldehído al 10%, se realizó la técnica de inclusión en parafina y se cortaron secciones del tejido (5  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente se realizó la tinción con hematoxilina y con un colorante de contraste eosina (H&E). El volumen glomerular se determinó por microscopía óptica (Olympus BX43F microscope, Tokio, Japón). El área de la superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) de 12 glomérulos corticales de cada grupo experimental se determinó con imágenes digitales usando el software Image J 4.5. El

volumen glomerular se calculó usando la fórmula de Weibel-Gómez bajo los factores de corrección como se describe Lane col (1992) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen glomerular} = \text{Area}^{1.5} \times 0.75 + 0.21$$

### **9. Aislamiento de glomérulos**

Los glomérulos se aislaron mediante la técnica de tamizado gradual como lo describió previamente Molina-Jijón y col (2013). La corteza renal se separó de la médula y se homogenizó manualmente y se pasó a través de una malla de acero inoxidable con un tamaño de poro de 117  $\mu\text{m}$  (Cat. No. 8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA.) 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  $\mu\text{m}$  (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 que se resuspendió en cocktail de inhibidores de proteasas (Complete 1x; Boehringer Mannheim, Alemania) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 20 g/mL). La concentración de proteínas glomerulares se analizó mediante el método de Lowry (BioRad Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories). El aislamiento de glomérulos se confirmó mediante análisis de Western blot de una proteína específica del segmento: nefrina.

### **10. Aislamiento de túbulos proximales y distales**

Las suspensiones de poblaciones enriquecidas de células de túbulos proximales y distales se aislaron de la corteza renal mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll, como se describió previamente (Molina-jijón et al., 2013). Los homogenizados de cada grupo experimental 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 BSA, 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 BSA al 10%. Las muestras se gasificaron durante 20 min con 95% de CO<sub>2</sub> y 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 BSA 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. La concentración total de cada segmento se analizó mediante el método de Lowry (BioRad Protein Assay Kit; BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). El contenido de cada banda se confirmó mediante observación en un microscopio de luz y por análisis de Western blot usando proteínas específicas de cada segmento: claudina-2 túbulo proximal y claudina-8 túbulo distal.

### **11. Análisis de Western blot**

Las muestras de proteínas (60 a 80 µg) o 24 µl de volumen de orina de cada animal y los marcadores de peso moleculares (Amersham Pharmacia Biotech) se cargaron en geles de



12 y 10% de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Amersham Bioscience). La unión no específica se bloqueó por incubación con 6% de leche descremada en polvo en PBS 1x que contiene 0.5% de Tween 20 o caseína al 3x en PBS-Tween 20, durante 1 h, a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas durante una noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-β2 microglobulina (1:500), anti-nefrina (1:2000), anti-claudina 2 y claudina 8 (1:500), anti-GAPDH (1:2000), anti-TNF-α (1:1000), anti-IL-6 (1:500), anti-HMGB1 (1:1500), anti-TLR4 (1:1500), anti-IκB-α (1:500), anti-fosfo p65 (1:1000), anti-p65 total (1:1000), α-SMA (1:1000), anti-laminina β1 (1:500), anti-colágeno tipo IV (1:2000), anti-colágeno tipo I (1:500), anti-TGF-β1 (1:500), anti-fosfo Smad3 (1:2000), anti-RAR-α (1:2000), anti-fosfo serina (1:1000), anti-Smad7 (1:2000), y anti-fosfo JNK (1:2500). 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 anteriormente. Después de tres lavados (con PBS con 0.05% de Tween 20 durante 10 min), las membranas se revelaron con el reactivo de detección Luminata™ Western HRP Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). La quimioluminiscencia se detectó mediante el sistema EC3 imaging system (UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK). La densitometría de las bandas se cuantificó usando Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

## **12. Inmunofluorescencia**

Se cortaron rebanadas transversales de riñón de 8 μm 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 rehidrataron 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  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM). Las muestras se bloquearon (1 h a temperatura ambiente) con 1% (v/v) de BSA libre de IgGs (1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, EUA) y se incubaron por una noche con los anticuerpos primarios anti fosfo p-65, anti-TLR4, anti-NGAL, anti-F4/80, anti- $\alpha$ -SMA, anti-fosfo Smad3 y anti-SGLT2 a una dilución 1:250. Se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcar los núcleos. Los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 594 anti ratón, anti-conejo y anti-cabra se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM (durante 10 min a temperatura ambiente) y finalmente se montaron las preparaciones con Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, EUA). Las inmunofluorescencias se analizaron con un microscopio confocal invertido (TCS-SP8, Leica, Heidelberg, Alemania). Las imágenes se cuantificaron como área teñida/marca ( $\mu\text{m}^2$ ) o núcleos positivos de células totales, se utilizó el software Leica TCS-SP2 (Heidelberg, Alemania). La translocación nuclear de fosfo p65 (NF- $\kappa$ B), fosfo p-Smad3 se cuantificó como el porcentaje de núcleos positivos de un número total de células en campos elegidos al azar de tres animales diferentes por grupo. Se contaron de 70 a 120 núcleos para condición experimental.

### **13. Arreglo de anticuerpos inflamatorios en una matriz (RatCytokine)**

Los niveles de moléculas inflamatorias se analizaron en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales aislados con un microarreglo de anticuerpos contra citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento acoplados a una membrana (Rat Cytokine Array C2, RayBio, Norcross, GA, EUA). Se siguieron las pautas del fabricante. Las membranas se revelaron con el reactivo de detección Luminata™ Western HRP Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). La quimioluminiscencia se detectó mediante el sistema EC3 imaging system (UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK). La densitometría cada señal se cuantificó usando Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD,

EUA), los resultados se ajustaron y normalizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **14. Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación (IP) del RAR- $\alpha$  se realizó a partir de enriquecimiento de glomérulos y túbulos proximales aislados con anti-RAR- $\alpha$  (10  $\mu$ g). Se incubaron lisados glomerulares y tubulares a una concentración de 1 mg de proteína por una noche a 4°C con 20  $\mu$ l perlas de proteína G-agarosa recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Las perlas de proteína G-agarosa se removieron mediante centrifugación (16 000 x g a 4°C durante 10 min). Los extractos se incubaron una noche a 4°C con 2.5 mg del anticuerpo inmunoprecipitante previamente unido a la proteína G-agarosa. En incubaciones paralelas, utilizamos un anticuerpo no relacionado (anti-occludina) como control negativo. 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.

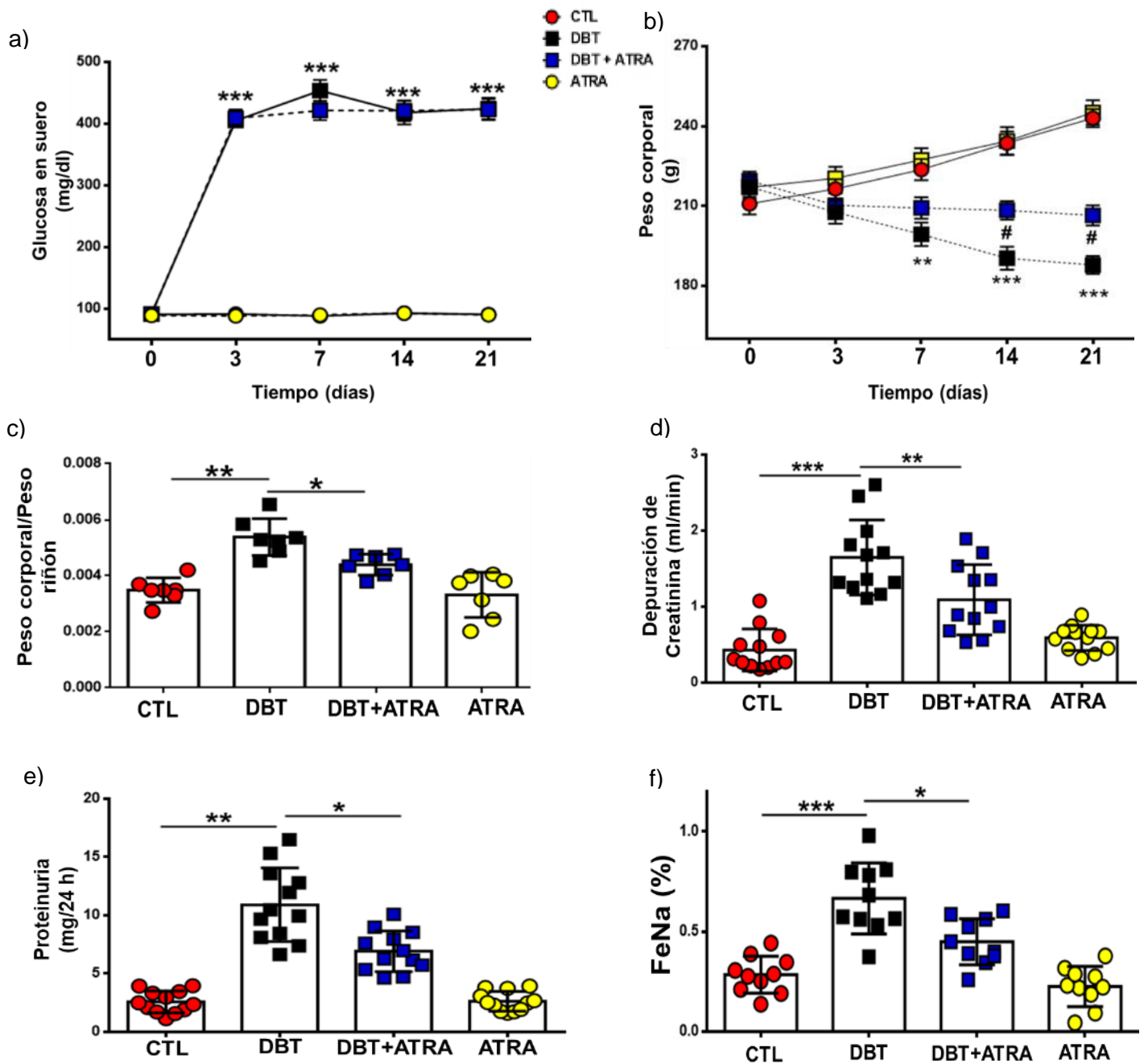
#### **15. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la desviación estándar (SD), y se analizaron con el programa Prism (GraphPad), usando la prueba de ANOVA de una vía y de dos vías, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p \leq 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 1. El ácido retinoico all-trans (ATRA) reduce el daño renal en ratas con ND temprana

Evaluamos el efecto del ATRA (1 mg/kg de peso corporal) en el desarrollo de la ND experimental. Se utilizaron cuatro grupos experimentales: CTL, DBT, DBT+ATRA y ATRA. Las ratas de los dos grupos diabéticos: DBT y DBT+ATRA presentaron una hiperglucemia constante a partir del día 3 después de la inyección con STZ de  $428.3 \pm 37.0$  mg/dl y  $421.5 \pm 34.5$  mg/dl respectivamente, comparados con los grupos no diabéticos: CTL  $89.1 \pm 2.8$  mg/dl y ATRA  $88.3 \pm 7.1$  mg/dl (Fig. 1a). Se mantuvieron concentraciones similares de glucosa en sangre en los grupos de animales hasta el final del periodo experimental (DBT: 416 mg/dl, DBT+ATRA: 408 mg/dl, CTL: 90 mg/dl y ATRA: 92 mg/dl). El tratamiento con ATRA en las ratas diabéticas no afectó los niveles de glucosa a lo largo del estudio. Por otro lado, se observó que el grupo DBT desarrolló una pérdida de peso significativa a partir de la primera semana después de la inyección con STZ hasta el día 21 del estudio (Fig. 1b). Además, presentaron una hipertrofia renal pues se observó un incremento en la relación del peso del riñón y el peso corporal comparados con los grupos no diabéticos (Fig. 1c). La condición diabética también reveló un incremento en la depuración de creatinina, en la concentración de proteínas urinarias y en la fracción excretada de  $\text{Na}^+$  (FeNa) comparado con los grupos no diabéticos (Fig. 1d-f). Mientras tanto, la administración del ATRA en ratas diabéticas marcadamente redujo estos parámetros y parcialmente atenuó la pérdida de peso. Estos resultados indican que el tratamiento con ATRA aminora el daño glomerular y la disfunción tubular en ratas diabéticas, y su efecto benéfico fue independiente al control glicémico.

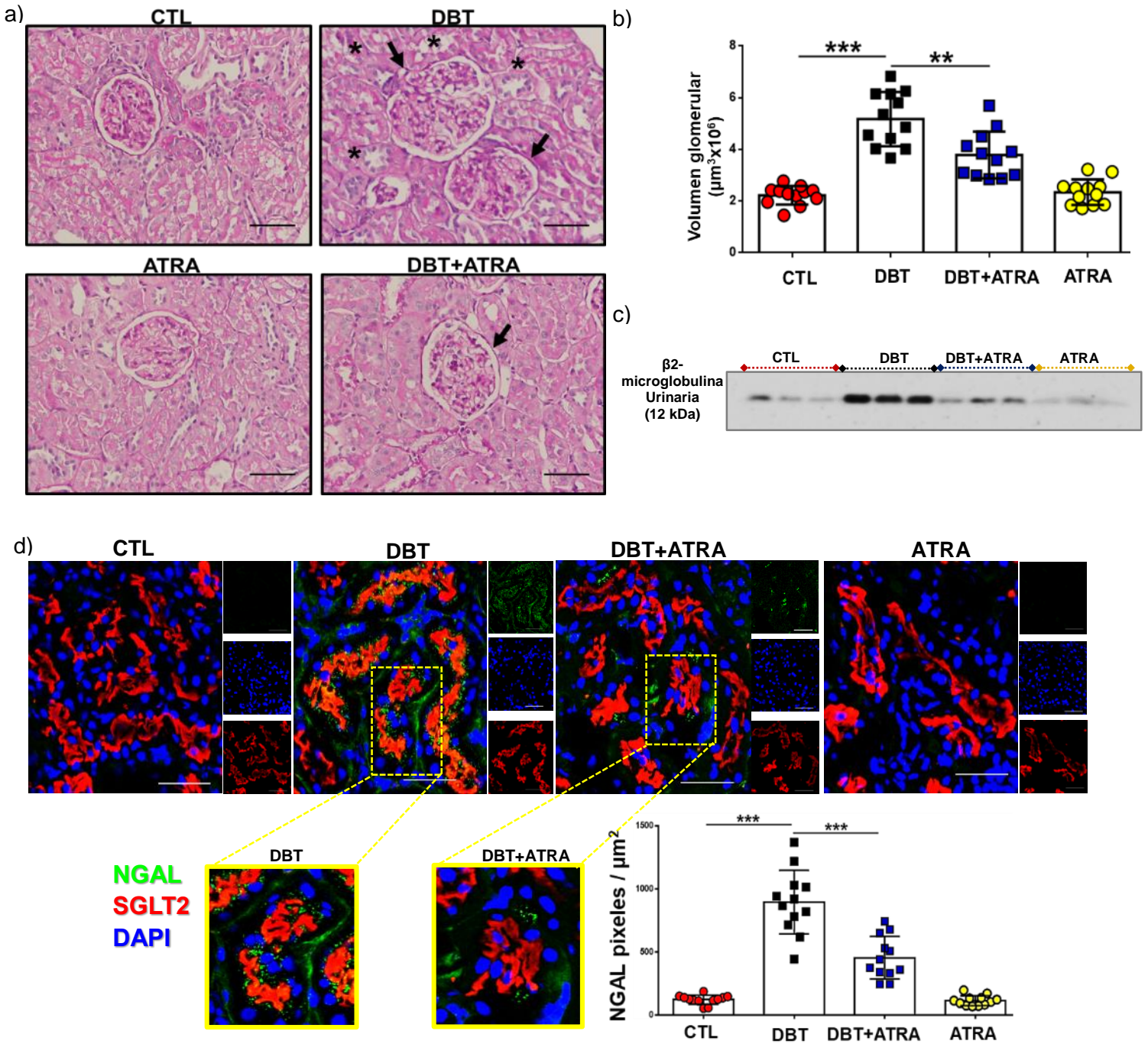


**Figura. 1. El tratamiento con ATRA aminora la pérdida de peso, proteinuria, hipertrofia renal y la excreción fraccional del sodio inducidos por la diabetes.**

(a) Niveles de glucosa en sangre, (b) peso corporal de los animales fue monitoreado a los 0, 3, 7, 14 y 21 días después de la inyección de STZ. En el día 3 del estudio las ratas fueron tratadas con ATRA (1 mg/kg) hasta el día 21. El ATRA no afecto los niveles de hiperglucemia en los grupos diabéticos. Sin embargo, el tratamiento con ATRA previno la pérdida de peso inducida por la diabetes. (c) hipertrofia renal (relación peso corporal/peso del riñón), (d) tasa de filtración glomerular, (e) concentración de proteínas en orina y (f) fracción excretada de sodio (FeNa). Fueron incrementados en la condición diabética, mientras que el tratamiento con ATRA redujo significativamente los parámetros descritos a los 21 días del experimento. Los datos están expresados como media±desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una y dos vías seguida por prueba de Tukey. n=12 animales por grupo. CTL vs DBT: \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05, DBT vs DBT+ATRA: #p<0.05

## **2. Efecto del tratamiento de ATRA en las lesiones patológicas de la ND temprana**

En relación con los resultados de función renal, se identificaron cambios morfológicos a través de la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en cortes de tejido renal de los cuatro grupos experimentales (Fig. 2a). En las ratas diabéticas se observó un incremento del volumen glomerular (asteriscos negros) comparados con los grupos no diabéticos, lo que sugiere una hipertrofia glomerular. También se observó una dilatación del lumen tubular (flechas negras) en ratas del grupo DBT. Mientras tanto, el tratamiento con ATRA disminuyó los cambios histopatológicos renales en ratas diabéticas (Fig. 2a, 2b). El daño renal temprano en el grupo experimental diabético fue confirmado a través del análisis de biomarcadores como la expresión de la  $\beta$ 2-microglobulina urinaria y la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en tejido renal. Estos marcadores se han utilizado como indicadores tempranos de daño tubular renal. Se observó un incremento en la excreción urinaria de la  $\beta$ 2-microglobulina en las ratas del grupo DBT comparadas con los grupos no diabéticos (Fig.2c). El análisis de inmunofluorescencia reveló un aumento en la expresión del NGAL en túbulos proximales del grupo diabético comparado con los grupos no diabéticos, debido a que existió una co-localización de NGAL (marca verde) con el cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) un marcador específico del borde en cepillo de los túbulos proximales (marca roja, Fig.2d). Por el contrario, el tratamiento con ATRA en ratas diabéticas marcadamente disminuyó estas alteraciones. Nuestros resultados sugieren que después de 21 días de la inducción de diabetes con STZ existen cambios estructurales donde se incluye la hipertrofia glomerular y tubular, mientras que el tratamiento con ATRA mostro efectos nefroprotectores en la preservación de la morfología y daño a nivel glomerular-tubular.



