



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Expresión de la proteína específica de arresto de crecimiento 1  
(Gas1) en las células parietales de la cápsula de Bowman y la nefrona  
distal en riñón sano y en etapas tempranas de la nefropatía  
diabética”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. BRENDA IVONNE LUNA ANTONIO**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

**DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA**

**DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ †**

Ciudad de México

ABRIL, 2022

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

---

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

El comité tutorial que asesoró el presente proyecto estuvo conformado por: Dra. Estela Meléndez Camargo (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional), Dra. María del Carmen García García (Departamento de Farmacología del Cinvestav), Dra. María del Carmen Vivar Estudillo (Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav), Dra. Liliana Favari Perozzi (Departamento de Farmacología del Cinvestav) y Dr. Gilberto Castañeda Hernández (Departamento de Farmacología del Cinvestav). Se agradece al comité tutorial por su valiosa asesoría.

Se reconoce la asesoría técnica de los auxiliares de investigación: Q.F.B. María del Carmen Namorado Tónix, Dr. Rafael Rodríguez Muñoz, Q.F.B. Elsa Irene Sánchez Montes de Oca y Q.F.B. Paula Vergara Zubillaga. También de la invaluable asesoría clínica del especialista en nefrología, Dr. Alejandro Pérez Sánchez; el soporte técnico de Arturo Mena Vieyra y el importante apoyo administrativo de Esther Vargas Sánchez, Alejandra Ortíz Hernández, Beatriz Cecilia Alcántara Castro y Lucero Maricela Fernández Campos. Se agradece a todos por su dedicación y excelente trabajo.

Agradecimientos especiales al Dr. José Segovia Vila por apoyar cada una de las propuestas para este proyecto y por inspirarme a mejorar académicamente. Gracias por la oportunidad de estudiar a esta magnífica proteína Gas1 en el riñón.

---

*Dedicado a:*

*Mis amorosos padres,  
Marisela Antonio Juárez † y Fausto Luna García †*

*Mi querido y estimado Dr. José Luis Reyes Sánchez †*

*Mi hermosa hermana, María Asilladeth Luna Antonio*

*Mango, mi pedacito de cielo en la tierra*

---

## Resumen

La nefropatía diabética (ND) es la complicación más común de la diabetes. Se ha descrito que la diabetes induce la pérdida de podocitos, lo que compromete significativamente el proceso de filtración renal. En casos graves conduce a insuficiencia renal crónica (IRC). Los podocitos son células epiteliales altamente diferenciadas con una nula capacidad de proliferación en condiciones basales. Los mecanismos de regeneración de podocitos implicados en las primeras etapas del daño renal en la diabetes se desconocen. Se ha encontrado una subpoblación de células progenitoras (Cp) en la cápsula de Bowman (CB) del glomérulo con capacidad de autorrenovación y diferenciación a podocitos. Anteriormente, se describió la expresión de la proteína específica de arresto del crecimiento 1 (Gas1) en el riñón, en las células glomerulares y en las células progenitoras renales durante la nefrogénesis. Por esta razón, se analizó la expresión de Gas1 en diferentes segmentos de la nefrona como la cápsula de Bowman y la nefrona distal en condiciones normales y durante las primeras etapas de la ND. Específicamente, se estudió la expresión de Gas1 en la CB y su posible efecto en la activación y diferenciación de las Cp a podocitos en las etapas tempranas de la diabetes. Se encontró que la diabetes disminuye la expresión de Gas1 en la CB y favorece la expresión de marcadores de células progenitoras como NCAM, CD24 y SIX1/2. También se observó un aumento de células que expresan al marcador de podocitos y al marcador de células progenitoras (WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup>) en la CB, lo que sugiere que las Cp iniciaron su proceso de diferenciación. Además se observó una restauración en la densidad de podocitos. Todos estos resultados sugieren que la diabetes favorece la disminución de la expresión de Gas1 y probablemente la activación y diferenciación de las Cp de la cápsula de Bowman a podocitos. Se propone que en las primeras etapas de la diabetes, existe un mecanismo de regeneración de podocitos, donde posiblemente esté involucrada la proteína Gas1. Posteriormente, también se analizó la expresión de Gas1 en el túbulo colector en condiciones normales y en las primeras etapas de la ND. Se identificó a Gas1 como nuevo marcador de células principales. Los resultados confirmaron la expresión específica de Gas1 en las células principales y la capacidad de estas células para diferenciarse a células intercaladas en daño renal inducido por la diabetes. Este es el primer trabajo hasta donde sabemos, que describe la expresión de Gas1 en las células parietales de la cápsula de Bowman y en la nefrona distal.

---

**Abstract**

Diabetic nephropathy (DN) is a most common complication of diabetes. Diabetes induces podocyte loss, which significantly compromises the renal filtration process. In severe cases it leads to chronic renal failure (CRF). Podocytes are highly differentiated epithelial cells with a very low proliferation capacity under basal conditions. The mechanisms of podocyte regeneration involved in the early stages of kidney damage in diabetes are not fully established. A subpopulation of progenitor cells (PC) has been described in Bowman's capsule (BC). These cells have the capacity of self-renewal and eventually might differentiate into podocytes. Previously, the expression of the Growth Arrest Specific protein 1 (Gas1) was described in kidney, especially in glomerular cells and in renal progenitor cells during nephrogenesis. For this reason we analyzed the expression of Gas1 in different nephron segments like in the Bowman's capsule and distal nephron in normal conditions and during early stages of DN. Specifically, we decided to analyze the expression of Gas1 in the BC and its possible effect in the activation and differentiation into podocytes of the PC in the early stages of DN. We found that diabetes decreases the expression of Gas1 in the BC and favors the expression of progenitor cell markers like NCAM, CD24 and SIX1/2. We observed an increase of cells which express podocytes and progenitor cells markers (WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup>) in the BC, suggesting that PC initiated their differentiation to podocytes. We also found a restoration in the podocyte density. All these results suggest that diabetes induced the decrease of Gas1 expression and probably the activation and differentiation of the PC's in the Bowman's capsule. We propose that in early stages of diabetes, a mechanism of podocyte regeneration is present and is associated to the expression of Gas1. Next, we analyzed the expression of Gas1 in the collecting duct in control conditions and in the early stages of diabetes. We identify to Gas1 as novel marker of principal cells. Our results confirm the specific expression of Gas1 in the principal cells and their capacity to differentiate into intercalated cells. This is the first work to the extent of our knowledge that describes the expression of Gas1 in the parietal cells of Bowman's capsule and in the distal nephron.

---

## Índice

<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. Sistema urinario .....	1
2. Riñones .....	1
2.1 Anatomía y fisiología renal .....	1
2.2 La nefrona .....	3
2.3 El glomérulo.....	4
2.4 Podocitos.....	5
2.5 Células parietales de la cápsula de Bowman .....	7
3. Diabetes .....	9
3.1 Nefropatía diabética .....	12
3.2 Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética.....	13
3.3 Alteraciones glomerulares en la nefropatía diabética .....	18
3.4 Pérdida de podocitos en la nefropatía diabética.....	20
3.5 Regeneración de podocitos.....	21
4. La proteína específica de arresto del crecimiento 1 .....	24
4.1 Expresión de Gas1 en el riñón.....	26
<b>II. Justificación.....</b>	<b>28</b>
<b>III. Hipótesis .....</b>	<b>29</b>
<b>IV. Objetivo general.....</b>	<b>29</b>
<b>V. Objetivos particulares.....</b>	<b>29</b>
<b>VI. Materiales y métodos.....</b>	<b>30</b>
1. Diseño Experimental y reactivos.....	30
2. Análisis de los parámetros fisiológicos y bioquímicos .....	30
3. Obtención del tejido renal y aislamiento de los glomérulos totales .....	33
4. Aislamiento de túbulos distales mediante gradientes de Percoll.....	33
5. Extracción de proteínas totales de la médula renal .....	35
6. Western blot.....	35
7. Inmunofluorescencia .....	36
8. Disección de túbulos colectores del riñón de rata.....	38
9. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para Gas1 .....	39

---

10. Cuantificación de pixeles para Gas1, Claudina-2 y NCAM en la cápsula de Bowman	39
11. Cuantificación de células Ki67 y NCAM en la cápsula de Bowman .....	39
12. Cuantificación de las células principales, las células intercalares y las células intermedias en túbulo colectores aislados .....	40
13. Densidad de podocitos en secciones histológicas .....	40
14. Análisis estadístico de datos .....	43
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>44</b>
1. Modelo de diabetes experimental y daño renal.....	44
2. Las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1 .....	46
3. La diabetes favorece la disminución de Gas1 e induce la expresión de los marcadores de células progenitoras en la cápsula de Bowman .....	46
4. La diabetes favorece el aumento de la expresión de PAX2 en la cápsula de Bowman ...	47
5. La diabetes aumenta el número de células WT1 <sup>+</sup> en la cápsula de Bowman .....	51
6. Expresión de nefrina y dendrina durante la etapa temprana de la nefropatía diabética ...	55
7. La diabetes favorece la proliferación de células parietales de la cápsula de Bowman ....	58
8. Expresión de Gas1 en otros segmentos de la nefrona .....	63
9. Expresión de Gas1 en el túbulo distal .....	67
10. Expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector .....	71
11. Expresión de Gas1 en las células intercaladas y presencia de células intermedias en el túbulo colector en la diabetes .....	75
12. Las células principales del túbulo colector expresan marcadores de célula progenitora CD24 y CD133 .....	80
13. Expresión de Gas1, AQP2, CD24 y V-ATPase en fracciones enriquecidas de túbulo colectores de ratas control y diabéticas .....	83
14. El papel de Gas1 en la diferenciación de células principales a células intercaladas: vía de Notch.....	85
15. Expresión de la proteína PAX2 el túbulo colector durante las etapas primarias de la diabetes .....	89
<b>VIII. Discusión .....</b>	<b>92</b>
<b>IX. Conclusión .....</b>	<b>106</b>
<b>X. Perspectivas .....</b>	<b>107</b>
<b>XI. Bibliografía.....</b>	<b>108</b>

---

**Índice de figuras**

Figura 1.	El sistema urinario y sus componentes.....	1
Figura 2.	Estructura macroscópica del riñón.....	3
Figura 3.	Estructura microscópica del riñón: la nefrona.....	4
Figura 4.	Estructura glomerular.....	5
Figura 5.	Podocitos glomerulares.....	6
Figura 6.	Células parietales epiteliales del glomérulo.....	8
Figura 7.	Complicaciones de la diabetes.....	12
Figura 8.	Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética.....	17
Figura 9.	Alteraciones glomerulares inducidas por la diabetes.....	19
Figura 10.	Alteraciones de los podocitos en la nefropatía diabética.....	22
Figura 11.	Células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman.....	23
Figura 12.	Mecanismos moleculares de interacción de Gas1.....	25
Figura 13.	Expresión de Gas1 en el riñón.....	27
Figura 14.	Diseño experimental.....	31
Figura 15.	Aislamiento de glomérulos.....	34
Figura 16.	Gradiente de Percoll de corteza renal.....	36
Figura 17.	Cuantificación de pixeles de la cápsula de Bowman.....	41
Figura 18.	Densidad de podocitos.....	42
Figura 19.	Parámetros fisiológicos y bioquímicos en las ratas diabéticas inducidas con STZ.....	45
Figura 20.	Las células parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1.....	48
Figura 21.	La diabetes favorece la disminución de Gas1 en la cápsula de Bowman y el aumento de marcadores de las células progenitoras (NCAM, CD24, SIX1/2)....	49
Figura 22.	Las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1.....	50
Figura 23.	La diabetes favorece la expresión de PAX2 en las células de la cápsula de Bowman.....	52
Figura 24.	La diabetes favorece la expresión de WT1 en las células de la cápsula de Bowman.....	53
Figura 25.	Las células progenitoras parietales NCAM+ expresan WT1 en las etapas tempranas de la diabetes.....	55
Figura 26.	Expresión de nefrina y dendrina en las etapas tempranas de la diabetes.....	57
Figura 27.	La proliferación de células glomerulares y la expresión de Gas1 en las etapas tempranas de la diabetes.....	60
Figura 28.	La proliferación de células glomerulares y la expresión de Gas1 en las etapas tempranas de la diabetes.....	61
Figura 29.	La proliferación de células glomerulares y la expresión de Gas1 en las etapas tempranas de la diabetes.....	62
Figura 30.	Expresión de Gas1 en los podocitos.....	64

---

Figura 31.	Las células del túbulo proximal no expresan Gas1 .....	65
Figura 32.	Expresión de Gas1 en la nefrona distal.....	66
Figura 33.	Expresión de Gas1 en las células del túbulo distal.....	68
Figura 34.	Expresión de Gas1 en fracciones enriquecidas con túbulos distales.....	69
Figura 35.	Expresión de marcadores de células progenitoras en los túbulos distales de rata adulta.....	70
Figura 36.	Expresión de Gas1 en el túbulo colector.....	72
Figura 37.	Expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector.....	73
Figura 38.	Confirmación de la expresión de Gas1 en las células principales en túbulos colectores aislados.....	74
Figura 39.	Análisis de la expresión de Gas1 en las células intercaladas del túbulo colector.....	75
Figura 40.	Las células intercaladas no expresan a Gas1 .....	77
Figura 41.	Células intermedias Gas1+/V-ATPasa+ en el túbulo colector en diabetes...	78
Figura 42.	Cuantificación de células principales, células intercaladas y células intermedias del túbulo colector en etapas tempranas de la diabetes.....	79
Figura 43.	Las células principales expresan marcadores de célula progenitora.....	81
Figura 44.	Las células principales AQP2+ expresan CD133 en condiciones normales y durante las etapas tempranas de la diabetes.....	82
Figura 45.	Expresión de Gas1 en un enriquecido medular de túbulos colectores.....	84
Figura 46.	Interacción de Gas1 y la vía de Notch.....	87
Figura 47.	Modelos computacionales de interacción de Gas1 y DLK1 .....	88
Figura 48.	Sobreexpresión de PAX2 en las células principales del túbulo colector en las etapas tempranas de la diabetes.....	90
Figura 49.	Sobreexpresión de PAX2 en las células intercaladas del túbulo colector en las etapas tempranas de la diabetes.....	91
Figura 50.	Posible papel de las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman y la proteína Gas1 en la diabetes.....	95
Figura 51.	Posible mecanismo de regeneración de células intercalares V-ATPasa+ en el túbulo colector.....	102
Figura 52.	Participación de Gas1 en la vía de Notch y la diferenciación de células principales a células intercaladas.....	104

---

**Abreviaturas**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACII	Anhidrasa carbónica II
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada *
AKT	Proteína cinasa B
AQP2	Acuaporina 2
AQP4	Acuaporina 4
AR	Aldosa reductasa
BIM	Proteína Bcl-2
CALB	Calbindina
CB	Cápsula de Bowman
CD2AP	Proteína asociada a CD2
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2 *
CEP	Células epiteliales parietales
Ci	Células intercaladas
c-fos	Factor de transcripción de la familia Fos
c-jun	Factor de transcripción de la familia Jun
CLDN2	Claudina-2
CLDN4	Claudina-4
CLDN8	Claudina-8
CPP	Células progenitoras parietales
Cp	Células principales
CD24	Clúster de diferenciación 24
CD133	Clúster de diferenciación 133
DAG	Diacilglicerol
DLL1	Ligando 1 de Notch canónico de la familia Delta *
DLK1	Ligando 1 de Notch no canónico de la familia Delta *
DPP4	Dipeptidilpeptidasa IV
ELF5	Factor de transcripción del dominio ets *
eNOS	Óxido nítrico sintetasa
EROs	Especies reactivas de Oxígeno
ERT	Enfermedad renal terminal
FOXO4	Proteína forkhead O4 *
F6-P	Fructosa 6-fosfato
GAPDH	Deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía *
GLUT	Transportador de glucosa
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
G6FAT	Glutamina:fructuosa-6-fosfato aminotransferasa
G6-P	Glucosa 6-fosfato
HES1	Factor de transcripción 1 de la familia de Hes *
HSPGS	Proteoglicano de heparán sulfato*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