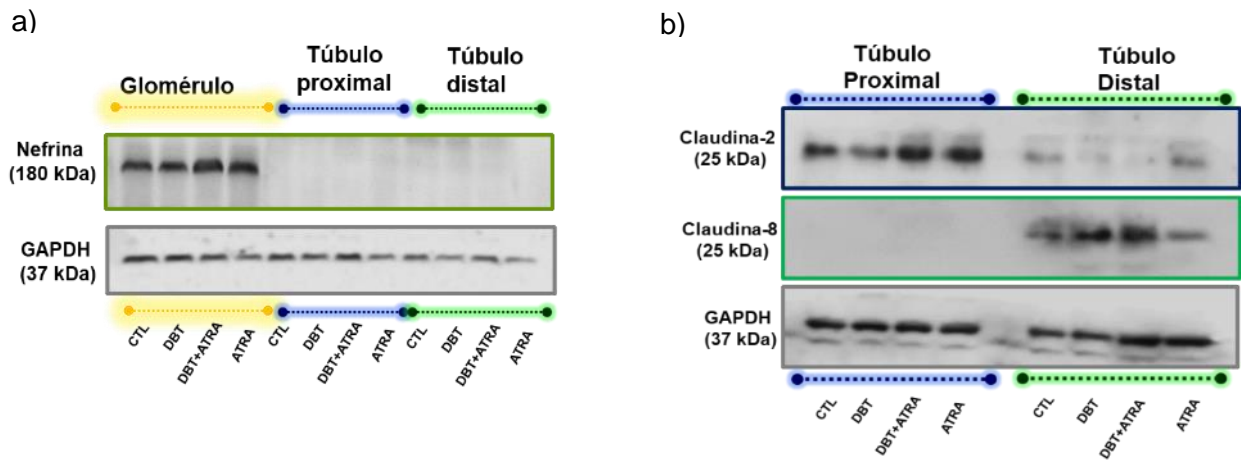
**Figura 2. El tratamiento con ATRA atenúa el incremento de biomarcadores tempranos en la ND.**

(a) Imágenes histológicas de la tinción H&E en cortes renales de los grupos experimentales, (b) análisis de volumen glomerular, (c) Western blot de la excreción urinaria de la  $\beta$ 2-microglobulina (se utilizó el mismo volumen urinario de cada animal en cada carril, 17  $\mu\text{l}$ ), (d) Inmunofluorescencia de lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, marca verde), que colocalizó con el cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2), un marcador del borde en cepillo de los túbulos proximales (marca roja). El núcleo fue contrateñido con DAPI (marca azul). Se realizó un análisis asistido por computadora basado en imágenes para estimar la cantidad de NGAL en secciones de túbulos proximales. La administración del ATRA disminuyó los cambios morfológicos a los 21 días de diabetes que incluye la hipertrofia glomerular (flechas negras), dilatación del lumen tubular (asteriscos negros) y un incremento en la expresión de la  $\beta$ 2-microglobulina urinaria y NGAL. Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey.  $n=12$  secciones tubulares o glomerulares por grupo. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Barra de escala equivalente a 50  $\mu\text{m}$

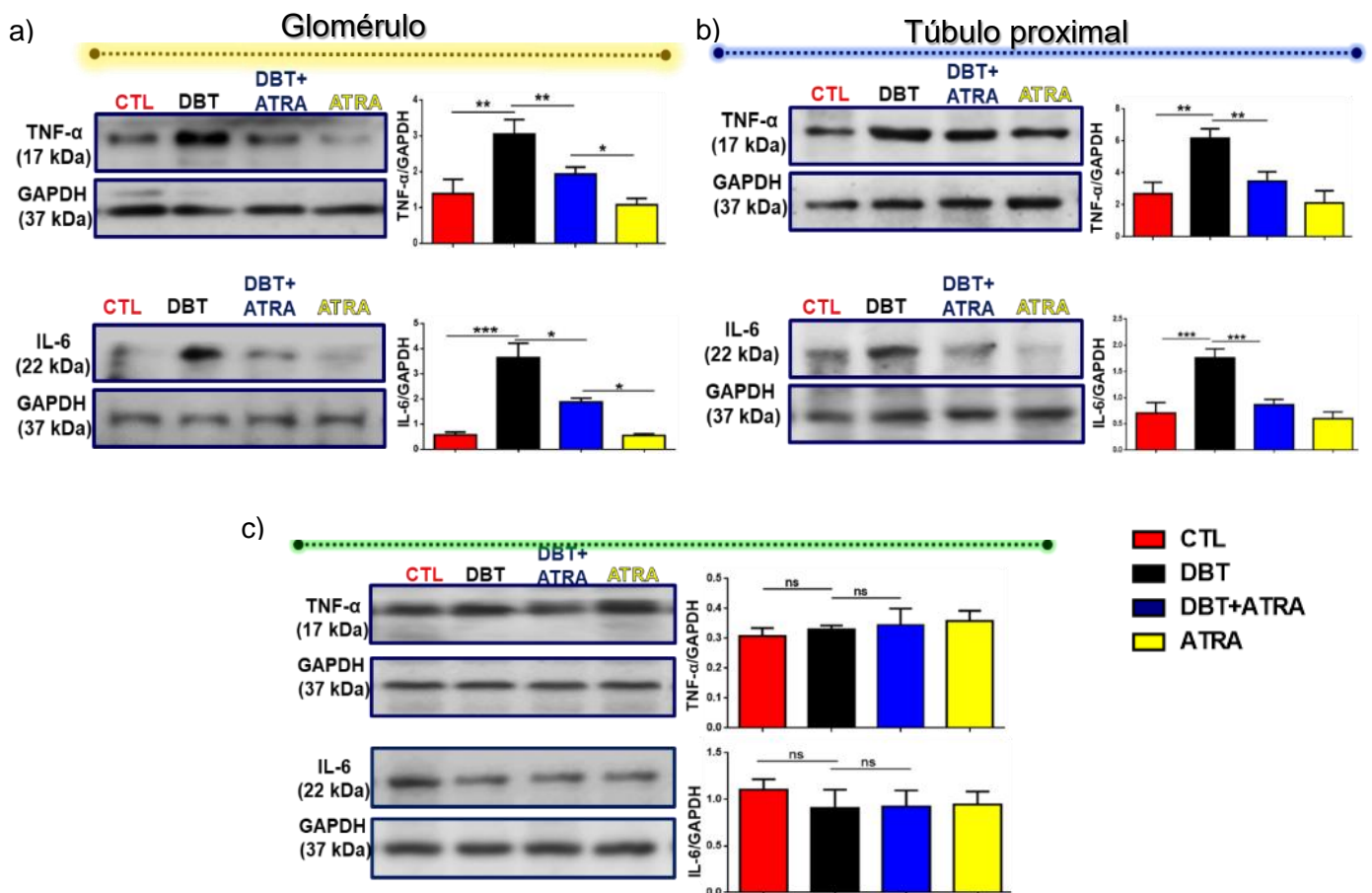
### **3. La administración de ATRA aminora la sobreexpresión de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en glomérulos y túbulos proximales aislados de ratas con ND temprana**

Nuestros resultados descritos anteriormente revelan que los animales del grupo DBT desarrollaron daño glomerular y tubular. En diversos estudios se ha demostrado la relación entre las moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1 y TGF- $\beta$ 1 como biomarcadores de daño renal en pacientes diabéticos (Saraheimo et al, El Mesallamy et al). Para analizar si la inflamación juega un papel clave en el daño renal temprano se analizaron marcadores inflamatorios en los diferentes segmentos de la nefrona (glomérulo, túbulo proximal y túbulo distal). Además, se exploró si el ATRA participa como un agente antiinflamatorio en la ND temprana. Los enriquecimientos de los segmentos de la nefrona fueron validados por el análisis de marcadores específicos: nefrina para el enriquecimiento glomerular (Fig. 3a), claudina 4 y 8 para los túbulos proximales y distales (Fig. 3b), respectivamente. Se analizó la expresión por Western blot de TNF- $\alpha$  e IL-6 en los segmentos de la nefrona. En el grupo diabético se observó un incremento en la expresión de estas dos moléculas proinflamatorias en el segmento glomerular y en los túbulos proximales comparados con los grupos no diabéticos (Fig. 4a-b). En contraste con lo anterior, la diabetes no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en los túbulos distales comparado con los grupos no diabéticos (Fig. 4c). Estos datos sugieren que las moléculas proinflamatorias están involucradas en el daño renal a nivel de glomérulo y túbulos proximales y no es así en la nefrona distal durante la nefropatía diabética temprana. Por otra parte, la administración de ATRA en ratas diabéticas redujo la expresión de estas moléculas, sugiriendo un papel como agente antiinflamatorio en el daño renal temprano.





**Figura 3. Enriquecimiento de los segmentos de la nefrona.** Los glomérulos, túbulos proximales y distales fueron aislados de la corteza renal como se describe en la sección de materiales y métodos. Western blot de (a) nefrina, marcador glomerular (b) claudina 2 y claudina 8, marcadores específicos túbulos proximales y distales, respectivamente. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga.



**Figura 4. Efecto del ATRA en la expresión de TNF-α e IL-6 en las etapas iniciales de la ND.** WB y análisis densitométricos de TNF-α e IL-6 en (a) glomérulos, (b) túbulos proximales y (c) túbulos distales aislados de los cuatro grupos experimentales. (Ver continuación)

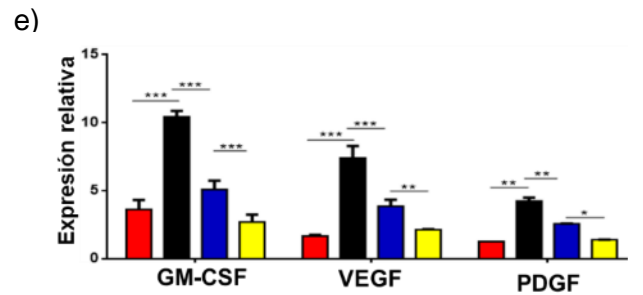
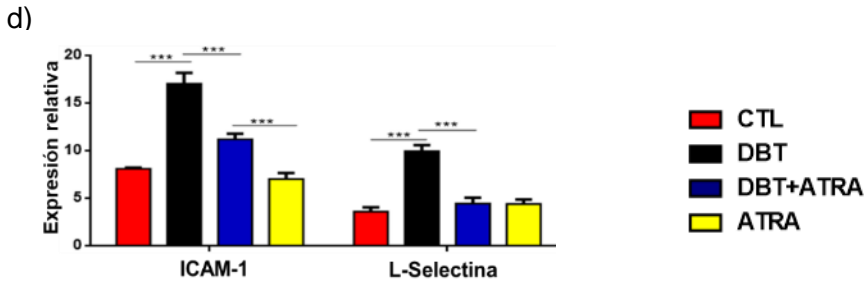
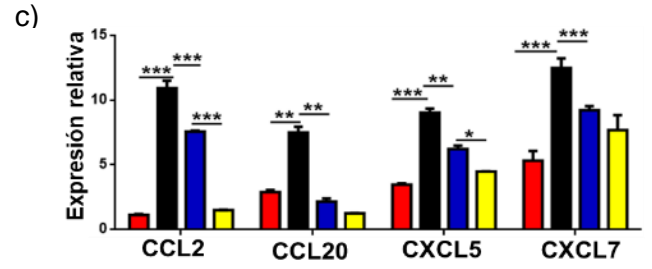
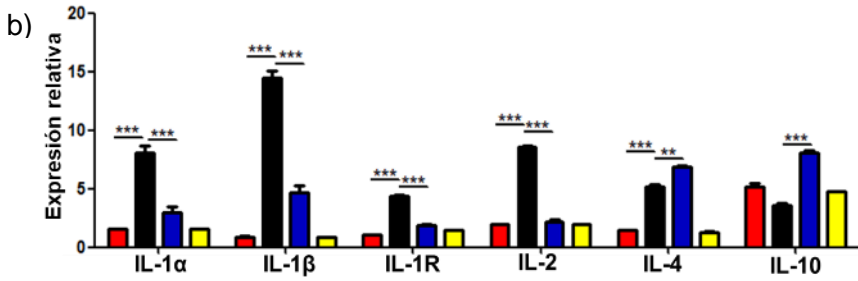
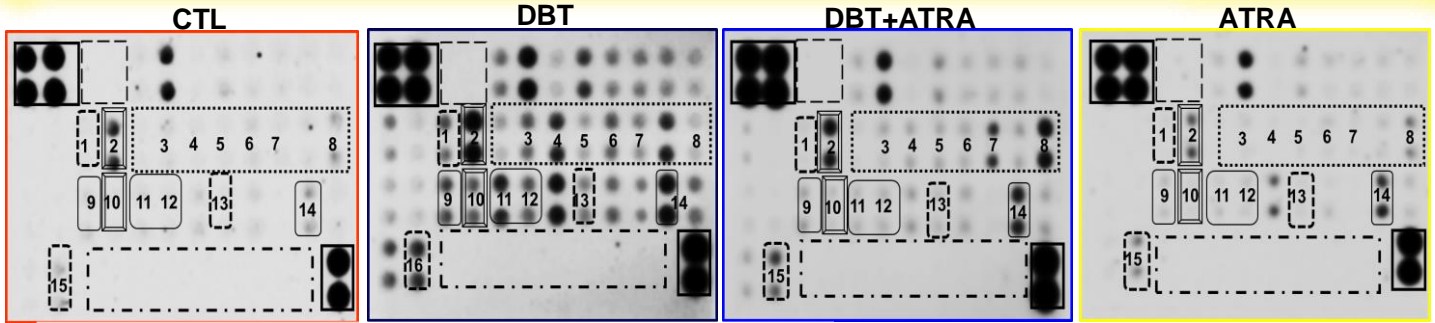
**Figura 4. Continuación** La administración de ATRA redujo la sobreexpresión de estas moléculas proinflamatorias inducidas en la condición diabética. La hiperglucemia no modificó la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el segmento distal de la nefrona. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. Los resultados son imágenes representativas de tres experimentos independientes, y los valores son expresados como la media  $\pm$ SD \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\*  $p$ < 0.001

#### **4. La administración de ATRA reduce el proceso inflamatorio inducido por la ND temprana**

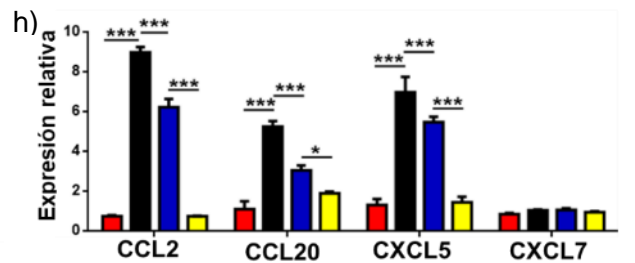
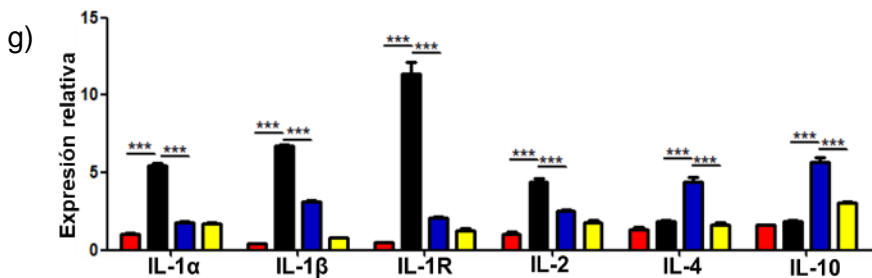
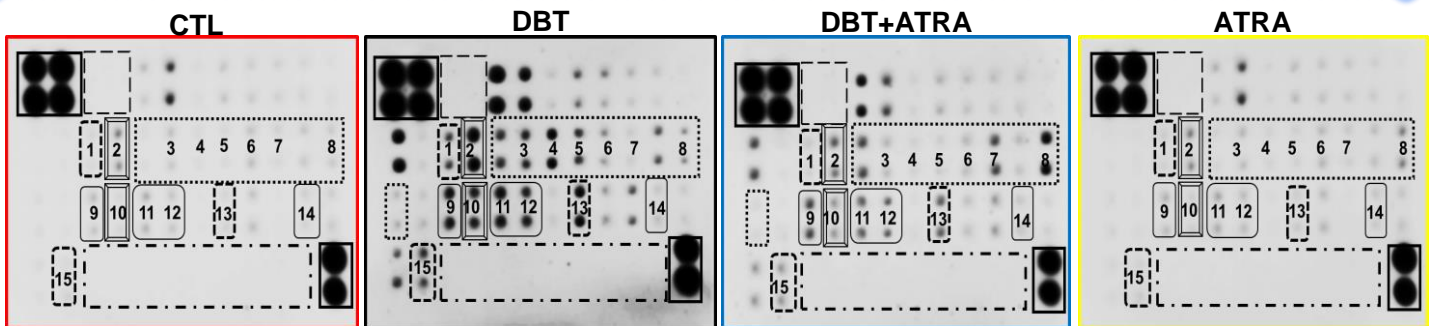
Para explorar el posible efecto antiinflamatorio del ATRA durante el daño glomerular y tubular temprano en la condición diabética, se utilizó un arreglo de anticuerpos en una matriz que mide la expresión de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento, estas moléculas proinflamatorias se evaluaron y se cuantificaron en los enriquecimientos de glomérulos y túbulo proximal aislados de los cuatro grupos experimentales. La alineación del arreglo de anticuerpos se presenta en el anexo 1. En la Fig. 5a y 5f se observan las imágenes de quimioluminiscencia del arreglo de anticuerpos en glomérulos y túbulo proximal. La expresión de las interleucinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R e IL-2 aumentaron en las ratas diabéticas comparadas con los animales no diabéticos. Por otro lado, el incremento de estas moléculas proinflamatorias fue marcadamente reducido en el grupo DBT+ATRA en ambos segmentos de nefrona. Interesantemente, el tratamiento con ATRA en la condición diabética incrementó la expresión de IL-10 e IL-4 (Fig. 5b y 5g) consideradas como citocinas antiinflamatorias (Mu et al 2005; Luzina et al., 2012). Las quimiocinas son mediadores importantes en la inflamación al reclutar y activar subpoblaciones específicas de las células inmunes en diversos tipos de enfermedades renales incluida la ND (Chang et al., 2020). En el día 21 de diabetes se observó un incremento en la expresión de MCP-1/CCL2, la proteína inflamatoria de macrófago-3 alfa (MIP-3 $\alpha$ /CCL20), la quimiocina con motif C-X-C ligando 5 (CXCL-5/LIX) en glomérulos y túbulo proximal comparado con los animales no diabéticos. La quimiocina con motif C-X-C ligando 7 (CXCL7/TCK-1) se sobreexpresó en glomérulos diabéticos comparado con los

animales no diabéticos, mientras que no se modificó su expresión en los túbulos proximales. La administración de ATRA en la condición diabética disminuyó la sobreexpresión de las quimiocinas evaluadas en los dos segmentos de la nefrona (Fig. 5c y 5h). Además, la expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la selectina L (Fig. 5d y 5i) y los factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) aumentaron durante la nefropatía diabética temprana. Por otro lado, se observó que el tratamiento con ATRA en ratas diabéticas disminuyó los niveles de expresión de las moléculas analizadas (Fig. 5e y 5j). Estos hallazgos indican que el ATRA tiene un efecto antiinflamatorio al reducir la expresión de moléculas proinflamatorias e inducir la expresión de citocinas antiinflamatorias durante una condición de nefropatía diabética temprana. Como se describió anteriormente en el día 21 de diabetes experimental encontramos daño e hipertrofia en glomérulos y túbulos proximales, en relación con estos resultados la inflamación podría estar directamente asociada con las lesiones tempranas. Además, los resultados demuestran que la disminución del daño renal funcional y estructural (aumento de la tasa de filtración glomerular, proteinuria, natriuresis, hipertrofia renal) inducidas por el tratamiento con ATRA se podría asociar con una regulación negativa en la expresión de moléculas inflamatorias: citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento durante la nefropatía temprana.