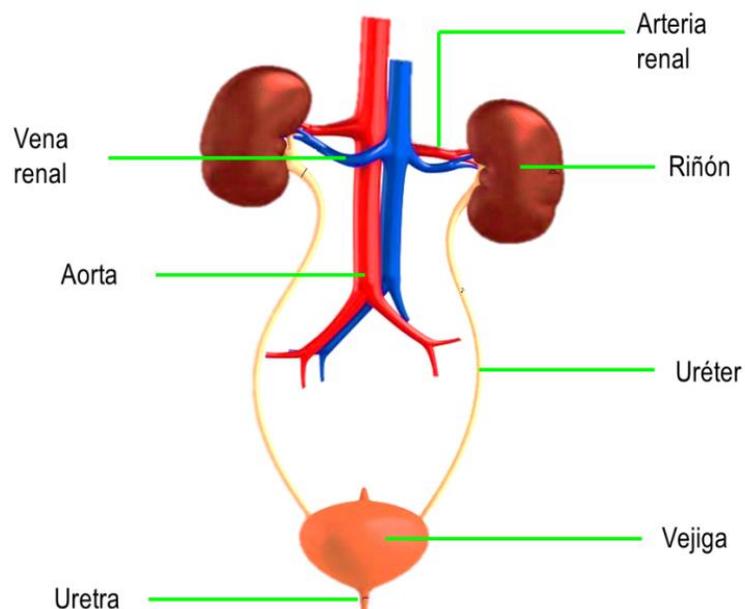
HNF-1 $\alpha$	Factor nuclear de hepatocitos 1 alfa*
JAM-A	Molécula de adhesión A *
Ki67	Proteína de proliferación asociada a antígeno Ki67
LPL	Lipoproteínas de baja densidad*
MAGI	Proteína guanilato cinasa asociada a la membrana*
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos*
MBB	Membrana basal de Bowman
MEC	Matriz extracelular
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCAM	Molécula de adhesión celular neural*
ND	Nefropatía diabética
NDT	Nefrona distal
NEPH1-3	Proteína de la familia NEPH
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
PAX2	Paired box protein 2
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación*
PIK3	Fosfoinositol 3- cinasas *
PKC	Proteína cinasa C *
PP	Podocitos parietales
PTCH	Proteína de la familia Patched*
RAGE	Receptor de AGEs*
RI	Receptor de insulina
SDS	Dodecil sulfato de Na <sup>+</sup>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
Shh	Proteína Sonic hedgehog
SMO	Proteína Smoothed
SIX1/2	Proteína homeobox
SRA	Sistema renina-angiotensina
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
TACE	Dominio de unión a metaloproteinasas
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
V-ATPasa	Bomba de protones de tipo vacuolar*
VEGF	Factor de crecimiento endothelial vacuolar
WT1	Proteína del tumor de Wilms*
ZO-1	Zonula occludens-1

*\*Por sus siglas en ingles*

## I. Introducción

### 1. Sistema urinario

El sistema urinario representa un eje importante y fundamental para el organismo, ya que es un conjunto de órganos encargados de la producción, almacenamiento y expulsión de la orina. El sistema urinario está compuesto por dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra (**Figura 1**). Los riñones se encargan de la formación de la orina, la cual se almacena en la vejiga, al pasar por los uréteres; finalmente, la orina es expulsada de la vejiga por la uretra. El sistema urinario contribuye, junto con los pulmones y el hígado, al mantenimiento de la homeostasis, ya que a través de la orina se eliminan del organismo ciertos productos finales del metabolismo y sustancias tóxicas (1).



**Figura 1.** El sistema urinario y sus componentes. Tomado y modificado de EMS Education System, 2021 (219).

## 2. Riñones

### 2.1 Anatomía y fisiología renal

Los riñones son órganos pares situados en la cavidad retroperitoneal y paravertebral. El peso de cada riñón oscila en un intervalo de 125-170 g en hombres adultos y entre 115-155 g en mujeres adultas. El tamaño de un riñón humano es

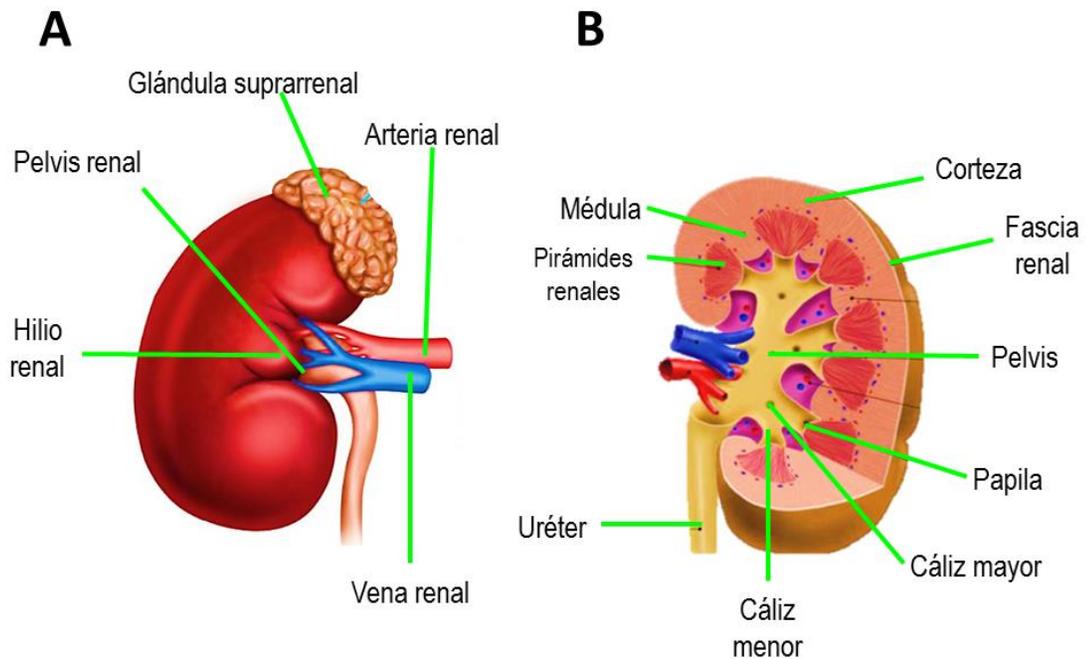
aproximadamente de 11 a 12 cm de largo, 5 a 7 cm de ancho y un grosor de 2.5 a 3 cm. En la parte media del riñón se localiza el hilio renal. El hilio renal es un sitio de entrada y salida a la parte interna del riñón para la pelvis renal, la arteria y vena renal y un plexo nervioso. Los riñones son órganos densos rodeados por una capa de tejido conjuntivo denominada fascia renal, que protege la estructura anatómica del riñón (**Figura 2A**).

Las funciones más importantes de los riñones son:

1. La excreción de productos metabólicos de desecho y sustancias químicas extrañas. Estos productos de desecho metabólicos son la urea (metabolismo de aminoácidos), la creatinina (de la creatina muscular), el ácido úrico (de los ácidos nucleicos, los productos finales de la hemoglobina (como la bilirrubina) y metabolitos de diferentes hormonas. Los riñones también eliminan la mayoría de las toxinas y sustancias exógenas del organismo como pesticidas, fármacos y aditivos alimentarios.
2. La regulación de los equilibrios hídricos y electrolíticos. Mediante la excreción y reabsorción de agua y de electrolitos como el ion sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), hidrogeno ( $\text{H}^+$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).
3. La regulación de la presión arterial. Por la secreción de hormonas como la renina, que favorecen la producción de factores vasoactivos (p. ej. la angiotensina II).
4. La regulación del equilibrio ácido-básico. Mediante secreción de  $\text{H}^+$  por los túbulos renales y reabsorción de bicarbonato.
5. Secreción, metabolismo y excreción de hormonas. Los riñones secretan eritropoyetina que estimula la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas a eritrocitos.

Macroscópicamente, en un corte transversal de riñón se pueden identificar dos zonas, una zona externa denominada corteza y una zona interna denominada médula. La médula posee estructuras cónicas de tejido llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide renal termina en la papila y se proyecta hacia el espacio de la pelvis renal, que es una continuación de forma extendida del uréter. En la pelvis renal se

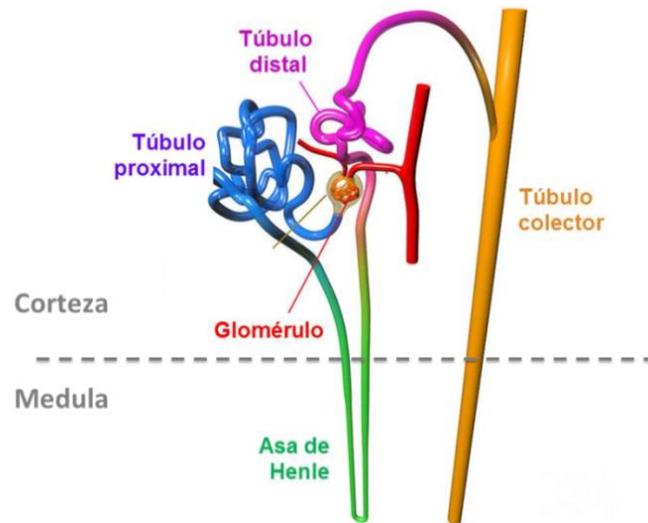
forman estructuras acampanadas abiertas, conocidas como cálices mayores. Al mismo tiempo los cálices mayores se dividen en estructuras de menor tamaño denominadas cálices menores, que recolectan la orina proveniente de la papila renal para llegar así a los uréteres (**Figura 2B**) (2).



**Figura 2.** Estructura macroscópica del riñón. (A) Estructura externa y (B) corte transversal de riñón. Tomado y modificado de Área Ciencias- Biología, 2021 (220).

## 2.2 La nefrona

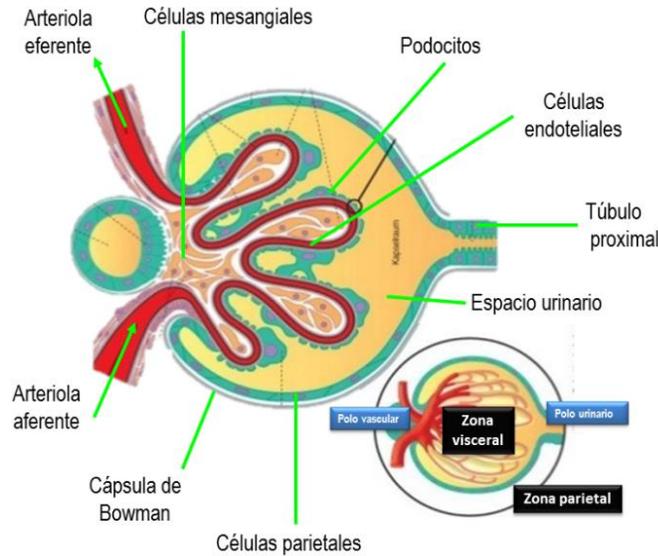
Microscópicamente, el riñón está compuesto por la nefrona. La nefrona es la unidad funcional del riñón y se define como una red tubular perfectamente ordenada que realiza los procesos de filtración, reabsorción y secreción. Cada riñón humano contiene alrededor de 800,000 a 1, 000,000 nefronas y en roedores aproximadamente de 12-16,000 nefronas. Los componentes esenciales de la nefrona son: el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, el túbulo conector y el túbulo colector (**Figura 3**) (3–5).



**Figura 3.** Estructura microscópica del riñón: la nefrona. Tomado y modificado de Russell Kightley media: Scientific Illustrator & Animator, 2020 (221).

### 2.3 El glomérulo

El glomérulo también conocido como corpúsculo renal, es la estructura inicial de la nefrona y el sitio donde se lleva a cabo el proceso de filtración renal. El glomérulo posee una forma de esfera, que se divide en dos zonas: una zona de epitelio visceral (zona interna) y una zona de epitelio parietal (zona externa). En la zona de epitelio visceral se localizan células endoteliales de capilares intraglomerulares, células mesangiales, una membrana basal glomerular (MBG) y células epiteliales o podocitos; en conjunto, estos componentes forman la barrera de ultrafiltración. La zona del epitelio parietal posee una capa de células epiteliales parietales (CEP) monoestratificadas que rodea a la zona visceral glomerular y que en conjunto forman la cápsula de Bowman para dar soporte a la estructura esférica característica del glomérulo. Entre la zona visceral y parietal, existe una cavidad estrecha por donde pasa el filtrado glomerular que produce la barrera de ultrafiltración, para poder llegar a los túbulos renales, esta cavidad recibe el nombre de espacio de Bowman u espacio urinario. Al mismo tiempo, la zona visceral del glomérulo se conecta con el túbulo proximal por el polo urinario. Mientras que la zona visceral y parietal se conectan por el polo vascular, formando una hendidura por donde la arteriola aferente entra y la arteriola eferente sale del glomérulo (**Figura 4**) (6–8).



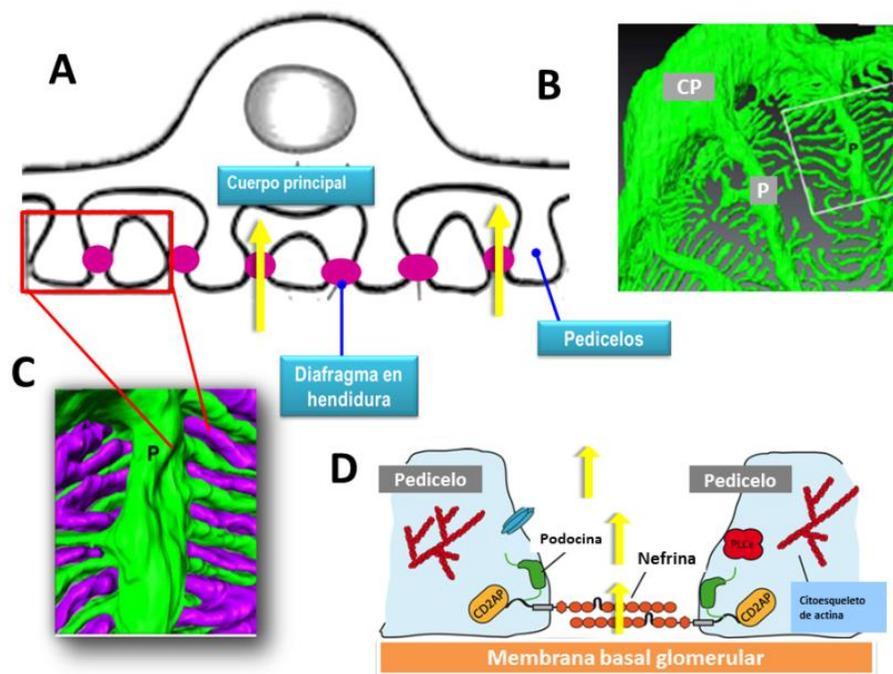
**Figura 4.** Estructura glomerular. El glomérulo o corpúsculo renal, se divide en dos zonas: una zona interna o visceral donde se localizan las células mesangiales, células endoteliales y los podocitos; y una zona externa o parietal donde se localizan las células parietales y la cápsula de Bowman. También posee un polo vascular por donde entra la arteriola aferente y sale la arteriola eferente; así como un polo vascular que conecta al glomérulo con el túbulo proximal. Tomado y modificado de Jefferson *et al.* (2008) (9).

## 2.4 Podocitos

Los podocitos son células epiteliales altamente especializadas y diferenciadas que se encuentran en la zona visceral glomerular. Estructuralmente, los podocitos poseen un cuerpo principal del cual emergen prolongaciones citoplasmáticas primarias y secundarias denominadas pedicelos (**Figura 5A-B**). El cuerpo principal contiene un núcleo prominente, así como un aparato de Golgi y abundante retículo endoplasmático liso y rugoso, lisosomas y mitocondrias. En contraste, los procesos podálicos primarios y secundarios presentan una menor densidad de organelos (10,11).