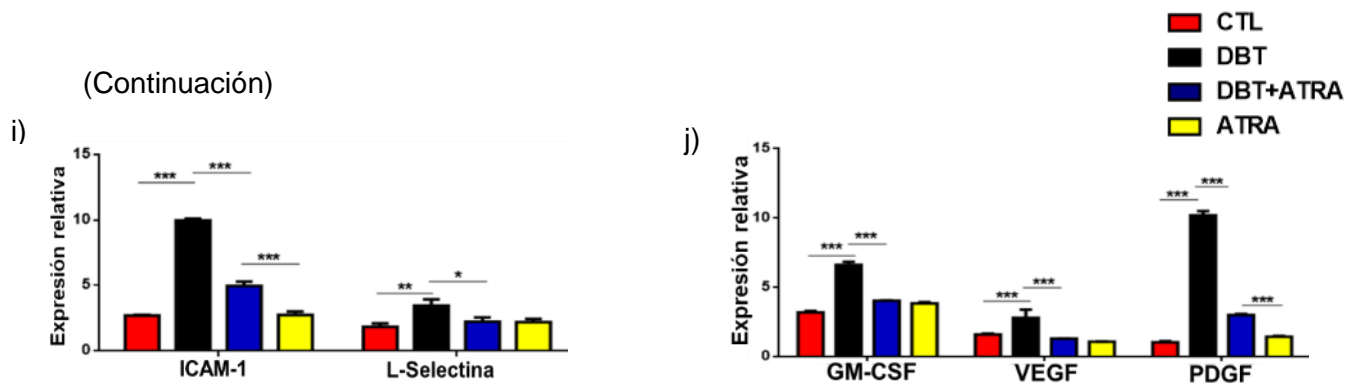
a) **Glomérulo**



f) **Túbulo proximal**



(Ver continuación)



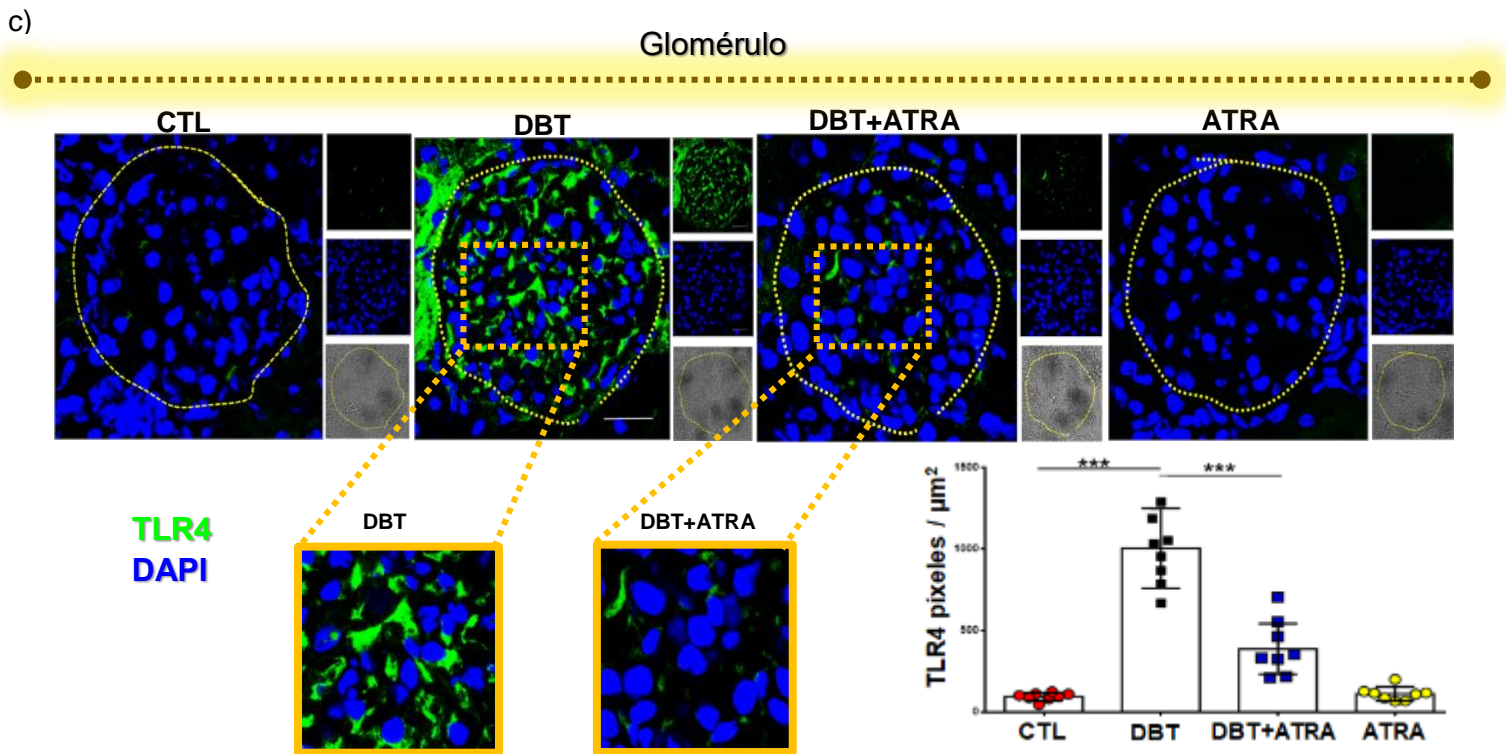
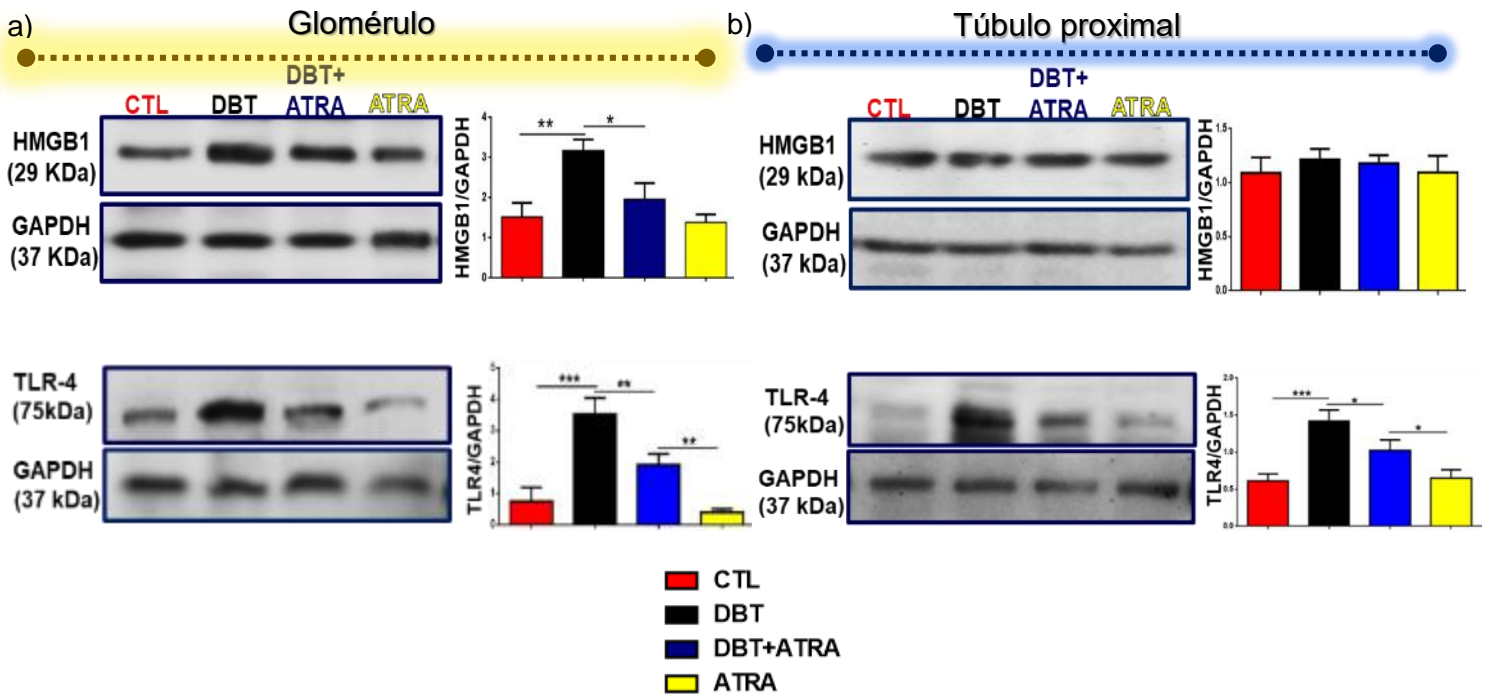
**Figura 5. El tratamiento con ATRA reduce la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias en ratas diabéticas.**

Se utilizó un arreglo de proteínas en una matriz (RatCytokine) que permite la detección de la expresión de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento de los cuatro grupos experimentales: CTL, DBT, DBT+ATRA y ATRA en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales aislados de corteza renal y se realizó una cuantificación por densitometría de las moléculas como lo describe el fabricante con el uso de sus controles positivos. (a) Imágenes de quimioluminiscencia del arreglo de proteínas de enriquecimiento glomerular de los cuatro grupos experimentales y su cuantificación por densitometría de (b) Citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R, IL-2, IL-4 e IL-10, (c) Quimiocinas: CCL2, CCL20, CXCL5 y CXCL7, (d) Moléculas de adhesión: ICAM-1, L-Selectina y (e) Factores de crecimiento: GM-CSF, VEGF y PDGF. (f) Imágenes de quimioluminiscencia del arreglo de proteínas del enriquecimiento de túbulos proximales aislados, (g) Citocinas, (h) Quimiocinas, (i) Moléculas de adhesión y (j) Factores de crecimiento. El tratamiento con ATRA disminuyó la expresión de moléculas proinflamatorias e indujo la sobreexpresión de moléculas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10). Los valores son expresados como la media $\pm$ SD \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ < 0.001

**5. La administración de ATRA disminuye la respuesta inflamatoria inducida por la diabetes a través de la señalización: TLR4-NF- $\kappa$ B**

Con el objetivo de explorar un mecanismo por el cual el ATRA regula la expresión de moléculas proinflamatorias en ratas diabéticas, nos centramos en evaluar la señalización mediada por TLR4-NF- $\kappa$ B. El factor nuclear kappa beta actúa como un regulador maestro en la inflamación, al controlar la expresión de varios genes diana como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, su señalización inicia por la degradación del inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), seguido de la translocación de NF- $\kappa$ B fosforilado al núcleo celular donde se une a los sitios promotores de genes inflamatorios (Mezzano et al, 2001; Iwata et al, 2014). Además, se ha descrito que el receptor tipo TLR4 juega un papel importante en la activación de NF- $\kappa$ B en diferentes enfermedades renales incluidas la ND

(Mudaliar et al, Verzola et al 2014). TLR4 puede ser activado por ligandos endógenos liberados por tejidos dañados o estresados, incluida la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) la cual se ha descrito que está involucrada en el desarrollo de la ND (Chen 2016). De acuerdo con lo anterior, investigamos si la vía de señalización TLR4-NF- $\kappa$ B inducida por el ligando HMGB1 participa de forma activa a los 21 días de diabetes experimental y si el tratamiento con ATRA tiene un efecto modulador a nivel glomerular y tubular proximal. Se evaluó mediante Western blot la expresión de HMGB1 y TLR4 en los cuatro grupos experimentales en ambos segmentos de la nefrona (Fig. 6 a-b). La condición diabética aumentó el nivel de expresión de HMGB1 y TLR4 en glomérulos aislados, mientras que en el enriquecimiento de túbulos proximales se encontró únicamente un incremento en la expresión de TLR4 comparado con los grupos no diabéticos. La diabetes no modificó la expresión del ligando HMGB1 en el segmento de túbulo proximal. Los hallazgos anteriores se corroboraron al analizar la localización subcelular de TLR4 en células glomerulares y tubulares proximales a través de inmunofluorescencia. Se observó que la diabetes induce un aumento de la expresión de TLR4 (marca verde) en células glomerulares (los glomérulos fueron localizados y regionalizados con líneas amarillas con ayuda de su morfología esférica y el uso del campo claro, Fig. 6 c). Así mismo, se encontró un aumento en la expresión de TLR4 (marca en verde) en células epiteliales proximales del grupo DBT al encontrar una colocalización con SGLT2, un marcador del borde en cepillo de los túbulos proximales, marca en rojo (Fig. 6d). Estos datos sugieren que la participación de TLR4 juega un papel clave en el proceso inflamatorio inducido por la diabetes y que el tratamiento con ATRA tiene la capacidad de modular de forma negativa la expresión del receptor en ratas diabéticas.

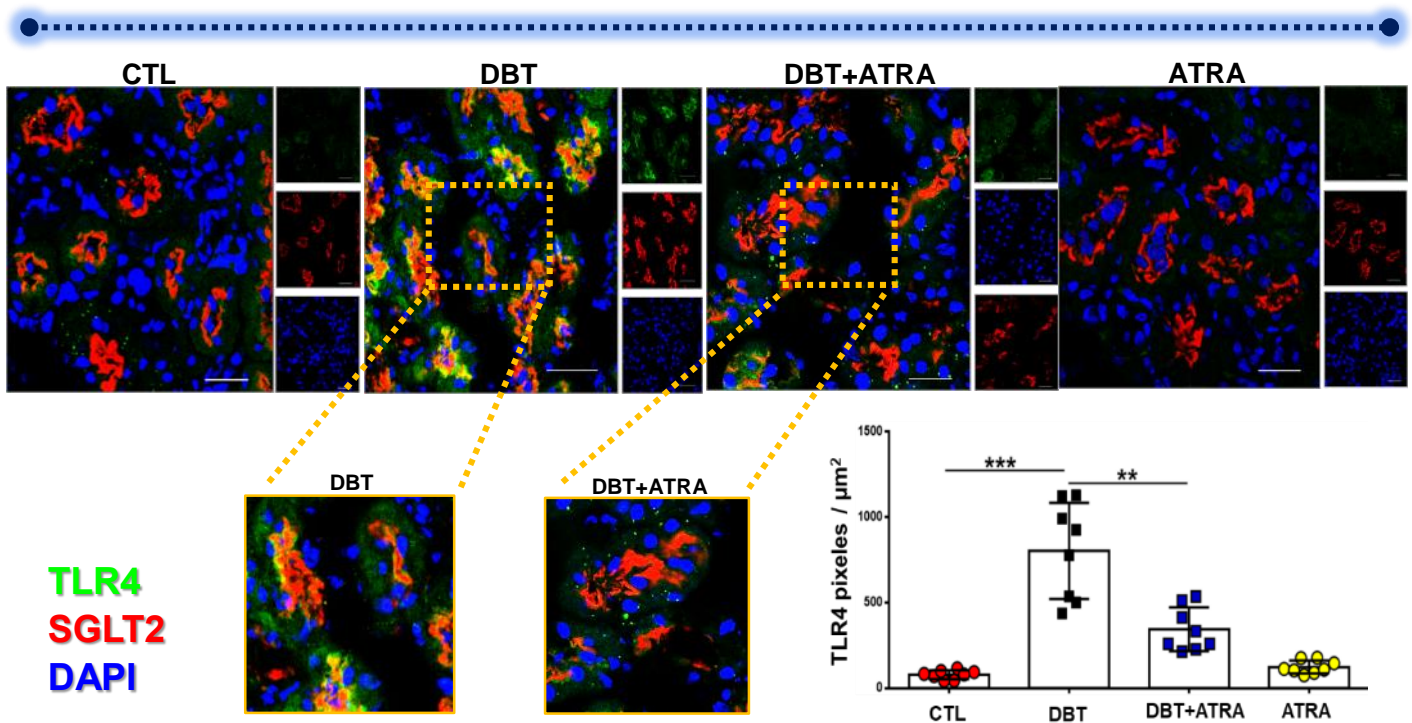


(Ver continuación)

(Continuación)

d)

Túbulo proximal

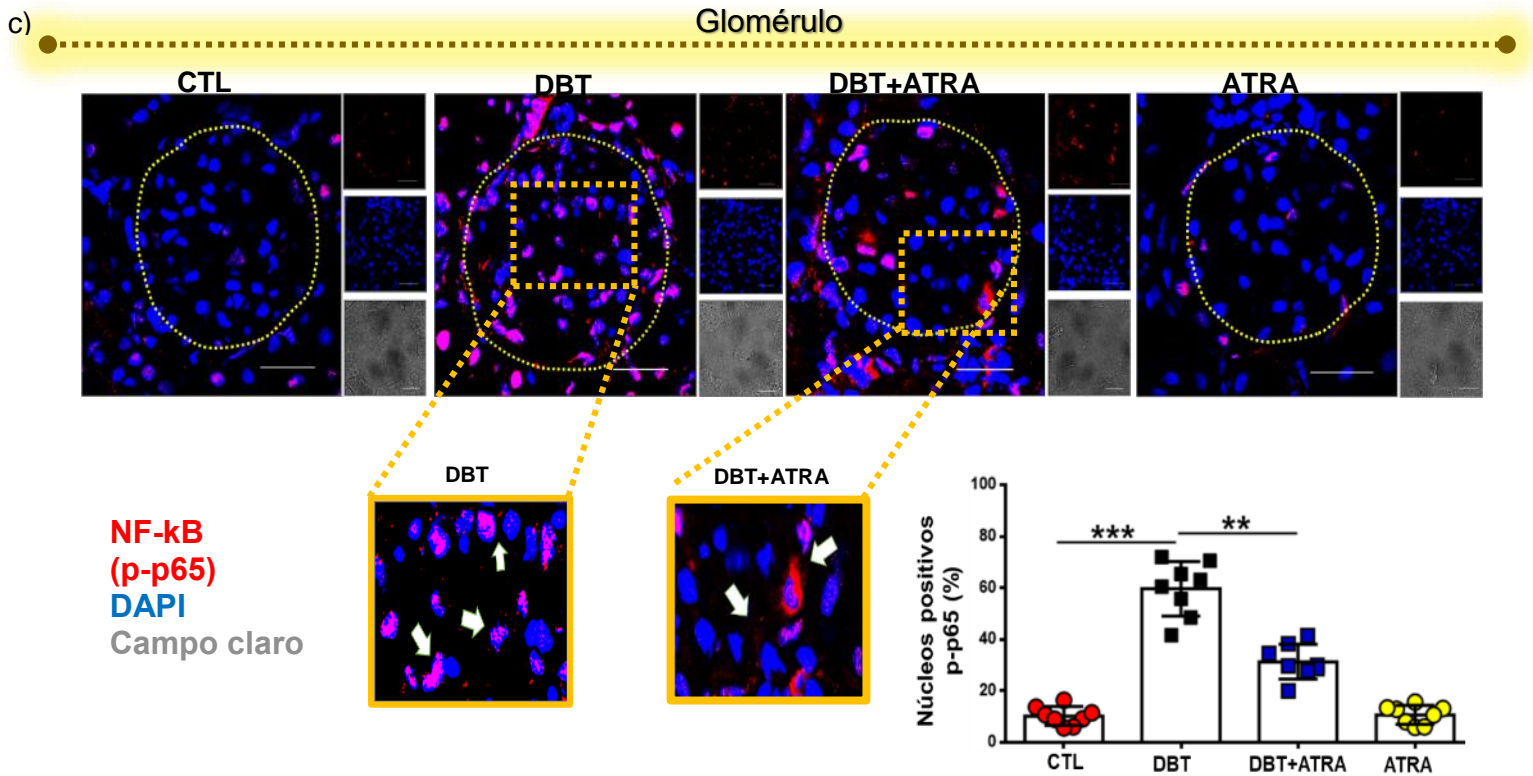
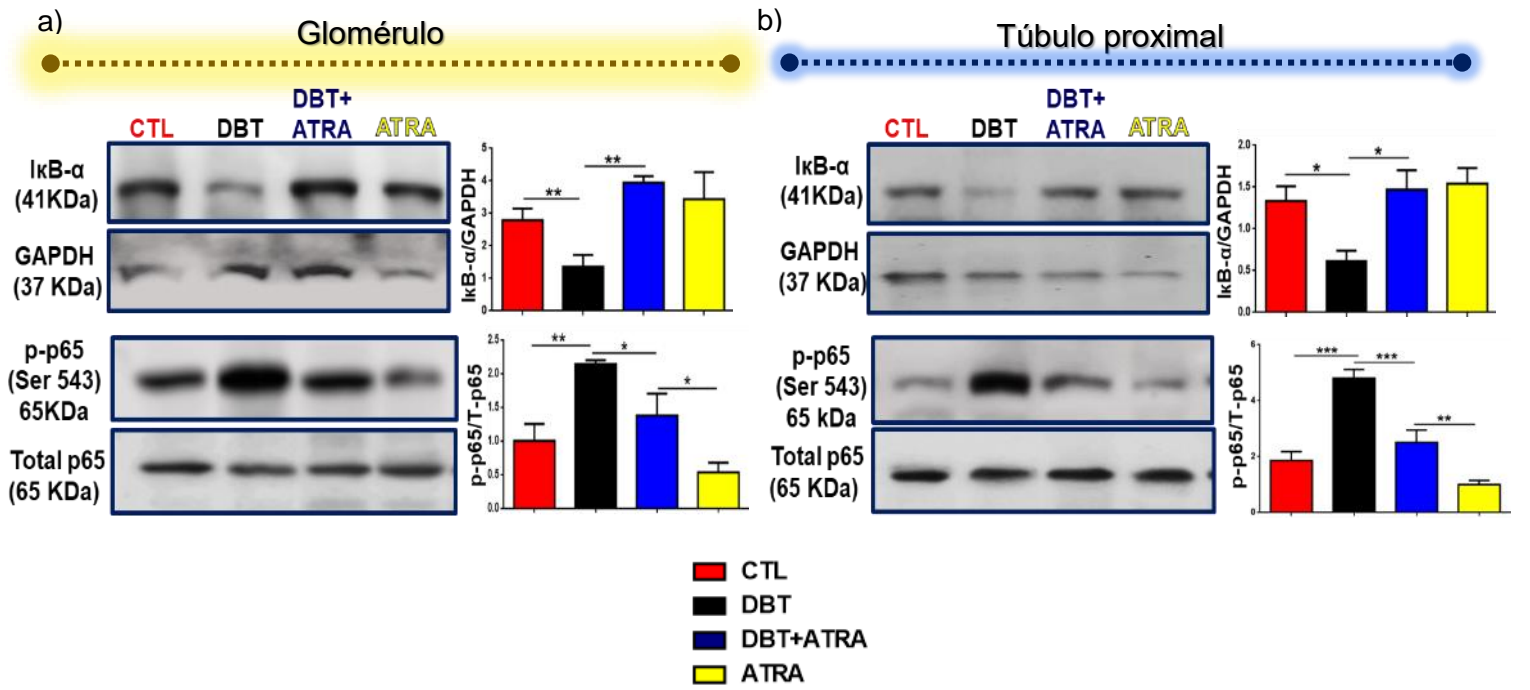


**Figura 6. El ATRA disminuye la sobreexpresión de TLR4 inducida por la diabetes en glomérulos y túbulos proximales.** Western blot de HMGB1 y TLR4 en (a) glomérulos y (b) túbulos proximales aislados de los cuatro grupos experimentales y su cuantificación por densitometría. Análisis de microscopía confocal para la localización celular de TLR4 (marca verde) en secciones de tejido renal, (c) imágenes representativas de glomérulos localizados a través del campo claro por su morfología esférica (líneas punteadas) y su cuantificación por intensidad de fluorescencia dentro del área glomerular, (d) Expresión de TLR4 en sección tubular proximal, el cotransportador sodio-glucosa tipo 2, SGLT2 fue utilizado como un marcador específico de túbulos proximales y la cuantificación de TLR4 se realizó por intensidad de fluorescencia en áreas tubulares proximales. El ATRA disminuyó la sobreexpresión de TLR4 en la condición diabética en ambos segmentos de la nefrona. El ligando HMGB1 fue sobreexpresado en glomérulos diabéticos y no se modificó su expresión en el segmento de túbulos proximales. El núcleo fue contrateñido con DAPI (marca azul). El GAPDH fue utilizado como control de carga. Los datos están expresados como media $\pm$ desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey. n=12 secciones tubulares o glomerulares por grupo. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05. Barra de escala equivalente a 50  $\mu\text{m}$ .

NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción que consta de cinco miembros (p50, p52, p65/RelA, c-Rel y RelB), en enfermedades renales se ha descrito que p65 juega un papel clave en la patogénesis (Guijarro et al., 2001). En condiciones normales NF- $\kappa$ B se encuentra en citoplasma unido a su inhibidor y su degradación libera al dímero fosforilado de NF- $\kappa$ B lo que permite su translocación al núcleo. Para investigar el mecanismo a través

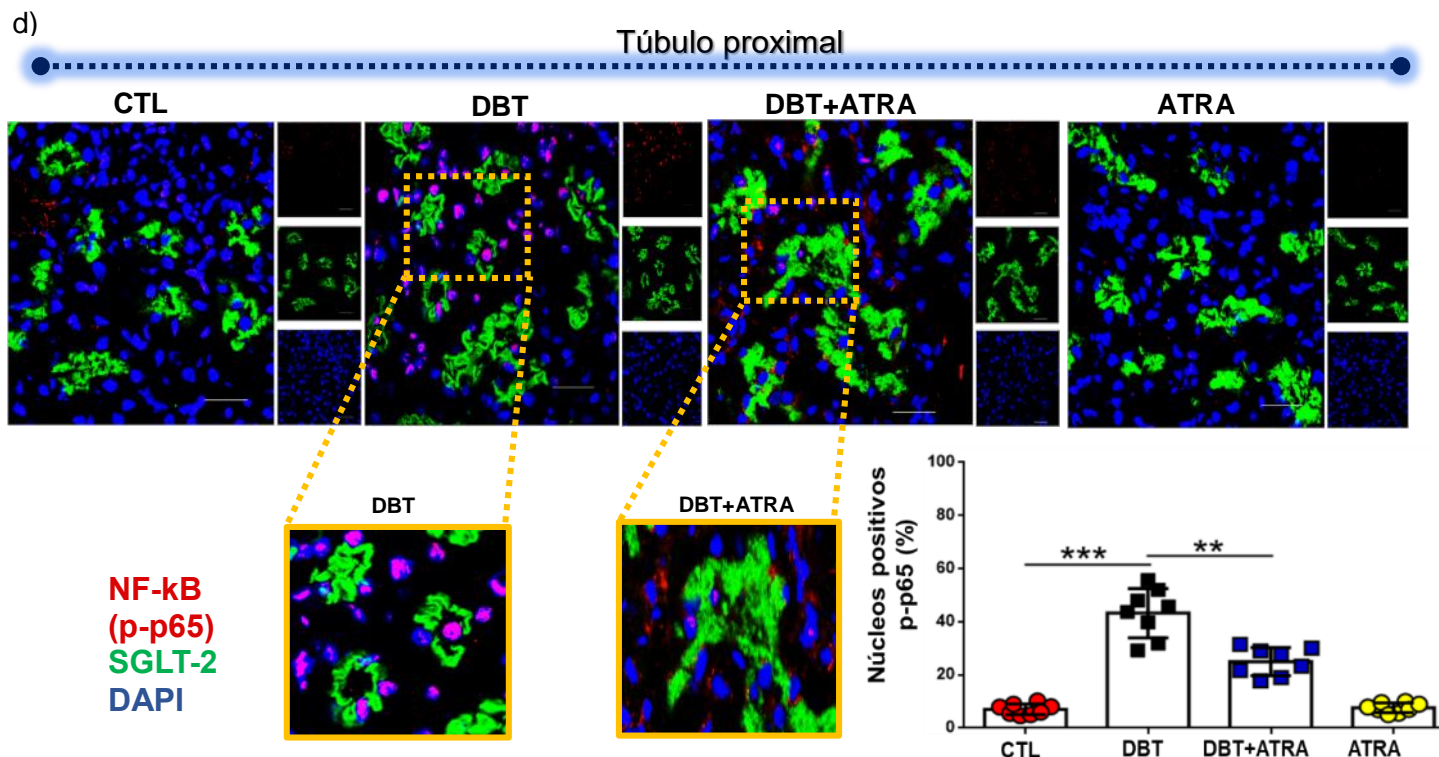


del cual el ATRA disminuye la inflamación inducida por la diabetes, se exploró el efecto del ATRA sobre la degradación del  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  y la fosforilación de p65 en la serina 543 en glomérulos y túbulos proximales. Se encontró que la condición diabética redujo la expresión de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  total y aumento la fosforilación de  $\text{NF-}\kappa\text{B/p65}$ , evaluado mediante western blot en comparación con los grupos no diabéticos en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales aislados (Fig. 7a-b). Experimentos de inmunofluorescencia (Fig. 7c-d) mostraron la translocación nuclear de  $\text{NF-}\kappa\text{B/p65}$  fosforilado en células glomerulares y en células proximales tubulares de ratas diabéticas al existir una colocación de  $\text{NF-}\kappa\text{B/p65}$  (marca roja) con DAPI (marca azul, núcleo). Por otro lado, el tratamiento con ATRA en los animales diabéticos restableció la expresión de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  a niveles similares a los grupos no diabéticos e inhibió la translocación nuclear de  $\text{NF-}\kappa\text{B/p65}$  al retenerlo en citoplasma en ambos segmentos de la nefrona, estos hallazgos fueron consistentes con el hecho de que el ATRA también atenuó la expresión de TLR4 y de moléculas proinflamatorias. Con base en los resultados anteriormente descritos, se concluye que las lesiones glomerulares y tubulares proximales en la diabetes temprana están relacionadas con una respuesta inflamatoria mediada por la señalización de TLR4- $\text{NF-}\kappa\text{B/p65}$  y que el ATRA tiene un efecto antiinflamatorio directo al atenuar esta vía de señalización.



(Ver continuación)

(Continuación)

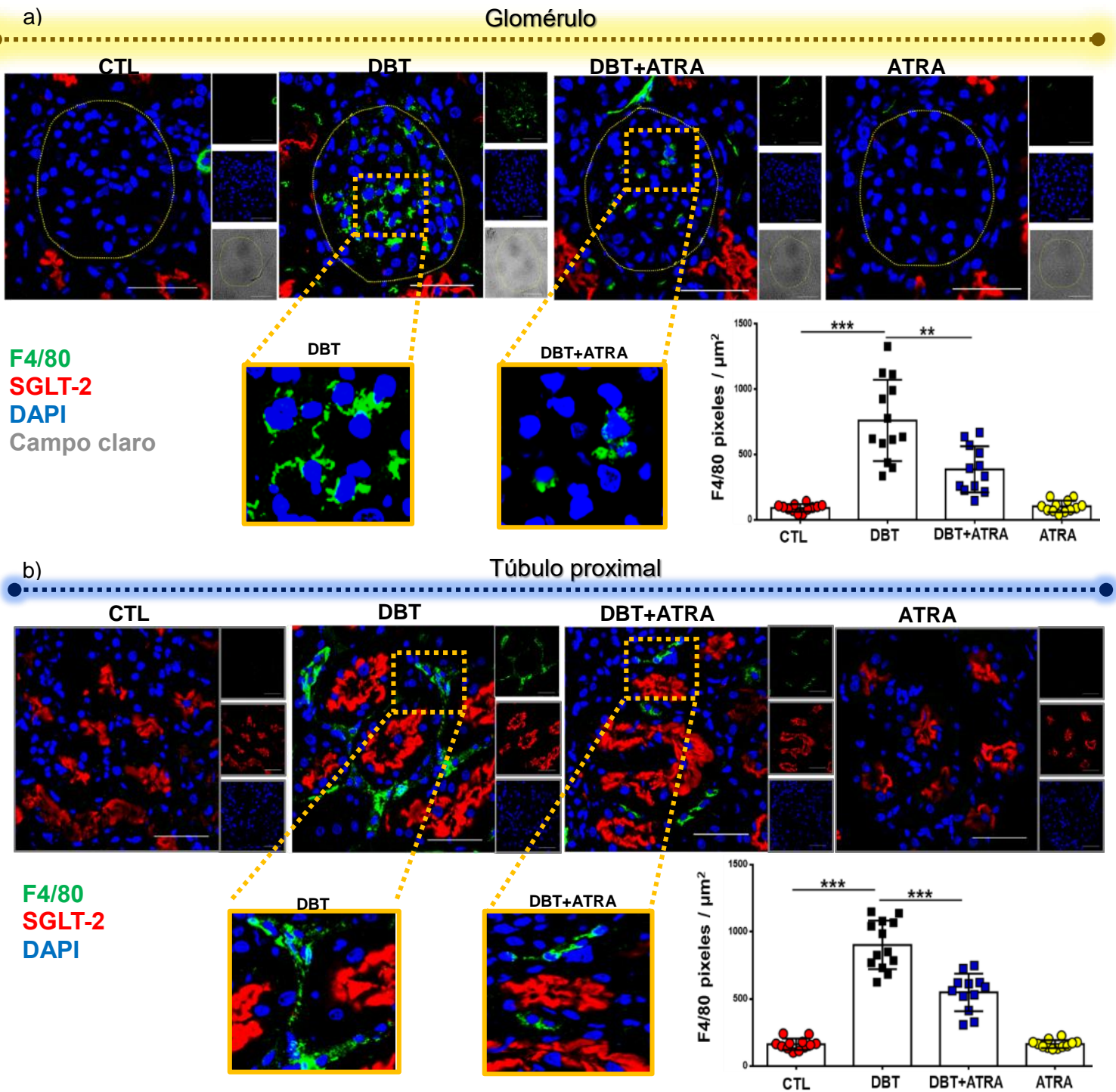


**Figura 7. El ATRA reduce la fosforilación y la translocación nuclear de NF-κB-p65 en glomérulos y túbulos proximales.**

Western blot de IκB-α total y de NF-κB/p65 fosforilado en la serina 543 (a) glomérulos y (b) túbulos proximales aislados de los cuatro grupos experimentales y su cuantificación por densitometría. Análisis de microscopía confocal para la localización celular de NF-κB/p65 fosforilado (marca en rojo) en secciones de tejido renal, (c) imágenes de glomérulos localizados por capo claro (líneas punteadas), se realizó un conteo de núcleos positivos a la marca roja en la región intraglomerular, (d) Localización de NF-κB/p65 fosforilado en secciones renales de túbulo proximal, el cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) se utilizó como un marcador específico de túbulos proximales y se contabilizaron los núcleos positivos a la marca en rojo. El tratamiento con ATRA previno la degradación de IκB-α total y disminuyó la expresión de NF-κB/p65 fosforilado y su translocación nuclear en células glomerulares y tubulares de ratas diabéticas. El núcleo fue contrateñido con DAPI (marca azul). El GAPDH y el NF-κB total se utilizados como control de carga. Los datos están presentados como media±desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey. n=12 secciones tubulares o glomerulares por grupo. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05. Barra de escala equivalente a 50 μm.

## **6. El tratamiento con ATRA reduce la acumulación de macrófagos en tejido renal de ratas diabéticas**

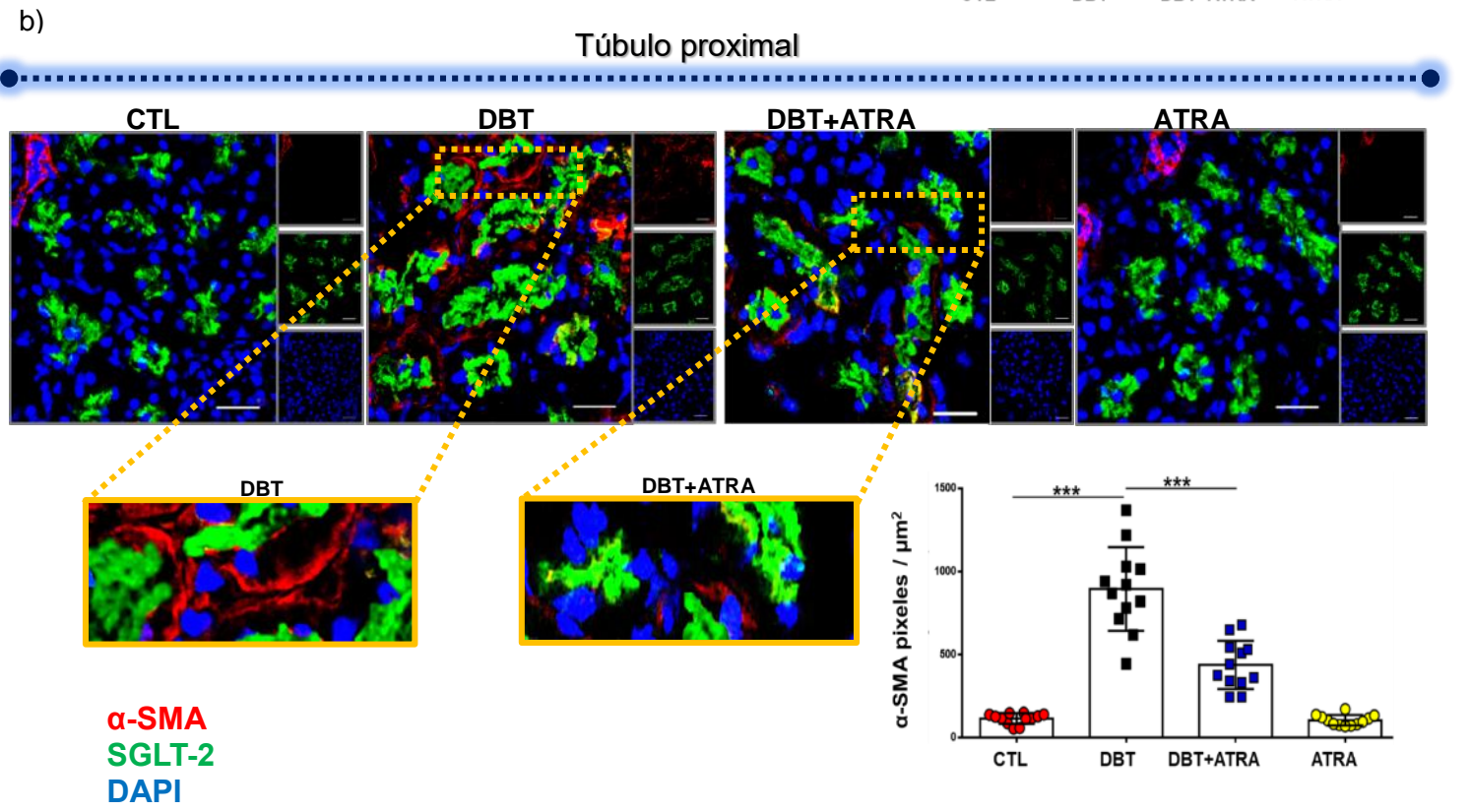
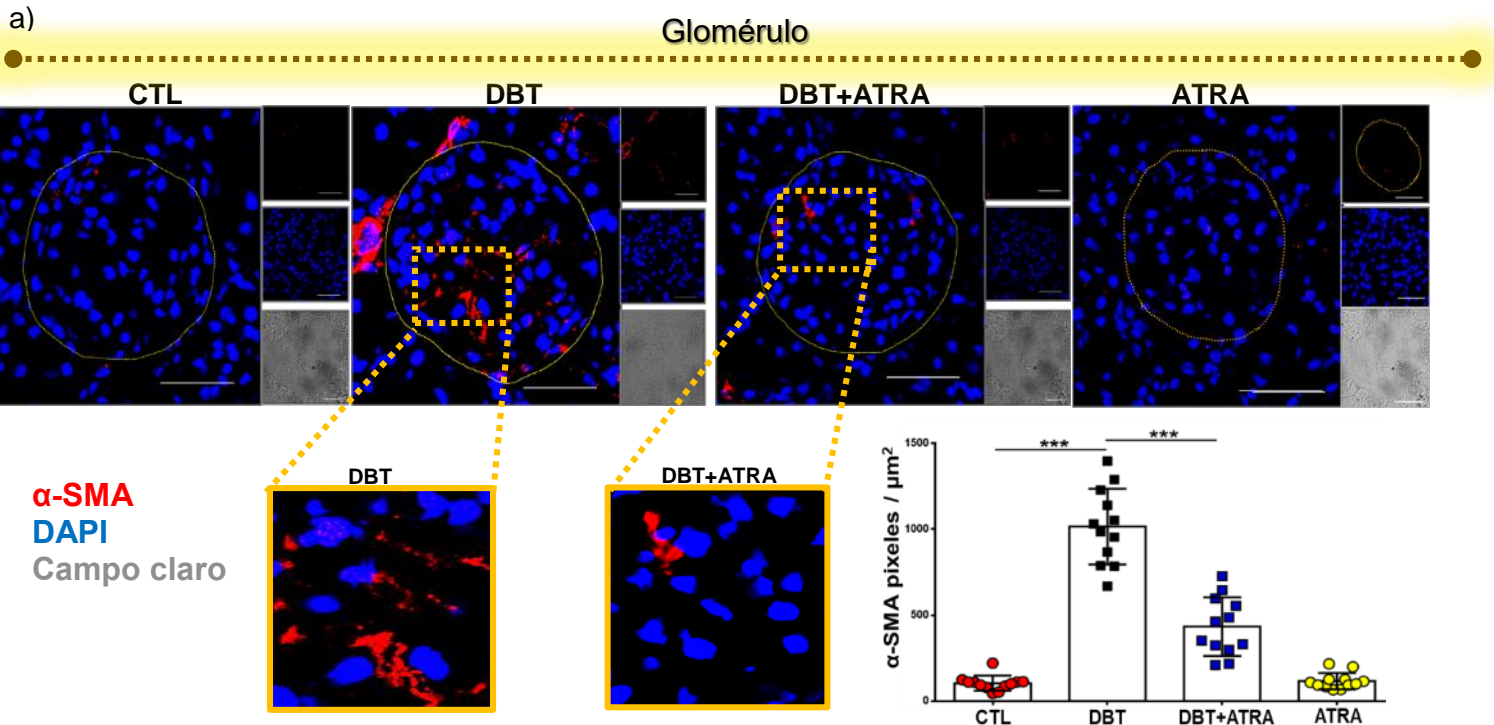
Nuestros resultados anteriormente descritos demuestran que en el día 21 de diabetes se encuentra establecido un proceso inflamatorio y que dicho proceso puede ser modulado a la baja con el tratamiento de ATRA. La inflamación renal involucra el reclutamiento de células del sistema inmune, así como la activación de células renales intrínsecas, con la consiguiente producción y liberación de citocinas y factores de crecimiento que promueven el proceso fibrogénico (Meng et al., 2014). Los macrófagos son las principales células inflamatorias que se encuentran en el riñón diabético y su acumulación se correlaciona con el deterioro de la función renal. Además, se sabe que participan activamente en la fibrogénesis al mantener un microambiente que modula la proliferación y la síntesis de colágeno de los fibroblastos (Tang et al. 2019; Li et al, 2018). Nuestro siguiente objetivo fue explorar el efecto del ATRA en la infiltración y reclutamiento de macrófagos en el tejido renal. En la Figura 8 se demuestra por microscopia confocal un aumento en el número de células positivas a F4/80 (marcador específico de macrófagos, marca verde) en regiones intraglomerulares (Fig. 8a) y en regiones tubulointersticial (Fig. 8b) en el grupo diabético en comparación con los grupos no diabéticos, mientras que el tratamiento con ATRA disminuyó notablemente el número de células F4/80 positivas en la región glomerular y tubulointersticial en ratas diabéticas. Estos datos demuestran que el ATRA tienen la capacidad de modular la presencia de macrófagos en regiones intraglomerulares y en el espacio tubulointersticial de ratas diabéticas. Estos hallazgos se correlacionan con lo descrito anteriormente donde se observó que el ATRA tienen capacidad de reducir la expresión de las quimiocinas MCP-1/CCL20 y MIP-3 $\alpha$ /CCL20, las cuales juegan un papel clave en el reclutamiento de macrófagos.