Los procesos podálicos secundarios se interdigitan con otros pedicelos, rodeando los capilares glomerulares, confiriéndoles así una mayor estabilidad, nula motilidad y, lo más importante, formando el diafragma en hendidura (**Figura 5C**). El diafragma en hendidura es entonces, un punto de contacto intercelular único integrado por diversos tipos de unión celular como proteínas de la unión estrecha (ZO-1, MAGI-1, MAGI-2, JAM-A y CASK), y uniones adherentes (P-caderina, FAT,  $\beta$ -catenina), así

como por un complejo de proteínas transmembranales (nefrina, NEPH1-NPH3, podocina, CD2AP) (**Figura 5D**). El diafragma en hendidura tiene un papel muy importante en la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular, ya que al formar contactos intercelulares mediante proteínas de unión también generan poros o aberturas de determinado tamaño que evita el paso de macromoléculas (p. ej. proteínas mayores a 10,000 daltons como la albúmina) al espacio de Bowman para ser eliminados por la orina. El diafragma en hendidura también tiene otras funciones importantes como la regulación de la plasticidad celular, polaridad celular, supervivencia y endocitosis (12–15).



**Figura 5.** Podocitos glomerulares. (A) Los podocitos están formados por un cuerpo principal (CP) del cual emergen prolongaciones primarias y secundarias denominadas pedicelos (P). (B) Imagen tridimensional de los podocitos donde se muestra el CP y los P. (C) Los procesos podálicos o pedicelos se interdigitan o unen con los pedicelos vecinos de otros podocitos y forman el diafragma en hendidura. (D) El diafragma en hendidura es un punto de contacto intercelular único integrado por proteínas de la unión estrecha (ZO-1, MAGI-1, MAGI-2, JAM-A y CASK), y uniones adherentes (P-caderina, FAT,  $\beta$ -catenina), así como por un complejo de proteínas transmembranales (nefrina, NEPH1-NPH3, podocina, CD2AP). La nefrina forma poros por los cuales atraviesan moléculas pequeñas, favoreciendo el filtrado glomerular (flechas amarillas). Modificado de Ichimura *et al.* (2015) (16)

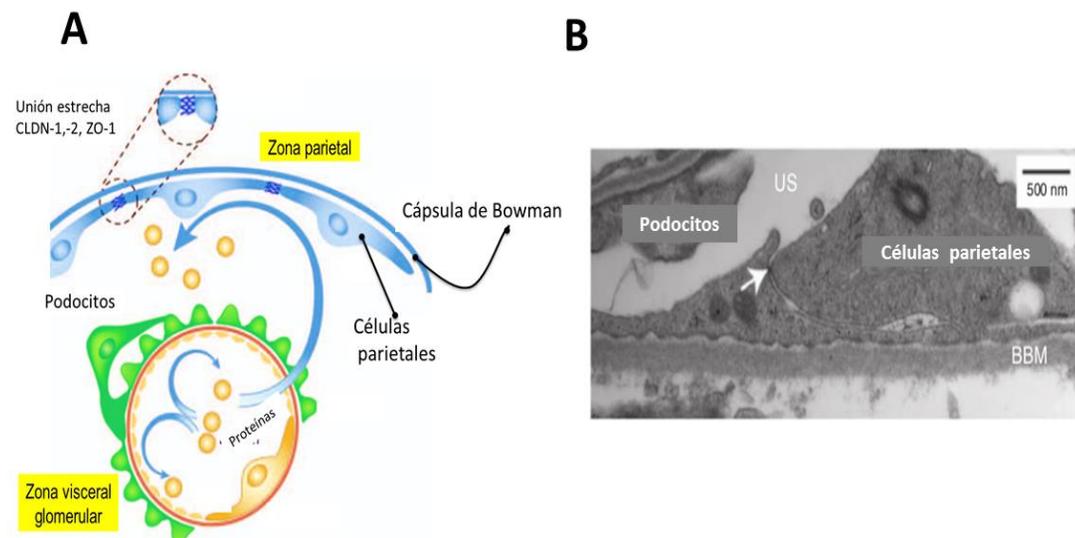
## 2.5 Células parietales de la cápsula de Bowman

El glomérulo se encuentra rodeado por la cápsula de Bowman (CB) o membrana basal de Bowman (MBB) compuesta por laminina, colágeno IV, nidógeno, y proteoglicanos de heparán sulfato; adherida a la cápsula de Bowman se localiza una capa fina de células parietales (**Figura 6A**). Las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman son células epiteliales escamosas, poligonales y monoestratificadas; son células pequeñas con un grosor no mayor a  $0.3\ \mu\text{m}$  (**Figura 6B**). En la superficie celular presentan cilios (1-2 cilios por célula) y microvellosidades de manera heterogénea entre las células (17,18). También se ha descrito la expresión de proteínas de la unión estrecha en las CEP como claudina-1,-2, ocludina y ZO-1 (19–21). Proteínas de adhesión celular como la cadherina-K (Cdh6) y la cadherina específica de riñón (Cdh16) (22,23). Las células parietales en el glomérulo representan el 14.8% de todas las células glomerulares (24).

Funciones de las células parietales de la cápsula de Bowman:

1. Barrera de permeabilidad selectiva. Las CP expresan proteínas de la unión estrecha (claudina-1, -2, ocludina y ZO-1), encargadas del transporte paracelular. Se ha descrito que las CEP poseen una membrana semi-permeable a la peroxidasa de rábano picante de 40 kDa, ya que se han encontrado vesículas pinocíticas con la proteína en el citoplasma. También hay estudios que muestran la permeabilidad de las CEP a dextrano (3 kDa) y a ovoalbúmina (40 kDa), sugiriendo que las CEP pueden tener una función de permeabilidad final al filtrado urinario del espacio de Bowman (25,26).
2. Captación de albúmina. Las CEP capturan albúmina mediante endocitosis, en condiciones de alta concentración (p. ej. enfermedades nefróticas) (27).
3. Contractilidad. En la membrana basal, las CEP poseen filamentos basales (fibrillas), de soporte estructural. Cuando se hace un tratamiento del tejido renal con adrenalina, se observan movimientos contráctiles moderados, sugiriendo que los filamentos basales de las CEP pueden no solo tener una función de soporte estructural, sino también tener un rol importante en el mecanismo de adhesión y migración en la MBB (28).

4. Mecanosensibilidad. Las CEP poseen un cilio primario que sirve como un sensor químico y mecánico. Los cilios de las CEP están expuestos al flujo del filtrado glomerular. Estudios en células tubulares muestran que los cilios de las CEP son responsables de inducir un incremento del calcio intracelular y esto modula la expresión de genes (29).
5. Nicho de célula progenitoras. Se han identificado CEP que expresan marcadores de células progenitoras multipotenciales (CD24, CD133) en la cápsula de Bowman sugiriendo su papel como célula progenitora de podocitos en daño glomerular (30–32).



**Figura 6.** Células parietales epiteliales del glomérulo. **(A)** En la zona parietal o externa del glomérulo, se localizan las células parietales (CP) que forman una monocapa estratificada y delgada a través de proteínas de la unión estrecha como CLDN-1, -2 y ZO-1. La cápsula de Bowman o membrana basal parietal, formada por múltiples capas densa de matriz extracelular proveniente de las CP, compuesta principalmente por el colágeno tipo XIV y el proteoglicano, sulfato de condroitina. **(B)** Morfología de las CP. Las CP son células epiteliales escamosas, poligonales y monoestratificadas; con pocos organelos y escasas microvellosidades y un único cilio. Claudina -1 (CLDN-1), Claudina-2 (CLDN-2) y Zonula occludens-1 (ZO-1). Modificado de Ohse *et al.* (2009) (33).

### 3. Diabetes

Existen determinadas patologías que alteran la estructura y función del riñón, una de ellas es la diabetes. La diabetes es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o la acción de la insulina (34). La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de Langerhans y su función principal es el mantenimiento normal de los niveles de glucosa en sangre, al facilitar el transporte intracelular de glucosa en diversos tejidos (p. ej. células musculares y en adipocitos) (35,36). La acción de la insulina se produce mediante su interacción directa con el receptor de insulina (RI), favoreciendo así la unión de sustratos del receptor de insulina (IRIS -1, -2) al dominio intracelular del RI, promoviendo la vía de señalización PIK3-AKT y la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT 1-5) a la membrana celular, permitiendo la entrada de glucosa a las células para ser utilizada como fuente de energía. Por lo tanto, alteraciones en la síntesis, secreción y acción de la insulina induce altas concentraciones de glucosa en sangre y el desarrollo de la enfermedad crónica, la diabetes (37).

La diabetes se clasifica en: diabetes tipo 1, denominada también como diabetes insulino dependiente o diabetes juvenil, y representa del 5% al 10% de incidencia entre los reportes de diabetes. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas mediada por una respuesta autoinmune, llevando a la deficiencia absoluta de insulina. En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de las células  $\beta$  del páncreas es variable, siendo rápida y mayor en infantes. Por otro lado, en adultos, la destrucción de las células  $\beta$  es lenta y progresiva. Dentro de este tipo de diabetes, también se clasifica la diabetes idiopática, que es un tipo de diabetes tipo 1 en la cual se desconoce su etiología. Los pacientes que desarrollan diabetes idiopática presentan insulinopenia permanente y no presentan evidencia de respuesta autoinmune. Aunque solo una minoría de pacientes con diabetes tipo 1 son diagnosticados en esta categoría, la mayor incidencia ocurre en pacientes con ascendencia africana y asiática.

La diabetes tipo 2, conocida también como diabetes no insulino dependiente o diabetes del adulto, representa del 90% al 95% de incidencia entre los reportes de diabetes. Los pacientes con diabetes tipo 2 presentan una respuesta baja o nula a la insulina (resistencia a la insulina) y una deficiencia de insulina relativa. La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son adultos con problemas de sobrepeso u obesidad. Frecuentemente, la diabetes tipo 2 no es diagnosticada en sus etapas iniciales, ya que el desarrollo de la hiperglucemia es gradual y los síntomas clásicos de la diabetes no son percibidos por los individuos.

También dentro de la clasificación se encuentra la diabetes gestacional, que se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se detecta por primera vez durante el embarazo. Esta definición se aplica independientemente de si se usó como tratamiento la insulina o modificaciones en la dieta, incluso si la condición persiste después del embarazo. A nivel mundial, la diabetes gestacional afecta al 4% de mujeres gestantes, resultando en 135,000 casos anuales y su prevalencia es del 1% al 14 % del total de embarazos. Este deterioro de la tolerancia a la glucosa ocurre normalmente durante el primer trimestre de la gestación.

Existen otros tipos específicos de diabetes asociados a otras causas como:

- Defectos genéticos de las células  $\beta$  del páncreas.

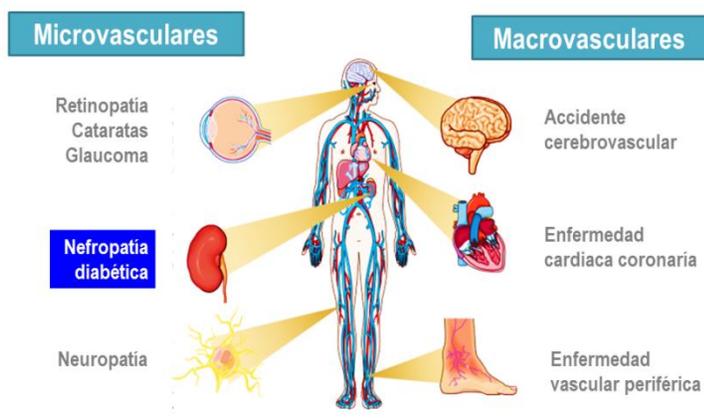
Este tipo de diabetes se asocia con defectos monogénicos en el funcionamiento de las células  $\beta$  del páncreas y se caracteriza por hiperglucemia en edades tempranas (antes de los 25 años), así como alteraciones en la secreción de la insulina sin presentar efectos negativos sobre su acción. La forma más común de este tipo de diabetes está asociada a mutaciones en el cromosoma 12, específicamente en la secuencia que codifica al Factor nuclear de hepatocitos 1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) y también con mutaciones en el cromosoma 7, específicamente en el gen de la glucocinasa.

- Defectos genéticos en la acción de la insulina.  
Este tipo de diabetes se asocia principalmente con mutaciones en el receptor de insulina, desencadenando anomalías en la acción de la insulina sobre las células. Los síndromes de Leprechaun y de Rabson-Mendenhall son síndromes pediátricos que se caracterizan por mutaciones en el gen del receptor de insulina y el cual presentan un déficit funcional del receptor y una extrema resistencia a la insulina.
- Enfermedades exocrinas del páncreas.  
Cualquier proceso que dañe el páncreas y que comprometa su funcionamiento puede causar diabetes. Procesos como pancreatitis, traumas, infecciones, pancreatectomía y carcinoma pancreático.
- Endocrinopatías.  
Muchas hormonas antagonizan la acción de la insulina (p. ej. la hormona del crecimiento, cortisol, glucagón). Patologías con desbalances hormonales que favorezcan el aumento de estas hormonas pueden causar diabetes (p. ej. síndrome de Cushing, acromegalia).
- Diabetes farmacológica o química.  
Una variedad de fármacos pueden alterar la secreción de insulina. Estos fármacos no pueden causar diabetes pero favorecen el desarrollo de la patología en individuos con resistencia a la insulina. Ciertos químicos como el pirinuron (veneno para ratas) y fármacos como la pentamidina intravenosa (antiprotozoario) pueden destruir las células  $\beta$  de páncreas. Existen algunas hormonas y fármacos que alteran la acción de la insulina como el ácido nicotínico y los glucocorticoides. También se ha descrito que el uso de interferón- $\alpha$  induce diabetes asociada a respuesta autoinmune contra las células pancreáticas.

La sintomatología de la hiperglucemia persistente en pacientes diabéticos incluye poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia, visión borrosa y susceptibilidad a infecciones. Las consecuencias de una hiperglucemia no controlada son potencialmente mortales como son la cetoacidosis, el síndrome de hiperglucemia

hiperosmolar no cetósica y la acidosis láctica. La diabetes está asociada a largo plazo con daño, disfunción y fallo de varios órganos especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos (38).

Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican en: complicaciones macrovasculares que se asocian a daño en arterias produciendo enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular e insuficiencia vascular periférica; las complicaciones microvasculares, en contraste, son aquellas que se desarrollan por daño a vasos sanguíneos pequeños. Las complicaciones microvasculares incluyen enfermedad ocular o retinopatía, daño neuronal (neuropatía) y enfermedad renal también denominada como nefropatía, entre otras (**Figura 7**) (39).



**Figura 7.** Complicaciones de la diabetes. La nefropatía diabética es una de las complicaciones con mayor incidencia, el 40% de los pacientes diabéticos presentan esta patología, que puede terminar en insuficiencia renal crónica. Tomado y modificado de Vargas & Savedra (2020) (222).

### 3.1 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una de las causas principales de la enfermedad renal terminal (ERT). La ND se caracteriza por el desarrollo de proteinuria con el subsecuente decline en la tasa de filtración glomerular. Estudios epidemiológicos muestran que entre el 25% y el 40% de pacientes con diabetes tipo 1, y entre el 5% y el 40% de pacientes con diabetes tipo 2 desarrollan ND y ERT (40).

La nefropatía diabética se clasifica en 5 etapas: la etapa de hiperfiltración o etapa temprana se caracteriza por el aumento de la tasa de filtración glomerular y la presión capilar glomerular. La siguiente etapa es conocida como “etapa de silencio”, ya que no hay evidencia clínica de disfunción renal, la filtración glomerular es normal, pero existen cambios estructurales glomerulares importantes como el engrosamiento de la membrana basal glomerular y de la expansión de células mesangiales. La tercera etapa o etapa de microalbuminuria aparece entre los 5 y 15 años posteriores al inicio de la diabetes y se caracteriza por una excreción de albúmina; entre 20-200  $\mu\text{g}/\text{min}$  o 30-300  $\text{mg}/24 \text{ h}$ , y la tasa de filtración glomerular en esta etapa puede aumentar, mantenerse normal o disminuir. Estudios previos han demostrado que la microalbuminuria se asocia con hiperlipidemia e hipertensión. La cuarta etapa aparece entre los 10 a 20 años posteriores al inicio de la diabetes y se caracteriza por una excreción urinaria de albúmina mayor a 300  $\text{mg}/24\text{H}$  (macroalbuminuria). Esta etapa se considera una etapa predictiva para definir la progresión del daño renal a fallo renal con inmediata intervención terapéutica. La quinta etapa se caracteriza por insuficiencia renal, uremia y se define como enfermedad renal terminal. Solo el 40% de los paciente diabéticos con nefropatía alcanzan esta etapa que requiere de una terapia de reemplazo renal como la diálisis peritoneal, la hemodiálisis y en casos severos, el trasplante renal (41–44).