**Figura 8. El ATRA reduce la infiltración de macrófagos F4/80 positivos en etapas tempranas de la ND.** Imágenes y análisis de inmunofluorescencia de células F4/80 positivas (marca verde) en sección: (a) intraglomerular y (b) túbulo intersticial (el cotransportador sodio-glucosa tipo 2, SGLT2 fue utilizado como un marcador específico de túbulos proximales, marca roja). Se cuantificó la marca verde por intensidad de fluorescencia (pixeles/ $\mu\text{m}^2$ ). El núcleo fue contrateñido con DAPI (marca azul). El tratamiento con ATRA en ratas diabéticas disminuyó el número de macrófagos en el tejido renal durante la nefropatía diabética temprana. Los datos están expresados como  $\pm$ desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey.  $n=12$  secciones tubulares o glomerulares por grupo. \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ . Barra de escala equivalente a  $50 \mu\text{m}$ .

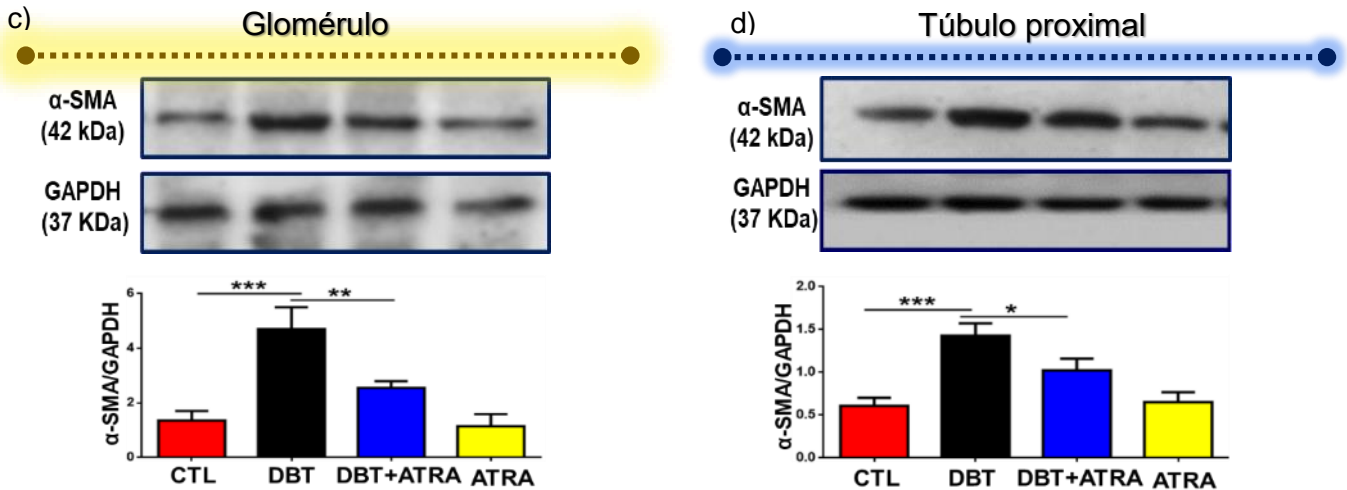
## **7. El tratamiento de ATRA disminuye la presencia de miofibroblastos durante la ND temprana**

Muchas moléculas proinflamatorias están involucradas en el proceso de fibrosis renal al estimular una serie de vías de señalización que resulta en depósitos excesivos de MEC, desencadenando eventualmente la disfunción del órgano. Los miofibroblastos son una de las principales poblaciones celulares productoras de MEC durante la fibrogénesis renal y se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -SMA (Flake et al., 2015). Con el objetivo de explorar un posible efecto anti-fibrogénico del ATRA se analizó la expresión de  $\alpha$ -SMA por inmunofluorescencia en el tejido renal. Se encontró que la diabetes induce un aumento en la localización de células  $\alpha$ -SMA positivas (marca roja) dentro del área glomerular (Fig. 9a) y en espacio túbulo intersticial (Fig. 9b) comparado con los grupos no diabéticos. Además, la expresión de  $\alpha$ -SMA fue evaluada mediante Western blot en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales. Se observó un aumento en la expresión de esta proteína en ambos segmentos de la nefrona en la condición diabética comparado con los grupos no diabéticos (Fig. 9c). Por otro lado, se encontró que el tratamiento con ATRA reduce la presencia de células  $\alpha$ -SMA positivas y sus niveles de expresión en glomérulos y túbulos proximales ratas diabéticas. Estos hallazgos sugieren que el ATRA tienen un efecto anti-fibrogénico al reducir la presencia de células productoras de MEC en la condición diabética en el día 21 de la enfermedad.



(Ver continuación)

(Continuación)



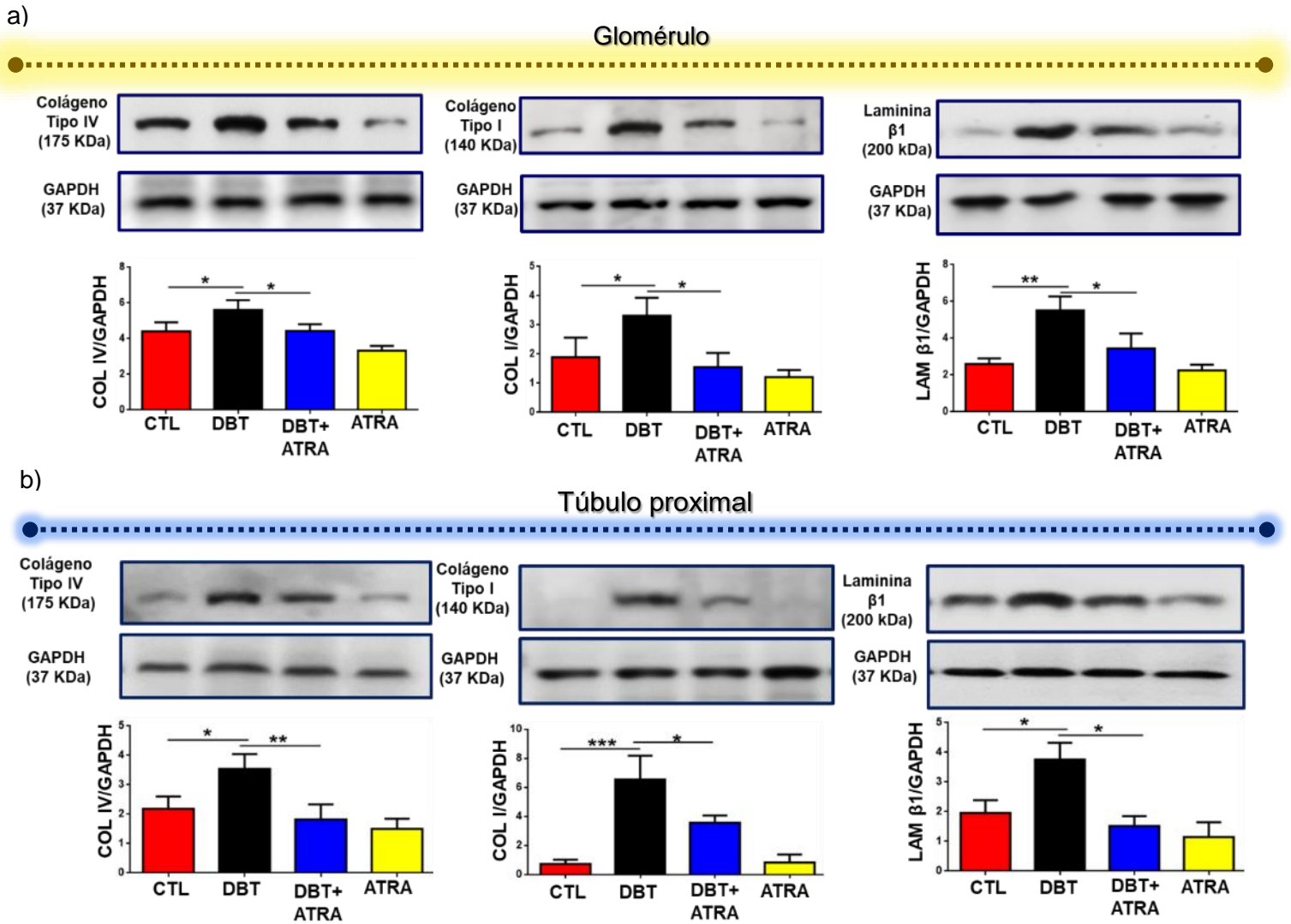
**Figura 9. El ATRA reduce la presencia de células  $\alpha$ -SMA en tejido renal de ratas diabéticas.** Imágenes y análisis de inmunofluorescencia de células  $\alpha$ -SMA positivas (marca roja) en sección: (a) intraglomerular y (b) túbulo intersticial, el cotransportador sodio-glucosa tipo 2, SGLT2 (marca verde) fue utilizado como marcador específico de células tubulares proximales. Análisis de la expresión de la proteína de  $\alpha$ -SMA por Western blot y su cuantificación por densitometría en enriquecimientos de (c) glomérulos y (d) túbulos proximales aislados. La presencia de miofibroblastos fue incrementada a la tercera semana de diabetes, mientras que las ratas diabéticas tratadas con ATRA se observó una menor presencia de las células  $\alpha$ -SMA positivas. GAPDH fue utilizado como control de carga. Los datos están expresados como  $\pm$  desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey.  $n=12$  secciones tubulares o glomerulares por grupo. \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ . Barra de escala equivalente a 50  $\mu$ m.

## 8. El tratamiento con ATRA previene la expresión de marcadores de matriz extracelular durante la nefropatía diabética temprana

Con el objetivo de investigar si los marcadores de MEC incrementan a los 21 días de la nefropatía diabética y determinar el efecto del ATRA en la modulación de la expresión de estas moléculas durante la fibrogénesis en etapas iniciales de la enfermedad se analizó la expresión de las proteínas: colágeno tipo I, colágeno tipo IV y laminina  $\beta$ -1 mediante Western blot. Se encontró que la diabetes induce un aumento en la expresión de colágeno tipo I, colágeno tipo IV y laminina  $\beta$ -1 comparado con los grupos no diabéticos en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales aislados (Fig. 10 a-b). El tratamiento con ATRA disminuyó el aumento en la expresión de estas proteínas en ambos segmentos de la nefrona de ratas diabéticas. Estos hallazgos demuestran que durante la tercera



semana de nefropatía diabética en el modelo con STZ los riñones diabéticos desarrollan un evento fibrogénico el cual, se asocia con un aumento en la infiltración de macrófagos y la activación de miofibroblastos los cuales, tienen un papel importante en la deposición de elementos de la matriz extracelular y que el tratamiento con ATRA reduce el daño glomerular y tubular al disminuir estos cambios fibrogénicos.

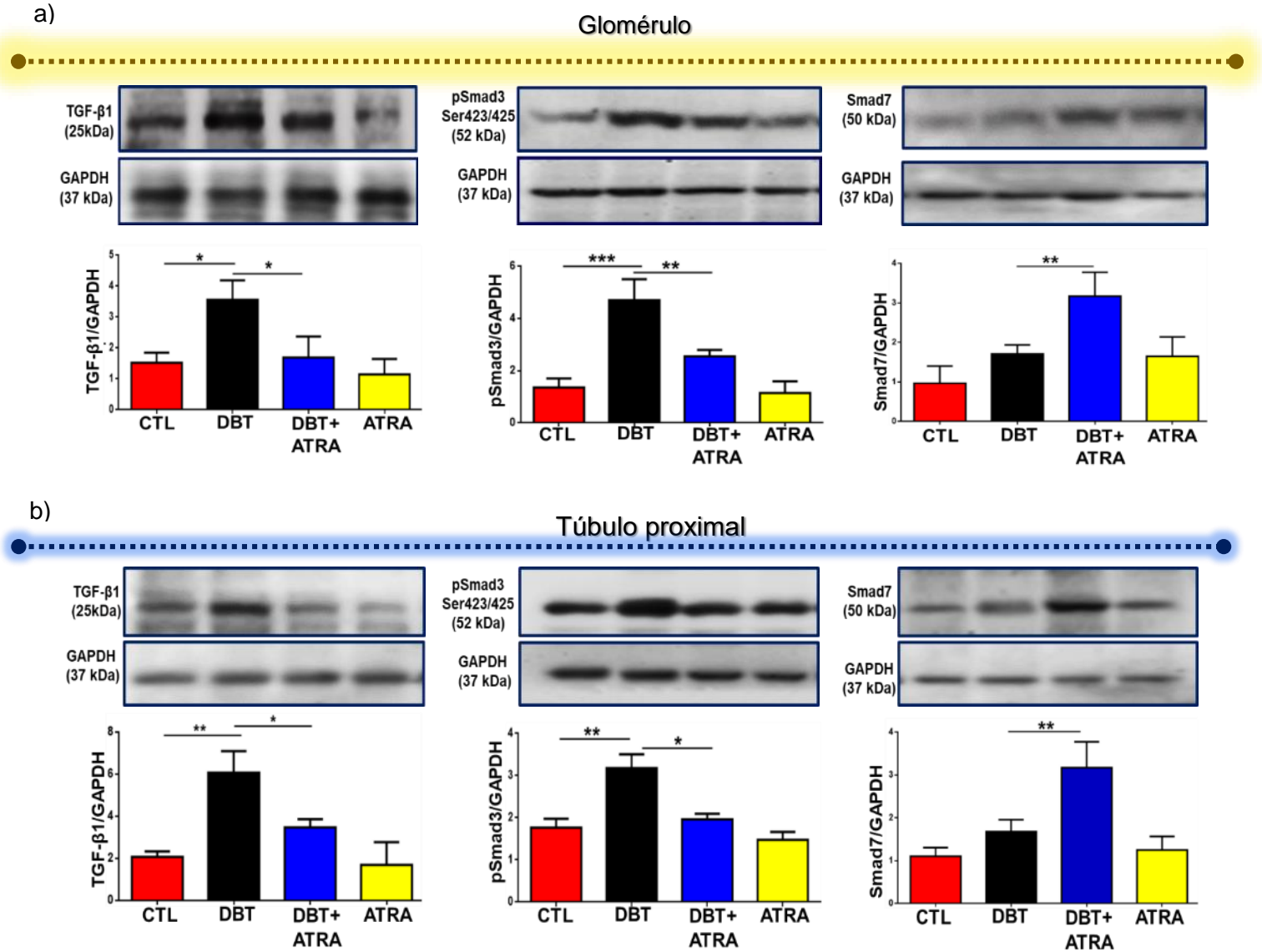


**Figura 10. El ATRA atenúa la fibrogénesis renal en un modelo de nefropatía diabética temprana.** Western blot y análisis densitométrico de: Colágeno IV (COL IV), Colágeno I (COL I) y Laminina beta 1 (LAM β1) en (a) glomérulos y (b) túbulos proximales aislados. Colágeno IV, I y Laminina beta 1 fueron marcadamente incrementados durante la ND temprana. El tratamiento con ATRA disminuyó la expresión de estas moléculas fibroticas. El GAPDH fue utilizado como control de carga. Los resultados son imágenes representativas de tres experimentos independientes, y los valores son expresados como la media  $\pm$ SD \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\*  $p$ < 0.001

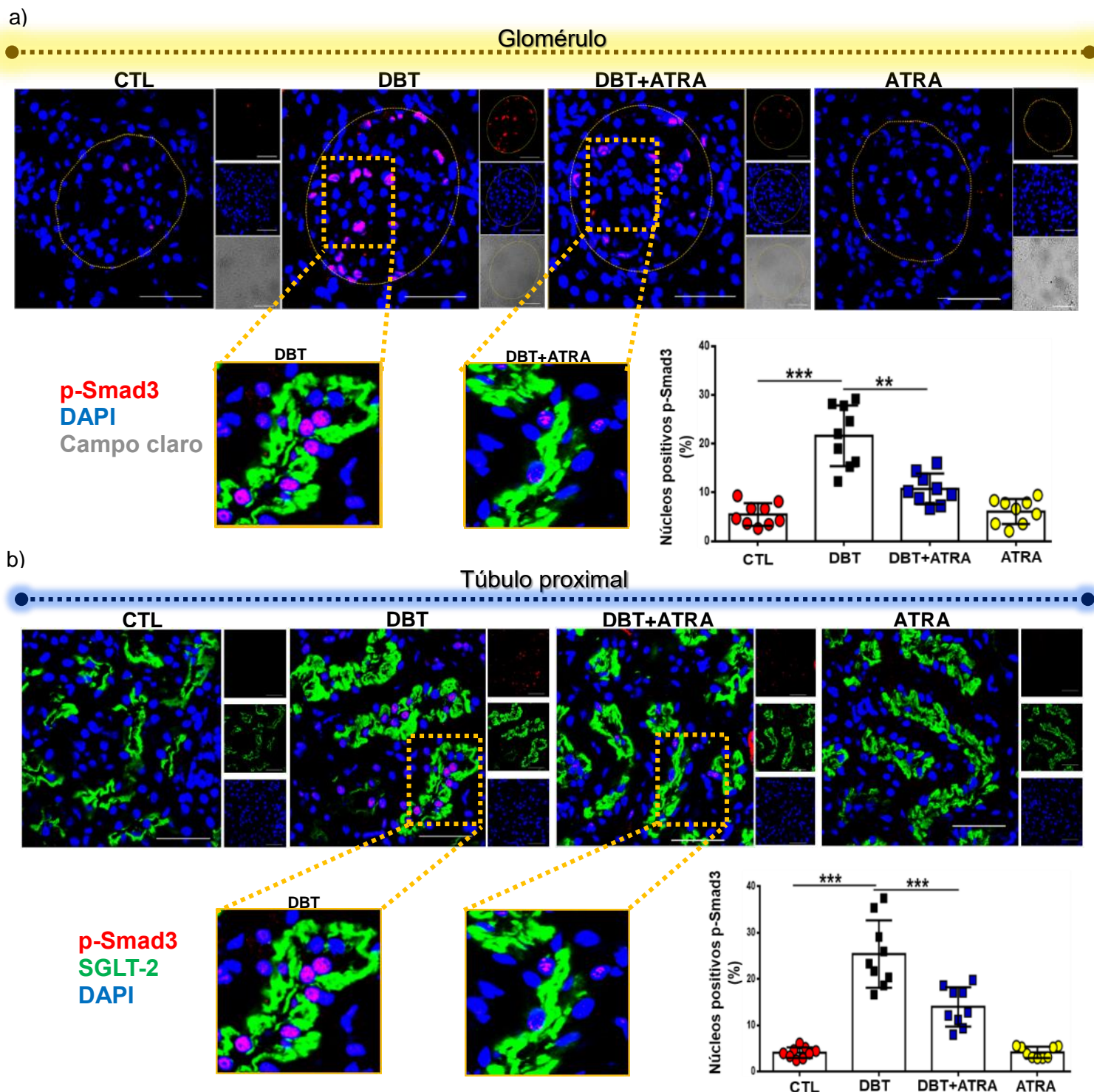
## **9. El tratamiento con ATRA aminora la fibrogénesis al suprimir la vía de señalización TGF- $\beta$ 1/Smad3 en glomérulos y túbulos proximales de ratas diabéticas.**

Para dilucidar un posible mecanismo a través del cual el ATRA disminuye la respuesta fibrótica en etapas iniciales de la ND, nuestro siguiente objetivo fue analizar la vía de señalización TGF $\beta$ 1/Smad3. TGF $\beta$ 1 induce la fosforilación y la translocación nuclear de Smad3 el cual, se une a regiones promotoras que inducen la transcripción y producción de moléculas de matriz extracelular (Huynh et al., 2019). La señalización de TGF $\beta$ 1 induce la síntesis de proteínas inhibidoras de Smad (I-Smad) que modulan de forma negativa la actividad de Smad3 fosforilado, sin embargo, este control no se sostiene en eventos fibróticos y se mantiene la actividad de Smad3 en sitios promotores (Ma et al., 2019). El análisis de western blot demostró que la condición diabética induce un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1, seguido por un incremento en los niveles de Smad3 fosforilado (p-Smad3) en la serinas 423 y 425. Además, no se encontraron cambios en la expresión de Smad7 (un Inhibidor de Smad3) comparado con los grupos no diabéticos en glomérulos y túbulos proximales. Por otro lado, el tratamiento con ATRA potencio un aumento en la expresión de Smad7 y atenuó los niveles de TGF- $\beta$ 1 y p-Smad3 en ambos segmentos de la nefrona (Fig. 11a y b). Estos hallazgos se corroboraron mediante análisis de microscopia confocal al evaluar la translocación nuclear de p-Smad3 en el tejido renal. Se encontró que la condición diabética induce la translocación nuclear de p-Smad (marca roja) en células intraglomerulares y en células de tubulares proximales (marca verde, SGLT2) en comparación con los grupos no diabéticos (Fig. 12a y b). El tratamiento con ATRA disminuyó estas alteraciones en glomérulos y túbulos proximales de ratas diabéticas. Nuestros datos sugieren que la expresión de moléculas fibróticas en el día 21 de diabetes experimental está relacionada por la activación de la señalización de TGF $\beta$ 1/Smad3 y que el mecanismo a través del cual el ATRA ejerce un efecto antifibrogénico es por su capacidad

de inducir un aumento significativo en la expresión de Smad7 y suprimir esta señalización en el tejido renal de las ratas diabéticas.