### **3.2 Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética**

Múltiples mecanismos moleculares han sido propuestos para explicar cómo la hiperglucemia induce complicaciones renales en la diabetes. Entre estos mecanismos destacan: la activación de la proteína cinasa C (PKC), el aumento de la vía de los polioles, el aumento del estrés oxidativo y la sobreproducción de productos finales de glicosilación avanzada y el aumento del estrés oxidativo (**Figura 8**) (45).

#### ***Hiperglucemia y el metabolismo celular***

La diabetes se caracteriza por una hiperglucemia crónica. Ante estas concentraciones elevadas de glucosa, las células renales presentan una actividad metabólica elevada. Como ejemplo, tenemos a la glucólisis, donde la glucosa es

fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6-P) y por acción de la fosfoglucosa isomerasa se produce la fructuosa-6-fosfato (F6-P) que a través de diversas reacciones forma gliceraldehído-3-fosfato (G3-P) en grandes proporciones, ante esto, el G3-P entra a la síntesis de lípidos para formar al diacilglicerol (DAG). El DAG es un segundo mensajero y activa a la proteína cinasa C (PKC). PKC es una enzima que fosforila residuos de serina y tirosina de diversas proteínas intracelulares y tiene un papel importante en la fisiopatología de la nefropatía diabética, ya que la expresión elevada de PKC en el riñón, induce alteraciones en la barrera de filtración glomerular, hipertrofia renal, daño endotelial de los capilares intraglomerulares y participa en la vía de señalización de factores de crecimiento (46,47).

La alta producción de fructuosa-6-fosfato (F6-P) que se forma durante la glucólisis en condiciones de hiperglucemia, entra a la vía de las hexosaminas, en donde la fructuosa-6-fosfato se convierte a glucosamina-6-fosfato por acción de la enzima glutamina-fructuosa-6-fosfato aminotransferasa (G6FAT). La enzima G6FAT modula positivamente la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1). El TGF- $\beta$ 1 induce daño endotelial y favorece procesos profibróticos y proinflamatorios en el glomérulo y túbulo proximal (48).

Cerca del 30% de la glucosa en condiciones de hiperglucemia es metabolizada por la vía de los polioles, donde la glucosa es reducida a sorbitol por la enzima aldosa reductasa (AR) dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Posteriormente, el sorbitol es oxidado a fructuosa por acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa utilizando como cofactor a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>). La vía de los polioles induce sobreproducción de sorbitol, el cual no difunde fácilmente a través de la membrana celular manteniéndose en la célula y aumentando la presión osmótica intracelular. La vía de los polioles también induce la depleción relativa del NADPH por su alto consumo por la AR, limitando así la acción de enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y la óxido nítrico sintasa (NOS), también dependientes de NADPH; reduciendo las concentraciones de glutatión (proteína antioxidante), y favoreciendo bajos niveles de óxido nítrico (NO). La vía de los polioles

de manera general altera el sistema redox en las células renales y como consecuencia induce estrés oxidante y osmótico, desencadenando la muerte celular (49,50).

### ***Hiper glucemia y los productos finales de glicosilación avanzada***

En condiciones de hiperglucemia, hay una alta concentración de glucosa intracelular que se condensa mediante una reacción no enzimática con los grupos aminos de proteínas, lipoproteínas y ácidos nucleicos, formando así los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) (51). En condiciones fisiológicas normales y en senescencia, hay una limitada producción de AGEs; pero sus niveles aumentan notablemente en un medio hiperglucémico crónico (52). Existen también la formación de AGEs extracelulares, la glucosa se condensa con proteínas de la matriz extracelular (MEC) como el colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos (53). Estas proteínas modificadas tienen una baja susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por metaloproteinasas (MMP), acumulándose en el espacio extracelular (54). Además, la glicación de proteoglicanos de la membrana celular reduce su electronegatividad y modifica las propiedades de filtración selectivas de carga de la membrana basal glomerular, filtrando proteínas (45,55).

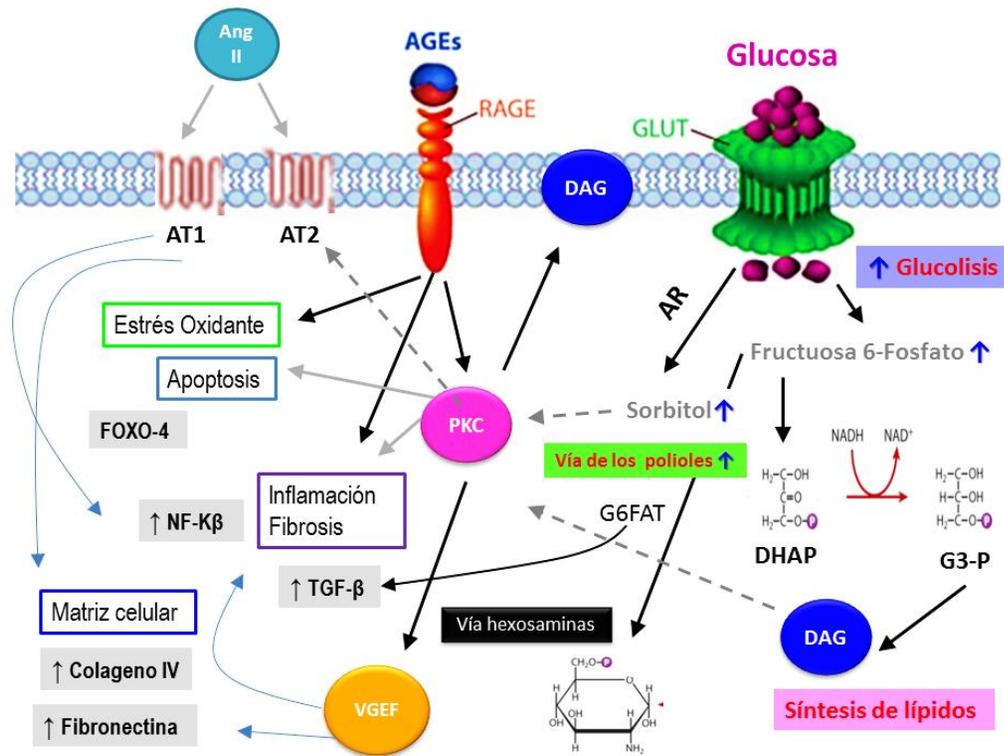
Los AGEs interactúan con sus receptores afines RAGE o con proteínas de unión como OST-48, 80K-H, galectina-3 y el receptor específico de macrófagos tipo II e inducen varios eventos intracelulares. En el podocito y en las células mesangiales del glomérulo se ha descrito la expresión de los receptores afines a AGEs. Una vez que los AGEs se unen a su receptor RAGE, se activan la NADPH oxidasa, la PKC, factores de transcripción NF- $\kappa$ B, y hay aumento de la actividad de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , entre otros. También promueve alteraciones en la expresión de la matriz extracelular, principalmente de colágeno-I, -IV y la expresión de proteínas apoptóticas como FOXO4 y BIM. Todo esto induce un aumento en el estrés oxidativo y la expansión de la matriz extracelular de los podocitos generando el engrosamiento de MBG y el despegamiento y apoptosis del podocito teniendo como consecuencia la reducción en el número de podocitos en el glomérulo, células mesangiales y el desarrollo de glomeruloesclerosis (39,56,57).

### ***Activación de la proteína cinasa C en condiciones de hiperglucemia***

En condiciones de hiperglucemia crónica hay un aumento de la activación de la proteína cinasa C (PKC) asociado fuertemente al incremento en la síntesis *de novo* del DAG en células glomerulares y endoteliales renales; así como también, a la activación de los receptores de AGEs y al aumento de la vía de los polioles (45,58,59).