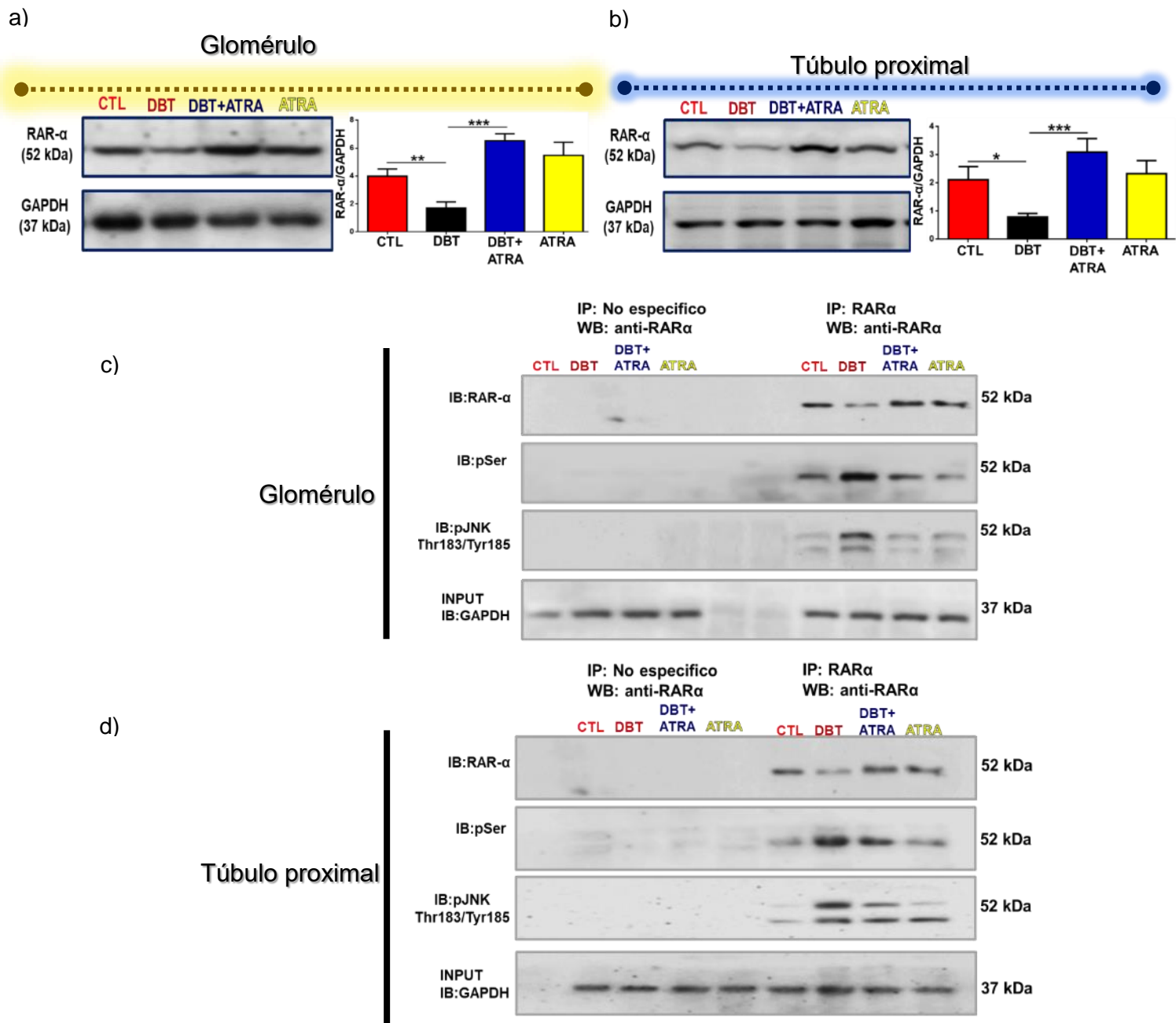
**Figura 11. El ATRA atenúa la sobre activación de la señalización TGF- $\beta$ 1/Smad 3 durante un proceso fibrogénico en etapas iniciales de la diabetes.** Western blot y análisis densitométrico de: TGF- $\beta$ 1, Smad3 fosforilado en la serina 423 y 425 y Smad7 (inhibidor de Smad3) en (a) glomérulos y (b) túbulos proximales aislados de los cuatro grupos experimentales. La expresión de las proteínas TGF- $\beta$ 1, Smad3 fosforilado y Smad7 fueron marcadamente incrementados a los 21 días de diabetes experimental. El tratamiento con ATRA disminuyó los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1, Smad3 fosforilado e indujo un aumento en el nivel de expresión de Smad7 de forma significativa en ambos segmentos de la nefrona. GAPDH fue utilizado como control de carga. Los resultados son imágenes representativas de tres experimentos independientes, y los valores están expresados como la media $\pm$ SD \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ < 0.001



**Figura 12. El ATRA inhibe la translocación nuclear de Smad3 fosforilado en tejido renal durante la ND.** Análisis de inmunofluorescencia de Smad3 fosforilado (marca roja) en secciones renales. (a) glomérulos y (b) túbulos proximales (SGLT2, marcador celular específico, marca verde). Se contabilizaron los núcleos positivos a la marca en rojo. El tratamiento con ATRA redujo la translocación nuclear de p-Smad3 en células glomerulares y tubulares de ratas diabéticas. El núcleo fue contrateñido con DAPI (marca azul). GAPDH y Smad3 total fueron utilizados como control de carga. Los datos están expresados como media±desviación estándar (SD), prueba estadística ANOVA de análisis de varianza de una vía seguida por prueba de Tukey. n=12 secciones tubulares y/o glomerulares por grupo. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05. Barra de escala equivalente a 50 µm.

## **10. El tratamiento con ATRA exógeno inhibe la fosforilación y la pérdida de la expresión del receptor de ácido retinoico alfa (RAR- $\alpha$ ) mediado por la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK)**

El ácido retinoico all-trans está involucrado en una amplia gama de procesos biológicos, a través de la unión y activación a su receptor nuclear: RAR (Pan et al 2014). En estudios anteriores se ha demostrado que en pacientes y animales diabéticos tipo 1 tienen bajas concentraciones plasmáticas de vitamina A y una menor expresión de su receptor nuclear (Basu y Basualdo 1997; Starkery et al, 2010). Se ha informado que la activación del RAR- $\alpha$  a través de la administración exógena de su ligando tiene un papel importante en la prevención del desarrollo de la miocardiopatía diabética (Guleria et al, 2013; Pan et al, 2014). Por lo tanto, evaluamos si la diabetes temprana afecta la expresión de RAR- $\alpha$  en enriquecimientos de glomérulos y túbulos proximales aislados. Se encontró mediante Western blot que la expresión de RAR- $\alpha$  disminuyó significativamente en la condición diabética comparado con el grupo control (Fig. 13a y b). En cambio, el tratamiento con ATRA evito la pérdida en la expresión del receptor e indujo un aumento en su nivel de expresión en ratas diabéticas. Se ha descrito que la fosforilación del RAR- $\alpha$  en sitios específicos de serina conduce a su degradación proteosómica y su inhibición transcripcional mediado por la actividad de la cinasa N-terminal de c-jun (JNK). Para evaluar estas interacciones se inmunoprecipitó el RAR- $\alpha$  a partir de muestras de glomérulos y túbulos proximales aislados (Fig. 13c y d). Se reveló la fosforilación del receptor en sitios de serina (p-Ser) en la condición diabética a los 21 días de la enfermedad y es consistente con la disminución en los niveles de expresión del RAR- $\alpha$ . Además, la diabetes induce la interacción entre el RAR- $\alpha$  y JNK fosforilado (p-JNK). Estos resultados demuestran que la diabetes induce la interacción del RAR- $\alpha$ /p-JNK lo que se asocia con la pérdida de la expresión del receptor en etapas iniciales de la nefropatía y el tratamiento exógeno de ATRA aminora todos estos cambios en ratas diabéticas.



**Fig. 13 El tratamiento de ATRA inhibe la fosforilación y pérdida del RAR- $\alpha$  mediado por la activación de JNK.** Análisis por Western blot de RAR- $\alpha$  en (a) glomérulos y (b) túbulos proximales. Se realizó una co-inmunoprecipitación (IP) del RAR- $\alpha$  en sitios de serina fosforilados (p-Ser) y JNK fosforilado (p-JNK) en (c) glomérulos y (d) túbulos proximales, seguidos de un inmunoblot (IB). La diabetes induce la disminución en los niveles de expresión del receptor lo que, se asocia con un incremento en la fosforilación en sitios de serina y la interacción con JNK. El tratamiento con ATRA reduce todos estos cambios. No se encontró señal en la inmunoprecipitación de una proteína no específica. GAPDH se utilizó como control de carga en los extractos cargados inicialmente (INPUT). Los resultados son expresados como la media  $\pm$ SD \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ < 0.001.

## VIII. Discusión

La nefropatía diabética es una de las complicaciones microvasculares más comunes de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 y es la principal causa de la ERET en todo el mundo (Sun et al., 2019). Muchos factores contribuyen al desarrollo y progresión de la ND, como la hiperglicemia, la hipertensión, la obesidad, la herencia, un estilo de vida sedentario, y la edad avanzada (Rossing et al., 2018). La ND se caracteriza por cambios morfológicos, funcionales y ultraestructurales en el riñón, se sabe que la hiperglucemia es la fuerza impulsora en el desarrollo de la ND y un cuidadoso control glicémico en los pacientes minimiza los síntomas y complicaciones diabéticas, sin embargo, el control glucémico estricto es difícil de mantener (Elmarakby et al., 2010). Se ha demostrado que el estrés oxidante, la inflamación y la fibrosis juegan un papel clave en el deterioro de la función renal. Un aumento en el estrés oxidante puede incrementar la producción de citocinas inflamatorias y estas citocinas puede estimular la producción de radicales libres. Además, las citocinas inflamatorias actúan como agentes profibróticos y conducen a la progresión de fibrosis renal caracterizada por la activación de fibroblastos, la transición epitelio mesénquima, la infiltración de macrófagos y una acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular que conducen a una insuficiencia del tejido (Jha et al., 2018). Nuestro grupo de trabajo previamente demostró que, en etapas iniciales de la ND, el estrés oxidante está involucrado en alteraciones en componentes de la unión estrecha, modificando los niveles de expresión de claudina 5 en glomérulos y claudina 2 en túbulo proximal, afectando la tasa de filtración glomerular y el manejo renal de iones por parte del túbulo proximal (Molina-Jijón et al., 2014). Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos moleculares detrás de la patología en etapas iniciales es necesaria para desarrollar terapias que puedan modular el proceso y retrasar su progresión a ERET.

En estudios previos se ha sugerido que el ATRA puede proteger contra el desarrollo de cambios patológicos renales incluyendo la ND (Das et al., 2014; Kinoshita et al., 2003;

Juang et al., 2014; Pérez et al., 2004 y Molina-jijón et al., 2015). En esta tesis se demostró que la inflamación y la fibrogénesis están involucrados desde etapas iniciales de la ND y el tratamiento con ATRA tiene un papel benéfico al mantener la integridad funcional y estructural a nivel glomerular y en túbulos proximales en un modelo experimental diabético. Al día 21 después de la administración con STZ (los animales que recibieron la inyección presentaron hiperglicemia, pérdida de peso y una función renal anormal. Se observaron alteraciones a nivel glomerular como un incremento en la concentración de proteínas urinarias (proteinuria), en la tasa de filtración glomerular (depuración de creatinina). Ambos parámetros son característicos de daño temprano y se asocia a cambios hemodinámicos y estructurales de la barrera de filtración (Parving et al., 2014). Consistente con estos datos, se encontró un aumento del tamaño y volumen glomerular (hipertrofia). A nivel tubular los animales diabéticos mostraron daño asociado con un incremento en el nivel de FeNa, en la excreción urinaria de la  $\beta 2$  microglobulina y en la expresión de NGAL a nivel tubular. Estas dos últimas proteínas han sido utilizadas como biomarcadores de diagnóstico y daño temprano en pacientes con ND (Motawi et al., 2017). La  $\beta 2$  microglobulina es filtrada y más del 90% es reabsorbida y catabolizada en el túbulo proximal resultando en una concentración mínima en orina en condiciones normales (Argyropoulos et al., 2017). NGAL es una proteína que se sobreexpresa a nivel tubular después de la iniciación de un daño renal. Ambas moléculas aumentaron en la condición diabética lo que indica el establecimiento exitoso de un modelo de ND temprana. La administración oral diaria del ATRA (1 mg/Kg de peso corporal) en ratas diabéticas a partir del establecimiento de la hiperglucemia (día 3) al fin del estudio (día 21) previno la pérdida de peso y mejoró los parámetros asociados con el daño renal temprano demostrando un efecto protector en los cambios iniciales de la ND de manera independiente al control glicémico. Estos resultados son consistentes con evidencias previas del papel nefroprotector del ATRA (Kinoshita et al., 2003; Juang et al., 2014; Pérez et al., 2004 y Molina-jijón et al., 2015).



Se ha demostrado que el proceso inflamatorio juega un papel clave en la progresión de la ND (Rayego-Mateos et al., 2020). Para analizar este punto se evaluaron marcadores inflamatorios en los diferentes segmentos de la nefrona (glomérulo, túbulo proximal y distal). Se encontró un aumento en la expresión de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 y TNF- $\alpha$  en glomérulos y túbulos proximales lo que sugiere que las células residentes como podocitos, células endoteliales, mesangiales y epiteliales liberan estas moléculas durante el curso temprano de la ND. Sin embargo, no encontramos cambios en la expresión de IL-6 y de TNF- $\alpha$  en segmento de la nefrona distal. Este hallazgo es consistente con un trabajo previo que describe que el estrés oxidante se establece predominantemente en glomérulos y túbulos proximales y no a nivel de túbulo distal (Molina-jijón et al., 2014). Estos datos apoyan la correlación que existe entre el estrés oxidante y el proceso inflamatorio durante la ND temprana. Por otro lado, el incremento en la expresión de citocinas en la condición diabética disminuyó por el tratamiento con ATRA. El ATRA disminuye la producción y liberación de citocinas inflamatorias en la nefritis lúpica (Kinoshita et al., 2003), en artritis reumatoide (Know et al., 2013) y en isquemia reperusión (Rao et al., 2013). Además, encontramos que la administración de ATRA en ratas diabéticas induce la sobreexpresión de IL-10 e IL-4 consideradas como moléculas antiinflamatorias. Estas moléculas participan en la regulación del sistema inmune al suprimir la acción y la síntesis de citocinas proinflamatorias en varios tipos celulares (Mu et al., 2005; Luzina et al., 2012). Bai y col (2010) informaron que el tratamiento con ATRA en la enfermedad inflamatoria intestinal tiene la capacidad de potenciar la producción de IL-10 e IL-4 y se asocia con la reducción en la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

Durante el proceso inflamatorio la liberación de quimiocinas es importante para el reclutamiento de células inmunes al sitio de daño. Encontramos que al día 21 de diabetes experimental las quimiocinas CCL-2, CCL20, CXCL5, CXCL7 incrementaron su expresión al igual que un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión I-CAM, L-Selectina

y los factores de crecimiento GM-CSF, VEGF y PDGF. Por otro lado, el tratamiento con ATRA en los animales diabéticos disminuyó la sobreexpresión de estos marcadores inflamatorios en glomérulos y túbulos proximales. Estos hallazgos confirman que el papel nefroprotector del ATRA está relacionado con la atenuación de un proceso inflamatorio presente desde etapas iniciales de la ND.

Estudiamos un mecanismo a través del cual el ATRA disminuye la respuesta inflamatoria en la ND temprana y nos centramos en la vía de señalización mediada por TLR4-NF- $\kappa$ B. El receptor tipo toll 4, inicia la respuesta inflamatoria después del reconocimiento de alguno de sus ligandos endógenos como: HSP60, HSP70, AGEs, componentes de matriz extracelular, endotoxina, y HMGB1, entre otros (Verzola et al., 2014; Ma et al., 2014; Liu et al., 2014). La activación de TLR4 conduce a la fosforilación y translocación al núcleo del factor nuclear kappa B. NF- $\kappa$ B es una familia formada por cinco miembros: NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB y c-Rel que residen en el citoplasma formando un complejo con su inhibidor, I $\kappa$ B- $\alpha$  el cual, es degradado permitiendo la fosforilación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y así unirse a sitios promotores de genes inflamatorios como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Mitchell et al., 2016). Debido a esto, se analizó la expresión de HMGB1/TRL4 e I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B en glomérulos y túbulos proximales durante la ND temprana. Se encontró que al día 21 de diabetes experimental existe un aumento en la expresión de HMGB1 en glomérulos y no se modificó su expresión en túbulos proximales, pero si se observó un aumento en los niveles de expresión y localización de TLR4 en segmentos glomerulares y en células de túbulo proximal. Estos hallazgos indican que HMGB1 es requerido para la activación de TLR4 a nivel glomerular y no en el segmento tubular proximal, lo que sugiere que TRL4 en este segmento de la nefrona es activado por otros ligandos endógenos. Jheng y col. (2015) encontraron *in vitro* e *in vivo* que concentraciones altas de glucosa y albúmina en células proximales tubulares son susceptibles a la activación de TLR4 mediada por HSP70 y no

por HMGB. De manera interesante se encontró que el tratamiento con ATRA en animales diabéticos redujo de forma significativa los cambios mencionados anteriormente. Por otro lado, se encontró que la condición diabética temprana reduce la expresión del inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) total e incrementa la fosforilación de NF- $\kappa$ B (p65) en la serina 543 lo que indica su activación, lo cual, correlaciona con su translocación nuclear en células glomerulares y del túbulo proximal. El tratamiento con ATRA evitó la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , la fosforilación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (p65). Estos hallazgos se relacionan con estudios previos que reportan que la deficiencia de vitamina A promueve una respuesta inflamatoria mediada por la actividad de NF- $\kappa$ B (p65) y la suplementación de ácido retinoico o un agonista de su receptor reducen la inflamación (Austena et al; 2004 y 2009). Se ha reportado que dos agonistas de los RARs activan al receptor y en el núcleo inhiben la unión de NF- $\kappa$ B a sus sitios promotores a través de una interacción física del RAR y NF- $\kappa$ B (Na et al., 1999). Nizamutdinova y col. (2013) describieron que el tratamiento con ATRA promueve la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y su expresión evita la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  inducida por la hiperglucemia en cardiomiocitos. Por lo tanto, estos datos se asocian con el mecanismo de acción del ATRA para regular la inflamación a través de suprimir la vía de señalización TLR4-NF- $\kappa$ B durante etapas iniciales de la ND.

Se ha documentado que la inflamación tiene un papel clave en la progresión a fibrosis renal (Lv et al., 2018; Li et al., 2019). En esta tesis examinamos los eventos fibrogénicos durante la ND temprana y el efecto terapéutico del ATRA durante estos cambios en glomérulos y túbulos proximales.

Los macrófagos activados regulan la fibrogénesis a través de la liberación de citocinas y factores de crecimiento que modulan la proliferación de fibroblastos y la síntesis de componentes de la matriz extracelular y su acumulación correlaciona con el desarrollo de la fibrosis renal en humanos y en modelos experimentales (Tang et al., 2019; Li et al.,

2018). Consistente con estos resultados se encontró que al día 21 de la diabetes experimental existe un aumento de células F4/80 positivas (marcador específico de macrófagos) intraglomerular y en el espacio tubulointersticial, lo cual se correlaciona con un aumento en la expresión de quimiocinas observado en el arreglo anticuerpos. El tratamiento con ATRA disminuyó el número de células F4/80 positivas en el tejido renal. Estos hallazgos demuestran que el ATRA puede prevenir un proceso fibrogénico a través de disminuir la infiltración de macrófagos en etapas iniciales de la ND. En estudios previos se ha demostrado que el tratamiento con ATRA puede coordinar la diferenciación de macrófagos inflamatorios (M1) a macrófagos alternativos (M2), estos últimos están involucrados en la reparación del tejido dañado, esto se observó en leucemia mieloide humana y en lesión renal aguda (Takahashi et al., 2014; Chiba et al., 2016).

La acumulación local de citocinas profibróticas en el microambiente renal conduce a la activación de células productoras de MEC, que son esenciales para la fibrogénesis renal. Los fibroblastos activados son células  $\alpha$ -SMA positivas y se les denomina miofibroblastos (Falke et al., 2015). Se encontró que durante la ND temprana existe un aumento en la expresión y localización de células  $\alpha$ -SMA positivas dentro del glomérulo y a nivel tubulointersticial. Estos hallazgos van acorde con estudios previos *in vitro* e *in vivo* en los cuales se ha demostrado que en áreas donde se localizan macrófagos activados generan mediadores solubles que modulan la activación y proliferación de miofibroblastos (Wang et al., 2017; Li et al., 2018). De manera interesante se encontró que el ATRA reduce la expresión y localización de  $\alpha$ -SMA en el tejido renal. Wagner y col (2000) informaron que el ácido retinoico y el 13-cis-ácido retinoico disminuyeron la expresión de  $\alpha$ -SMA y atenuaron la progresión esclerótica en un modelo de glomerulonefritis mesangioproliferativa en rata.

La fibrosis se caracteriza una acumulación excesiva de MEC debido a un desequilibrio entre su producción y su degradación (Humphreys et al., 2018). Encontramos que al día 21

de diabetes experimental existe un aumento significativo de colágeno tipo 1, tipo IV y laminina  $\beta 1$  en glomérulos y túbulos proximales. Estos hallazgos indican que el aumento en la expresión de moléculas de MEC no es exclusiva de eventos tardíos de la ND o bien de la ERET. Como se esperaba el tratamiento con ATRA redujo los niveles de expresión colágeno tipo I y IV y laminina  $\beta 1$  en ratas diabéticas evidenciando así, su potencial antifibrogénico en la ND temprana. Esta observación es consistente con otros estudios que describen que el ATRA inhibe la síntesis de los tipos I, III y IV de procolágeno, fibronectina y lamininas en la fibrosis hepática (Wang et al., 2018; He et al., 2011).

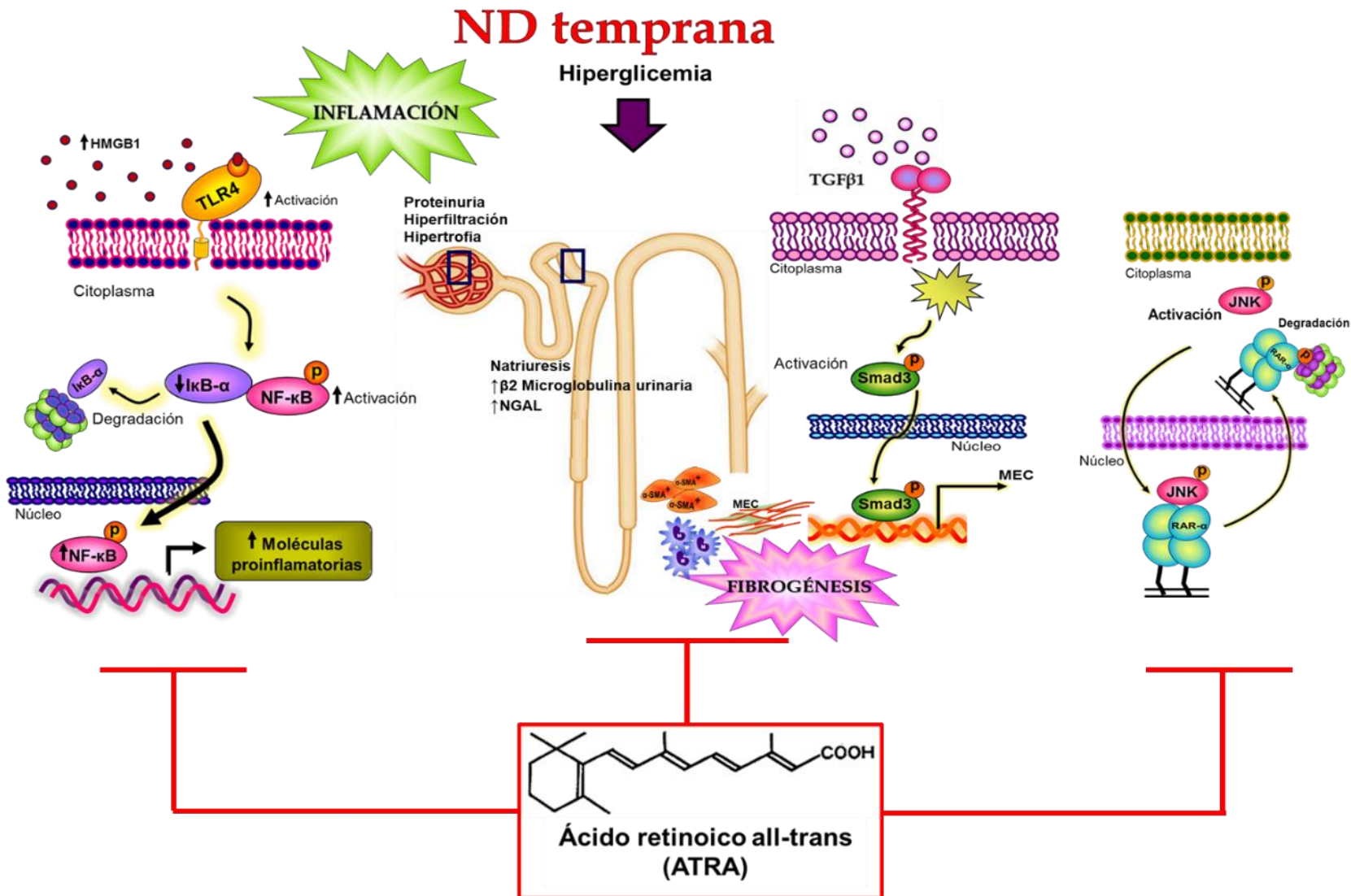
Diversos mecanismos están implicados en el desarrollo de la fibrosis renal, por ejemplo, la señalización mediada por TGF- $\beta 1$ . Debido a esto se analizó su expresión en glomérulos y túbulos proximales. Encontramos que la diabetes induce un aumento en su expresión en ambos segmentos de la nefrona. Por lo tanto, es posible que la señalización de TGF- $\beta 1$  sea el mediador central en la fibrogénesis encontrada en la ND temprana. Su señalización conduce a la fosforilación y translocación nuclear de Smad3 el cual, se une a sitios promotores de componentes de MEC estimulando su producción (Chen et al., 2018; Huynh et al., 2019). Se encontró que la diabetes aumentó la fosforilación y translocación nuclear de Smad3 en glomérulos y túbulos proximales mientras que, el ATRA atenuó estos cambios e indujo un aumento en la expresión de Smad7, un inhibidor de la señalización TGF- $\beta 1$ /Smad3 (Chen et al., 2011). Estos hallazgos demuestran que el efecto antifibrogénico del ATRA se debe a su capacidad de suprimir la vía de señalización de TGF- $\beta 1$ /Smad3 a través de Smad7.

En estudios previos hemos demostrado que el ATRA tienen una gran capacidad de protección en diversos modelos experimentales (Kinoshita et al., 2003; Juang et al., 2014; Pérez et al., 2004 y Molina-jijón et al., 2015). El ATRA es el metabolito activo de la vitamina A, y ejerce su efecto al unirse a su receptor nuclear RAR, incluidos RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  y RAR- $\gamma$  (Das et al; 2014). Se ha descrito que el metabolismo de la vitamina A está alterado en

pacientes y animales diabéticos (Basu et al., 1997; Starkey et al., 2010; Guleria et al., 2013). Otros informes mencionan que existen alteraciones en la expresión y actividad del RAR- $\alpha$  en cardiomiocitos tratados con alta concentración de glucosa y en cardiopatía diabética experimental (Guleria et al., 2013; Nizamitdinova et al., 2013; Pan et al., 2014). Debido a esto se analizó la expresión del RAR- $\alpha$  en glomérulos y túbulos proximales. Se encontró que la diabetes disminuye su expresión en ambos segmentos de la nefrona, estos hallazgos confirman que la señalización de RAR- $\alpha$  se encuentra alterada lo que contribuye a la lesión renal. La mayoría de los receptores nucleares son fosfoproteínas y la fosforilación es un potente regulador de su función como la unión al ADN, la dimerización, el reclutamiento de proteínas coactivadoras, la transactivación y su degradación. JNK fosforilado tiene sitios de unión al RAR- $\alpha$ , lo que resulta en su degradación proteosómica (Hoshikawa et al., 2011; Srinivas et al., 2005; Singh et al., 2012). Por lo que se exploró si JNK regula los niveles de expresión de RAR- $\alpha$  en etapas iniciales de la ND. Se encontró que la administración exógena de ATRA restableció los niveles de expresión del RAR- $\alpha$  mediante la atenuación de su fosforilación en sitios de serina, evitando la interacción pJNK-RAR- $\alpha$  en glomérulos y túbulos proximales de ratas diabéticas. Estos hallazgos en conjunto indican que la señalización del RAR- $\alpha$  se encuentra alterada en condiciones diabéticas lo que contribuye al daño renal observado a nivel glomerular y tubular y la administración exógena de su ligando no solo restablece su actividad, además, ejerce un efecto antiinflamatorio y antifibrogénico en etapas tempranas de la ND.

## **IX. Conclusión**

Este estudio proporciona evidencia sólida que el tratamiento con ATRA preserva la función renal durante la ND temprana a través de tres mecanismos principales: 1) Antiinflamatorio: (i) Suprime la síntesis de moléculas proinflamatorias e induce un aumento en la expresión de IL-10 e IL-4 y (ii) Atenúa la señalización mediada por TLR4- NF- $\kappa$ B. 2) Antifibrogénico: (i) reduce la infiltración de macrófagos y la localización de miofibroblastos en el tejido renal, (ii) suprime la expresión de moléculas de MEC y (iii) Atenúa la señalización TGF- $\beta$ 1/Smad3. 3) El tratamiento con ATRA atenúa la degradación del RAR- $\alpha$  a través del bloqueo de la interacción pJNK-RAR- $\alpha$ . Se presenta un resumen de los mecanismos en el esquema 5.



**Esquema 5.** La hiperglucemia induce daño a nivel glomerular (proteinuria, hiperfiltración e hipertrofia) y tubular proximal (aumento de natriuresis y de la expresión de  $\beta 2$  microglobulina y NGAL, los cuales están asociados a un proceso inflamatorio (aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias) mediado por la señalización TLR4/NF- $\kappa$ B y fibrogénico (reclutamiento de macrófagos, presencia de células  $\alpha$ -SMA positivas y MEC) mediado por TGF- $\beta$ 1/Smad3, además su señalización se encontró afectada por una baja expresión del RAR- $\alpha$  debido a su fosforilación mediada por p-JNK y el tratamiento con ATRA atenuó todos estos cambios observados durante la ND temprana .



## X. Referencias

1. Argyropoulos, C.P.; Chen, S.S.; Ng, Y.H.; Roumelioti, M.E.; Shaffi, K.; Singh, P.P.; Tzamaloukas, A.H. Rediscovering Beta-2 Microglobulin As a Biomarker across the Spectrum of Kidney Diseases. *Front. Med.* 2017, 4, 73, doi:10.3389/fmed.2017.00073.
2. Austenaa LM, Carlsen H, Hollung K, Blomhoff HK, Blomhoff R. Retinoic acid dampens LPS-induced NF- $\kappa$ B activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF- $\kappa$ B reporter mice. *J Nutr Biochem* 2009;20:726–34. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.07.002
3. Austenaa LMI, Carlsen H, Ertesvag A, Alexander G, Blomhoff HK, Blomhoff R. Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging. *FASEB J* 2004;18:1255–7. doi:10.1096/fj.03-1098fje.
4. Bai A, Lu N, Zeng H, Li Z, Zhou X, Chen J, et al. All-trans retinoic acid ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:399–406. doi:10.1089/jir.2009.0028.
5. Basu, T.K.; Basualdo, C. Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutrition* 1997, 13, 804–806.
6. Chalmers, C. (2019). Applied Anatomy and Physiology and the Renal Disease Process. *Renal Nursing*, 21–58. doi:10.1002/9781119413172.ch2
7. Chang, T.-T., & Chen, J.-W. (2020). The Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3172. doi:10.3390/ijms21093172
8. Chen Q, Guan X, Zuo X, Wang J, Yin W. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta Pharm Sin B* 2016;6:183–8. doi:10.1016/j.apsb.2016.02.004.
9. Chen, H.Y.; Huang, X.R.; Wang, W.; Li, J.H.; Heuchel, R.L.; Chung, A.C.; Lan, H.Y. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes* 2011, 60, 590–601, doi:10.2337/db10-0403.
10. Chen, L.; Yang, T.; Lu, D.W.; Zhao, H.; Feng, Y.L.; Chen, H.; Chen, D.Q.; Vaziri, N.D.; Zhao, Y.Y. Central role of dysregulation of TGF-beta/Smad in CKD progression and potential targets of its treatment. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 101, 670–681, doi:10.1016/j.biopha.2018.02.090
11. Chiba, T.; Skrypnik, N.I.; Skvarca, L.B.; Penchev, R.; Zhang, K.X.; Rochon, E.R.; Fall, J.L.; Paueksakon, P.; Yang, H.; Alford, C.E., et al. Retinoic Acid Signaling Coordinates Macrophage-Dependent Injury and Repair after AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016, 27, 495–508, doi:10.1681/ASN.2014111108.
12. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:802–9. doi:10.1681/asn.2010050510.
13. Das, B.C.; Thapa, P.; Karki, R.; Das, S.; Mahapatra, S.; Liu, T.C.; Torregroza, I.; Wallace, D.P.; Kambhampati, S.; Van Veldhuizen, P., et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 673–683, doi:10.1016/j.bmc.2013.11.025.

14. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Muros-De-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2015;2015:948417. doi:10.1155/2015/948417.
15. Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, Ahmed AS. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. *Clin Biochem* 2012;45:646–50. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.02.021.
16. Elmarakby, A. A., & Sullivan, J. C. (2010). Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*, 30(1), 49–59. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00218.x
17. Falke, L.L.; Gholizadeh, S.; Goldschmeding, R.; Kok, R.J.; Nguyen, T.Q. Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis. *Nature reviews. Nephrology* 2015, 11, 233–244, doi:10.1038/nrneph.2014.246.
18. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 2013;93:137–88. doi:10.1152/physrev.00045.2011.
19. Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2018). Epidemiology of diabetes. *Medicine*. doi:10.1016/j.mpmed.2018.10.004
20. Guleria, R.S.; Singh, A.B.; Nizamutdinova, I.T.; Souslova, T.; Mohammad, A.A.; Kendall, J.A., Jr.; Baker, Pang K.M.; Pan, J. Activation of retinoid receptor-mediated signaling ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction in Zucker diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013, 57, 106–118, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.017.
21. Ghaderian SB, Hayati F, Shayanpour S, Beladi Mousavi SS. Diabetes and end-stage renal disease; a review article on new concepts. *J Renal Inj Prev.* 2015; 4(2): 28-33.
22. Gu, Y.-Y., Liu, X.-S., Huang, X.-R., Yu, X.-Q., y Lan, H.-Y. (2020). Papel diverso de TGF- $\beta$  en la enfermedad renal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. Gu, Y.-Y., Liu, X.-S., Huang, X.-R., Yu, X.-Q., & Lan, H.-Y. (2020). Diverse Role of TGF- $\beta$  in Kidney Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.00123
23. Zhao, L., Zou, Y., & Liu, F. (2020). Transforming Growth Factor-Beta1 in Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.00187
24. Guijarro C, Egido J. Transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and renal disease. *Kidney Int* 2001;59:415–24. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059002415.x.
25. Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E., & Gregg, E. W. (2018). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-018-4711-2
26. He, H.; Mennone, A.; Boyer, J.L.; Cai, S.Y. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology* 2011, 53, 548–557, doi:10.1002/hep.24047.
27. Hegazy, G. A., Awan, Z., Hashem, E., Al-Ama, N., & Abunaji, A. B. (2019). Levels of soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes mellitus patients with macrovascular complications. *Journal of International Medical Research*, 0300060519893858. doi:10.1177/0300060519893858
28. Hoshikawa, Y., Kanki, K., Ashla, A. A., Arakaki, Y., Azumi, J., Yasui, T., ... Shiota, G. (2011). c-Jun N-terminal kinase activation by oxidative stress suppresses retinoid signaling through

- proteasomal degradation of retinoic acid receptor  $\alpha$  protein in hepatic cells. *Cancer Science*, 102(5), 934–941. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01889.x
29. Humphreys, B.D. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 2018, 80, 309–326, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
  30. Huynh, P.; Chai, Z. Transforming growth factor beta (TGFbeta) and related molecules in chronic kidney disease (CKD). *Clin. Sci.* 2019, 133, 287–313, doi:10.1042/CS20180438.
  31. Ilyas Z, Chaiban JT, Krikorian A. Novel insights into the pathophysiology and clinical aspects of diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18:21–8. doi:10.1007/s11154-017-9422-3
  32. Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, Yokota K, Yasuda H, Sakai N, et al. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:969–74. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.072.
  33. Jha, J. C., Ho, F., Dan, C., & Jandeleit-Dahm, K. (2018). A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clinical Science*, 132(16), 1811–1836. doi:10.1042/cs20171459
  34. Jheng H-F, Tsai P-J, Chuang Y-L, Shen Y-T, Tai T -a., Chen W-C, et al. Albumin stimulates renal tubular inflammation through an HSP70-TLR4 axis in mice with early diabetic nephropathy. *Dis Model Mech* 2015;8:1311–21. doi:10.1242/dmm.019398.
  35. Juang, J.H.; Van, Y.H.; Kuo, C.H.; Lin, M.Y.; Liu, Y.H.; Chang, H.Y. Prevention and Reversal of Diabetes by All-Trans Retinoid Acid and Exendin-4 in NOD Mice. *Int. J. Endocrinol.* 2014, 2014, 435481, doi:10.1155/2014/435481.
  36. Kinoshita, K.; Yoo, B.S.; Nozaki, Y.; Sugiyama, M.; Ikoma, S.; Ohno, M.; Funauchi, M.; Kanamaru, A. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* 2003, 170, 5793–5798, doi:10.4049/jimmunol.170.11.5793.
  37. Kwok S-K, Park M-K, Cho M-L, Oh H-J, Park E-M, Lee D-G, et al. Retinoic acid attenuates rheumatoid inflammation in mice. *J Immunol* 2012;189:1062–71. doi:10.4049/jimmunol.1102706.
  38. Lane, P.H.; Steffes, M.W.; Mauer, S.M. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney Int.* 1992, 41, 1085–1089.
  39. Li, J., Qu, X., Yao, J., Caruana, G., Ricardo, S. D., Yamamoto, Y., ... Bertram, J. F. (2010). Blockade of Endothelial-Mesenchymal Transition by a Smad3 Inhibitor Delays the Early Development of Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 59(10), 2612–2624. doi:10.2337/db09-1631
  40. Li, S.; Lin, Q.; Shao, X.; Mou, S.; Gu, L.; Wang, L.; Zhang, Z.; Shen, J.; Zhou, Y.; Qi, C., et al. NLRP3 inflammasome inhibition attenuates cisplatin-induced renal fibrosis by decreasing oxidative stress and inflammation. *Exp. Cell Res.* 2019, 10.1016/j.yexcr.2019.07.001, 111488, doi:10.1016/j.yexcr.2019.07.001
  41. Li, Y.; Wang, X.; Zhang, L.; Yuan, X.; Hao, J.; Ni, J.; Hao, L. Upregulation of allograft inflammatory factor1 expression and secretion by macrophages stimulated with aldosterone promotes renal fibroblasts to a profibrotic phenotype. *Int. J. Mol. Med.* 2018, 42, 861–872, doi:10.3892/ijmm.2018.3667

42. Lin, M., Yiu, W. H., Li, R. X., Wu, H. J., Wong, D. W. L., Chan, L. Y. Y., ... Tang, S. C. W. (2013). The TLR4 antagonist CRX-526 protects against advanced diabetic nephropathy. *Kidney International*, 83(5), 887–900. doi:10.1038/ki.2013.11
43. Liu P, Li F, Qiu M, He L. Expression and cellular distribution of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in diabetic renal tubulointerstitial fibrosis, in vitro and in vivo. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;105:206–16. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.020
44. Liu, F.; Yang, H.; Chen, H.; Zhang, M.; Ma, Q. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. *Adv. Med. Sci.* 2015, 60, 133–138, doi:10.1016/j.advms.2015.01.001.
45. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J Leukoc Biol* 2012; 92:753–64. doi:10.1189/jlb.0412214.
46. Lv, W.; Booz, G.W.; Wang, Y.; Fan, F.; Roman, R.J. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur. J. Pharmacol.* 2018, 820, 65–76, doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.016.
47. Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, Chen X, Kwan T, Panchapakesan U, et al. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0097985.
48. Ma, T.-T., & Meng, X.-M. (2019). TGF- $\beta$ /Smad and Renal Fibrosis. *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*, 347–364. doi:10.1007/978-981-13-8871-2\_16
49. Mallipattu, S.K.; He, J.C. The beneficial role of retinoids in glomerular disease. *Front. Med.* 2015, 2, 16, doi:10.3389/fmed.2015.00016.
50. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2014). Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 10(9), 493–503. doi:10.1038/nrneph.2014.114
51. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2505–12. doi:10.1093/ndt/gfh207.
52. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016;8:227–41. doi:10.1002/wsbm.1331.
53. Molina-Jijon, E.; Rodriguez-Munoz, R.; Namorado Mdel, C.; Bautista-Garcia, P.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverri, J.; Reyes, J.L. All-trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *J. Nutr. Biochem.* 2015, 26, 441–454, doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.018.
54. Molina-Jijon, E.; Rodriguez-Munoz, R.; Namorado Mdel, C.; Pedraza-Chaverri, J.; Reyes, J.L. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 72, 162–175, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040.
55. Motawi, T.K.; Shehata, N.I.; ElNokeety, M.M.; El-Emady, Y.F. Potential serum biomarkers for early detection of diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2018, 136, 150–158, doi:10.1016/j.diabres.2017.12.007.
56. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long D a, Cruz PE, et al. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:3651–60. doi:10.1681/ASN.2005030297.

57. Mudaliar H, Pollock C, Ma J, Wu H, Chadban S, Panchapakesan U. The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS One* 2014;9:e108844. doi:10.1371/journal.pone.0108844.
58. Na SY, Kang BY, Chung SW, Han SJ, Ma X, Trinchieri G, et al. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1999;274:7674–80. doi:10.1074/jbc.274.12.7674.
59. Nizamutdinova IT, Guleria RS, Singh AB, Kendall JA, Baker KM, Pan J. Retinoic acid protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Cell Physiol* 2013;228:380–92. doi:10.1002/jcp.24142.
60. O'Brien, L. L., & McMahon, A. P. (2014). Induction and patterning of the metanephric nephron. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 31–38. doi:10.1016/j.semcd.2014.08.014
61. Pan, J.; Guleria, R.S.; Zhu, S.; Baker, K.M. Molecular Mechanisms of Retinoid Receptors in Diabetes-Induced Cardiac Remodeling. *J. Clin. Med.* 2014, 3, 566–594, doi:10.3390/jcm3020566.
62. Panchapakesan, U., & Pollock, C. (2018). The role of toll-like receptors in diabetic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(1), 30–34. doi:10.1097/mnh.0000000000000377
63. Parving, H.H.; Persson, F.; Rossing, P. Microalbuminuria: a parameter that has changed diabetes care. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2015, 107, 1–8, doi:10.1016/j.diabres.2014.10.014.
64. Perez, A.; Ramirez-Ramos, M.; Calleja, C.; Martin, D.; Namorado, M.C.; Sierra, G.; Ramirez-Ramos, M.E.; Paniagua, R.; Sanchez, Y.; Arreola, L., et al. Beneficial effect of retinoic acid on the outcome of experimental acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 2464–2471, doi:10.1093/ndt/gfh400.
65. Pérez-Morales, R. E., del Pino, M. D., Valdivielso, J. M., Ortiz, A., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2018). Inflammation in Diabetic Kidney Disease. *Nephron*, 1–5. doi:10.1159/000493278
66. Pichler R, Afkarian M, Dieter BP, Tuttle KR. Immunity and Inflammation in Diabetic Kidney Disease: Translating Mechanisms to Biomarkers and Treatment Targets. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2016:ajprenal.00314.2016. doi:10.1152/ajprenal.00314.2016.
67. Rao J, Qian X, Wang P, Pu L, Zhai Y, Wang X, et al. All-trans retinoic acid preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury by inhibiting the nuclear factor kappa B signaling pathway. *J Surg Res* 2013;180:e99–106. doi:10.1016/j.jss.2012.04.008.
68. Rayego-Mateos, S., Morgado-Pascual, J. L., Opazo-Ríos, L., Guerrero-Hue, M., García-Caballero, C., Vázquez-Carballo, C., ... Egido, J. (2020). Pathogenic Pathways and Therapeutic Approaches Targeting Inflammation in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3798. doi:10.3390/ijms21113798
69. Rossing, P., & Frimodt-Møller, M. (2018). Clinical Features and Natural Course of Diabetic Nephropathy. *Diabetic Nephropathy*, 21–32. doi:10.1007/978-3
70. Sanz, A. B., Sanchez-Nino, M. D., Ramos, A. M., Moreno, J. A., Santamaria, B., Ruiz-Ortega, M., ... Ortiz, A. (2010). NF- $\kappa$ B in Renal Inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(8), 1254–1262. doi:10.1681/asn.2010020218

71. Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2003;46:1402–7. doi:10.1007/s00125-003-1194-5.
72. Singh, A.B.; Guleria, R.S.; Nizamutdinova, I.T.; Baker, K.M.; Pan, J. High glucose-induced repression of RAR/RXR in cardiomyocytes is mediated through oxidative stress/JNK signaling. *J. Cell. Physiol.* 2012, 227, 2632–2644, doi:10.1002/jcp.23005.
73. Song, N., Thaiss, F., & Guo, L. (2019). NFκB and Kidney Injury. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00815
74. Srinivas, H.; Juroske, D.M.; Kalyankrishna, S.; Cody, D.D.; Price, R.E.; Xu, X.C.; Narayanan, R.; Weigel, N.L.; Kurie, J.M. c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 1054–1069, doi:10.1128/MCB.25.3.1054-1069.2005.
75. Starkey, J.M.; Zhao, Y.; Sadygov, R.G.; Haidacher, S.J.; Lejeune, W.S.; Dey, N.; Luxon, B.A.; Kane, M.A.; Napoli, J.L.; Denner, L., et al. Altered retinoic acid metabolism in diabetic mouse kidney identified by O isotopic labeling and 2D mass spectrometry. *PLoS ONE* 2010, 5, e11095, doi:10.1371/journal.pone.0011095.
76. Sun, M.Y.; Wang, S.J.; Li, X.Q.; Shen, Y.L.; Lu, J.R.; Tian, X.H.; Rahman, K.; Zhang, L.J.; Nian, H.; Zhang, H. CXCL6 Promotes Renal Interstitial Fibrosis in Diabetic Nephropathy by Activating JAK/STAT3 Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 224, doi:10.3389/fphar.2019.00224.
77. Takahashi, H.; Hatta, Y.; Iriyama, N.; Hasegawa, Y.; Uchida, H.; Nakagawa, M.; Makishima, M.; Takeuchi, J.; Takei, M. Induced differentiation of human myeloid leukemia cells into M2 macrophages by combined treatment with retinoic acid and 1α,25-dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE* 2014, 9, e113722, doi:10.1371/journal.pone.0113722.
78. Tang, P.M.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2019, 15, 144–158, doi:10.1038/s41581-019-0110-2.
79. Verzola D, Cappuccino L, D'Amato E, Villaggio B, Gianiorio F, Mij M, et al. Enhanced glomerular Toll-like receptor 4 expression and signaling in patients with type 2 diabetic nephropathy and microalbuminuria. *Kidney Int* 2014;86:1–15. doi:10.1038/ki.2014.116
80. Wagner, J.; Dechow, C.; Morath, C.; Lehrke, I.; Amann, K.; Waldherr, R.; Floege, J.; Ritz, E. Retinoic acid reduces glomerular injury in a rat model of glomerular damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 1479–1487
81. Wang, H.; Dan, Z.; Jiang, H. Effect of all-trans retinoic acid on liver fibrosis induced by common bile duct ligation in rats. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2008, 28, 553–557, doi:10.1007/s11596-008-0514-x.
82. Wang, Y.Y.; Jiang, H.; Pan, J.; Huang, X.R.; Wang, Y.C.; Huang, H.F.; To, K.F.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y.; Chen, J.H. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017, 28, 2053–2067, doi:10.1681/ASN.2016050573.
83. Xue R, Gui D, Zheng L, Zhai R, Wang F, Wang N. Mechanistic Insight and Management of Diabetic Nephropathy: Recent Progress and Future Perspective. *J Diabetes Res* 2017;2017:1839809. doi:10.1155/2017/1839809.

84. Zhang, JL, Rusinek, H., Chandarana, H. y Lee, VS (2013). IRM funcional de los riñones. Revista de imágenes de resonancia magnética, 37 (2), 282–293. doi: 10.1002 / jmri.23717

## X. Anexos

### 1. Arreglo de moléculas inflamatorias en una matriz (RatCytokine)

|  | A | B                   | C                    | D      | E                  | F            | G                    | H                   | I                   | J              | K      | L             |        |
|--|---|---------------------|----------------------|--------|--------------------|--------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------|---------------|--------|
| Each antibody is spotted in duplicate vertically | 1 | POS                 | POS                  | NEG    | NEG                | Activin A    | Agrin                | CD86 (B7-2)         | beta-NGF            | CINC-1 (CXCL1) | CINC-2 | CINC-3        | CNTF   |
|  | 2 |                     |                      |        |                    |              |                      |                     |                     |                |        |               |        |
|  | 3 | Fas Ligand (TNFSF6) | Fractalkine (CX3CL1) | GM-CSF | ICAM-1 (CD54)      | IFN-gamma    | IL-1 alpha (IL-1 F1) | IL-1 beta (IL-1 F2) | IL-1 R6 (IL-1 Rrp2) | IL-2           | IL-4   | IL-6          | IL-10  |
|  | 4 |                     |                      |        |                    |              |                      |                     |                     |                |        |               |        |
|  | 5 | IL-13               | Leptin               | LIX    | L-Selectin (CD62L) | MCP-1 (CCL2) | MIP-3 alpha (CCL20)  | MMP-8               | PDGF-AA             | Prolactin R    | RAGE   | TCK-1 (CXCL7) | TIMP-1 |
|  | 6 |                     |                      |        |                    |              |                      |                     |                     |                |        |               |        |
|  | 7 | TNF alpha           | VEGF-A               | BLANK  | BLANK              | BLANK        | BLANK                | BLANK               | BLANK               | BLANK          | BLANK  | BLANK         | POS    |
|  | 8 |                     |                      |        |                    |              |                      |                     |                     |                |        |               |        |

**Panel de arreglo de moléculas inflamatorias en una matriz.** Contiene 34 moléculas por duplicado que detectan la expresión de **CD86**: del inglés cluster of differentiation, **NGF**: Factor de crecimiento nervioso, **CXCL1**: quimioquina con motif CXC ligando 1, **CINC**: quimioatrayente de neutrófilos inducido por citosinas -2, -3, **CNTF**: factor neurotrópico ciliar, **FAS ligando**, **CX3CL1**: quimioquina con motif C-X3-C ligando 1, **GM-CSF**: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, **ICAM-1**: molécula de adhesión intracelular 1, **IFN-γ**: interferón gama, **ILs**: Interleucinas, 1 beta, -2, -4, -6, -10, -13, **IL-1R6**: Receptor 6 de interleucina 1, **Leptina**, **LIX/CXCL5**: quimioquina 5 con motif CXC, **L-selectina**, **MCP-1/CCL2**: proteína quimioatrayente de monocitos de quimioquina 1, **MIP-3-α/CCL20**: proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa, **MMP-8**: metalopeptidasa de matriz 8, **PDGF-AA**: factor de crecimiento derivado de plaquetas –AA, **Prolactina R**: receptor de prolactina, **RAGE**: receptor de productos finales de glicación avanzada, **TCK-1/CXCL7**: quimioquina con motif CXC ligando 7, **TIMP-1**: inhibidor de metalopeptidasa 1, **TNF-α**: factor de necrosis tumoral alfa, **VEGF-A**: factor de crecimiento vascular endotelial A.

## 2. Publicaciones derivadas de la tesis



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 60 (2018) 47–60

Journal of  
Nutritional  
Biochemistry

# All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B during initiation of diabetic nephropathy

Edith Sierra-Mondragon<sup>a</sup>, Eduardo Molina-Jijon<sup>b</sup>, Carmen Namorado-Tonix<sup>a</sup>, Rafael Rodríguez-Muñoz<sup>a</sup>,  
Jose Pedraza-Chaverri<sup>c</sup>, Jose 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, DF 07360, Mexico

<sup>b</sup>Glomerular Disease Therapeutic Laboratory, Department of Internal Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, United States

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

Received 8 September 2017; received in revised form 4 May 2018; accepted 6 June 2018

### Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of renal failure worldwide and its complications have become a public health problem. Inflammation, oxidative stress and fibrosis play central roles in the progression of DN that lead to renal failure. Potential deleterious effect of inflammation in early evolution of DN is not fully disclosed. Therefore, it is relevant to explore therapies that might modulate this process in order to reduce DN progression. We explored the beneficial effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in early inflammation in glomeruli, proximal and distal tubules in streptozotocin (STZ)-induced diabetes. ATRA was administered (1 mg/kg daily by gavage) on days 3 to 21 after STZ administration. It was found that 21 days after STZ injection, diabetic rats exhibited proteinuria, increased natriuresis and loss of body weight. Besides, diabetes induced an increase in interleukins [IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-16, IL-13, IL-2; tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )] and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), chemokines (CCL2, CCL20, CXCL5 and CXCL7), adhesion molecules (ICAM-1 and L-selectin) and growth factors (GM-CSF, VEGF, PDGF) in glomeruli and proximal tubules, whereas ATRA treatment remarkably ameliorated these alterations. To further explore the mechanisms through which ATRA decreased inflammatory response, the NF- $\kappa$ B/p65 signaling mediated by TLR4 was studied. We found that ATRA administration attenuates the TLR4/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling and prevents NF- $\kappa$ B nuclear translocation in glomeruli and proximal tubules. © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Diabetic nephropathy; Inflammation; Adhesion molecules; Cytokines; All-trans retinoic acid, NF- $\kappa$ B

### 1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN), the major microvascular complication of diabetes mellitus (DM), has become a worldwide public health problem that affects approximately one third of diabetic patients, leading to End-Stage Renal Disease (ESRD) [1]. DN is characterized by glomerular and tubular hypertrophy, thickness of glomerular basement membrane and accumulation of extracellular matrix that finally causes tubulointerstitial and glomerular fibrosis [2]. The pathogenesis in DN is multifactorial due to the participation of different metabolic factors such as polyol pathway activation, advanced glycation end products (AGEs) synthesis, hemodynamic factors such as angiotensin II, endothelin I and oxidative stress [3,4]. Although DN has been considered a nonimmune disease, accumulated evidence has emphasized the critical role of inflammation in the progression of this pathology [5,6]. Inflammatory molecules such as cytokines, chemokines and growth factors as well as cell adhesion molecules play a key role in DN-induced renal injury [7]. It has been demonstrated that

diabetes-associated hyperglycemia alters renal structures and induces the activation of renal resident cells that orchestrate an inflammatory processes, characterized by the secretion of several pro-inflammatory molecules [8,9]. Also, during inflammatory response, the intracellular pathways mediated by nuclear factor kappa beta (NF- $\kappa$ B) regulate the expression of numerous genes that promote kidney injury [10,11]. The active form of NF- $\kappa$ B translocates to the nucleus where it binds to the promoter regions of several genes leading to the progression of DN [12]. Toll-like receptor-4 (TLR4) pathway leads to NF- $\kappa$ B activation thus upregulating pro-inflammatory molecules that initiate local inflammation and leukocyte accumulation [13,14]. In the kidney, TLR4 is expressed by intrinsic renal cells such as podocytes, mesangial cells and tubular epithelial cells which are known to participate in the pathogenesis of DN [15–17]. Experimental studies have suggested that by knocking out TLR4, renal inflammation and fibrosis are attenuated. Therefore, TLR4 importantly participates in the progression of DN [18]. Thus, study of modulation of inflammatory processes in the setting of diabetes mellitus is a matter of great relevance.

On the other hand, all-trans-retinoic acid (ATRA) is a small and lipophilic molecule derived from vitamin A that regulates cellular growth and differentiation, as well as extracellular matrix production in various cell types [19]. Transcriptional activities of ATRA are

\* Corresponding author. Tel.: + 52 5747 3962/3800/5147/5723; fax: + 52 5747 3754.

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





Contents lists available at ScienceDirect

## Data in Brief

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



### Data Article

# Data on nephroprotective effect of all-trans retinoic acid in early diabetic nephropathy



Edith Sierra-Mondragón<sup>a</sup>, Eduardo Molina-Jijón<sup>b</sup>,  
Carmen Namorado-Tónix<sup>a</sup>, Rafael Rodríguez-Muñoz<sup>a</sup>,  
José Pedraza-Chaverri<sup>c</sup>, José L. Reyes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica, y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México CDMX 07360, México

<sup>b</sup> Glomerular Disease Therapeutic Laboratory, Department of Internal Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, United States

<sup>c</sup> Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México CDMX 04510, México

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 8 June 2018

Received in revised form

21 August 2018

Accepted 23 August 2018

Available online 29 August 2018

##### Keywords:

Diabetic nephropathy

Inflammation

All-trans retinoic acid

Cytokines

#### ABSTRACT

Data showed in this report are related to the research article entitled "All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B during the initiation of diabetic nephropathy" by Sierra-Mondragon et al. (2018) [1]. Diabetic nephropathy (DN) has become the main cause of renal failure. Inflammatory molecules such as cytokines, chemokines and growth factors play a key role in DN-induced renal injury Pichler et al. (2016) [2]. Results illustrate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA), an active metabolite of vitamin A, on the renal alterations related to diabetes, among them glomerular and tubular dysfunction, and its effect on renal inflammation in different nephron segments: glomeruli, proximal and distal tubules in an initial stage of DN. Data were obtained by physical-biochemical measurements and Western blot assays performed on isolated glomeruli, proximal and distal tubules from rat kidneys.

© 2018 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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





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

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.08.080>

2352-3409/© 2018 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

# All-Trans Retinoic Acid Attenuates Fibrotic Processes by Downregulating TGF- $\beta$ 1/Smad3 in Early Diabetic Nephropathy

Edith Sierra-Mondragon <sup>1</sup>, Rafael Rodríguez-Muñoz <sup>1</sup>, Carmen Namorado-Tonix <sup>1</sup>,  
Eduardo Molina-Jijon <sup>2</sup>, Daniel Romero-Trejo <sup>3</sup>, Jose Pedraza-Chaverri <sup>4</sup> and Jose L. Reyes <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), Laboratory 36, México DF 07360, Mexico; bio\_edithsierra@hotmail.com (E.S.-M.); rafaelr@fisio.cinvestav.mx (R.R.-M.); cnamora@fisio.cinvestav.mx (C.N.-T.)

<sup>2</sup> Glomerular Disease Therapeutic Laboratory, Department of Internal Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, IL 60612, USA; Eduardo\_MolinaJijon@rush.edu

<sup>3</sup> Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), Laboratory 44, México DF 07360, Mexico; dromeroipn@hotmail.com

<sup>4</sup> Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of México (UNAM), University City D.F. 04510, Mexico; pedraza@unam.mx

\* Correspondence: jreyes@fisio.cinvestav.mx; Tel.: +55-5747-3800-3962; Fax: +55-5747-3754

Received: 24 July 2019; Accepted: 18 September 2019; Published: 25 September 2019



**Abstract:** Diabetic nephropathy (DN) involves damage associated to hyperglycemia and oxidative stress. Renal fibrosis is a major pathologic feature of DN. The aim of this study was to evaluate anti-fibrogenic and renoprotective effects of all-trans retinoic acid (ATRA) in isolated glomeruli and proximal tubules of diabetic rats. Diabetes was induced by single injection of streptozotocin (STZ, 60 mg/Kg). ATRA (1 mg/Kg) was administered daily by gavage, from days 3–21 after STZ injection. ATRA attenuated kidney injury through the reduction of proteinuria, renal hypertrophy, increase in natriuresis, as well as early markers of damage such as  $\beta$ 2-microglobulin, kidney injury molecule-1 (KIM-1), and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). The following parameters increased: macrophage infiltration, localization of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)-positive cells in renal tissue, and pro-fibrotic proteins such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), laminin beta 1 (LAM- $\beta$ 1), and collagens IV and I. Remarkably, ATRA treatment ameliorated these alterations and attenuated expression and nuclear translocation of Smad3, with increment of glomerular and tubular Smad7. The diabetic condition decreased expression of retinoic acid receptor alpha (RAR- $\alpha$ ) through phosphorylation in serine residues mediated by the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK). ATRA administration restored the expression of RAR- $\alpha$  and inhibited direct interactions of JNK/RAR- $\alpha$ . ATRA prevented fibrogenesis through down-regulation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling.

**Keywords:** extracellular matrix; renal fibrosis; retinoic acid receptor; glomeruli; proximal tubules

## 1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is considered a long-term diabetes mellitus complication with proteinuria, a progressive decline in renal function accompanied by glomerular and interstitial fibrosis. It is considered to be the leading cause of dysfunction in end-stage renal disease (ESRD) [1,2]. The fibrotic process is characterized by sustained inflammation, including inflammatory cell infiltration and secretion of cytokines, accumulation and imbalance of extracellular matrix (ECM), with degradation