La nefropatía diabética se caracteriza por una hiperfiltración glomerular inicial. Múltiples mecanismos han sido propuestos para explicar el aumento de la filtración glomerular, uno de ellos se relaciona con las alteraciones del flujo sanguíneo causada por la elevada actividad de PKC que induce la disminución de óxido nítrico (por reducción de la eNOS) y el aumento de la endotelina-1 que favorece la vasoconstricción (60–62). Otro mecanismo propuesto es el aumento del sistema renina-angiotensina y la elevada producción de prostaglandinas en la diabetes, ambas moduladas también por la activación de PKC (63,64). Asimismo, en el endotelio renal la activación de PKC favorece la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) aumentando así la permeabilidad capilar y favoreciendo la hiperfiltración renal (65,66).

El aumento de la activación de la PKC inducido por la hiperglucemia favorece el aumento de la endotelina-1 y la activación de la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que tienen como blanco genético la sobreexpresión de factores de crecimiento fibrótico como TGF- $\beta$ 1 en las células mesangiales y glomerulares, resultando en un aumento de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV) y de proteínas pro inflamatorias (NF-kB) relacionadas con los procesos inflamatorios en las etapas iniciales de la nefropatía diabética (63, 67–72).



**Figura 8.** Mecanismos moleculares de daño en la nefropatía diabética. En condiciones de hiperglucemia aumenta el metabolismo celular y la producción de F6-P y DAG, a través de la glucólisis y la síntesis de lípidos. Ante la alta concentración de F6-P se activan otras vías como: la vía de los polioles y la vía de las hexosaminas. La vía de los polioles convierte a la F6-P en sorbitol. Altas cantidades de sorbitol y DAG, aumentan la actividad de la PKC. La PKC induce procesos pro-inflamatorios vía NF-κB y TGF-β; y la activación del SRA, aumentando así los depósitos de matriz extracelular y favoreciendo la fibrosis en las células renales. También, la PKC aumenta la síntesis y actividad del VEGF, que a su vez induce el aumento de fibronectina e inflamación. La vía de las hexosaminas convierte la F6-P en G6-P por la enzima G6FAT. La G6FAT modula positivamente a TGF-β. Los AGEs al interactuar con sus receptores RAGES inducen el aumento del estrés oxidante, procesos inflamatorios y apoptosis celular. Todos estos eventos celulares inducen daño glomerular, disfunción endotelial y daño tubular. Abreviaturas: Fructuosa 6-Fosfato (F6-P). Diacilglicerol (DAG), Proteína cinasa C (PKC), Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), Factor de crecimiento transformante β (TGF-β), Sistema renina-angiotensina (SRA), Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), Glucosamina 6- fosfato (G6-P), enzima glutamina:fructuosa-6-fosfato aminotransferasa (G6FAT), productos finales de glicosilación avanzada (AGE) y Receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE).

### *Especies reactivas de oxígeno*

En condiciones normales, las especies reactivas de oxígeno (EROs) son producidas en cantidades mínimas para el mantenimiento de la homeostasis celular pero en condiciones de hiperglucemia la cantidad aumenta drásticamente (73). Se ha descrito que las especie reactivas de oxígeno que inducen daño renal incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $-OH$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (74). Las EROs son generadas por dos vías: por la fosforilación oxidativa mitocondrial y por el sistema de NADPH-oxidasa.

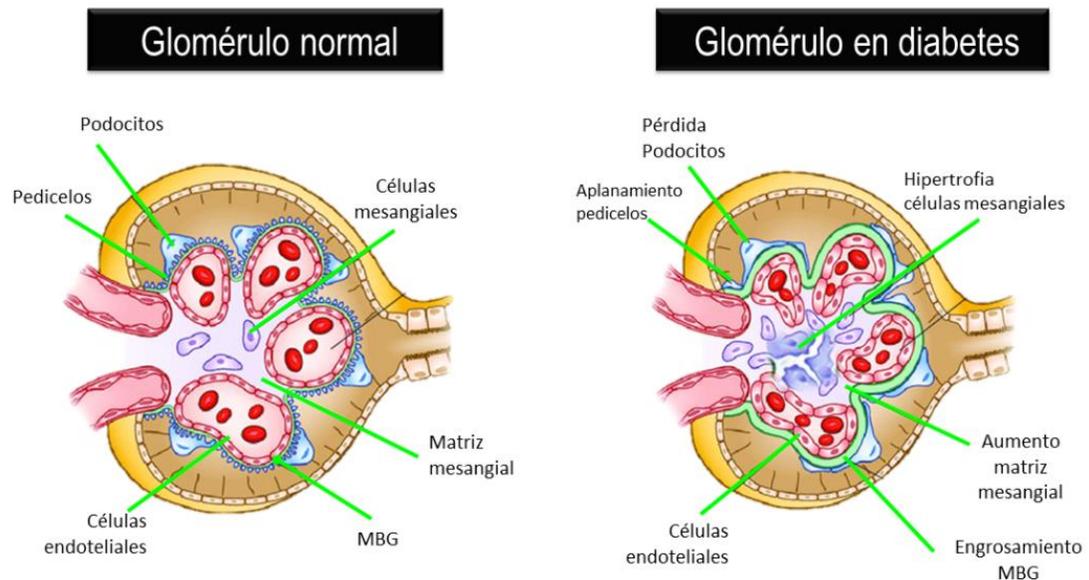
El daño renal inducido por especies reactivas de oxígeno en diabetes se produce por la oxidación de proteínas, lípidos y ADN, afectando la estructura y la función celular. La peroxidación lipídica por EROs afecta a los lípidos de la membrana celular y a las lipoproteínas plasmáticas, principalmente a las lipoproteínas de baja densidad (LPL). En el glomérulo, la oxidación de lipoproteínas por EROs induce una glomerulopatía lipoproteica desarrollando una glomerulosclerosis por hiperlipoproteinemia glomerular. La acumulación de LPL en el glomérulo favorece la proliferación de células mesangiales vía c-jun y c-fos; así como la apoptosis de células endoteliales. En las células glomerulares, las EROs también estimulan la actividad de citocinas y quemocinas implicadas en lesiones inflamatorias renales a través de la expresión de TGF- $\beta$  y el factor nuclear kappa B (NF-kB). También, se ha descrito el papel del radical superóxido en la apoptosis de las células glomerulares inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (46,75).

### **3.3 Alteraciones glomerulares en la nefropatía diabética**

Una vez que se han descrito los mecanismos moleculares del daño renal inducido por la diabetes, es importante identificar las anormalidades histológicas de la nefropatía diabética (**Figura 9**). Inicialmente, en la nefropatía diabética, los riñones presentan un aumento de tamaño típico como resultado de la hipertrofia de células tubulares y de todas las células glomerulares (glomerulomegalia).

El primer evento de daño glomerular que ocurre en la diabetes es el engrosamiento de la membrana basal glomerular. La MBG contiene colágeno tipo IV, laminina 521 ( $\alpha 5\beta 21$ ) y proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), sintetizados principalmente por los podocitos. El engrosamiento de la MBG es inducido principalmente por la disminución en la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz extracelular) y un aumento de sus inhibidores. El engrosamiento de la MBG reduce el tránsito de proteínas a través de la membrana de ultrafiltración. Sin embargo, el cambio estructural en la MBG afecta a los componentes celulares cercanos, reduciendo la unión de células a la MBG y favoreciendo su despegamiento.

Secundario al engrosamiento de la MBG, ocurre la expansión mesangial, que es el incremento de las proteínas de la matriz extracelular de las células mesangiales (colágeno tipo IV, V y VI, lamininas y fibronectina), seguido de la hipertrofia celular. Por último, hay una disminución en el número de podocitos, que representan un paso determinante en la evolución de la enfermedad renal en la nefropatía diabética (10,9).



**Figura 9.** Alteraciones glomerulares inducidas por la diabetes. Modificado de Alicic *et al.* (2017) (76).

### 3.4 Pérdida de podocitos en la nefropatía diabética

Se ha demostrado que en las primeras etapas de la nefropatía diabética existe una pérdida importante de podocitos (podocitopenia) en humanos y se correlaciona fuertemente con la proteinuria y con la disminución de la filtración glomerular, así también con glomeruloesclerosis (77–79). Por lo que, la podocitopenia es un factor determinante en la progresión del daño renal en la diabetes (80,81).

Las causas de la pérdida de podocitos en la nefropatía diabética son multifactoriales y es un área de estudio ampliamente conocida. Entre las causas se encuentran (**Figura 10**):

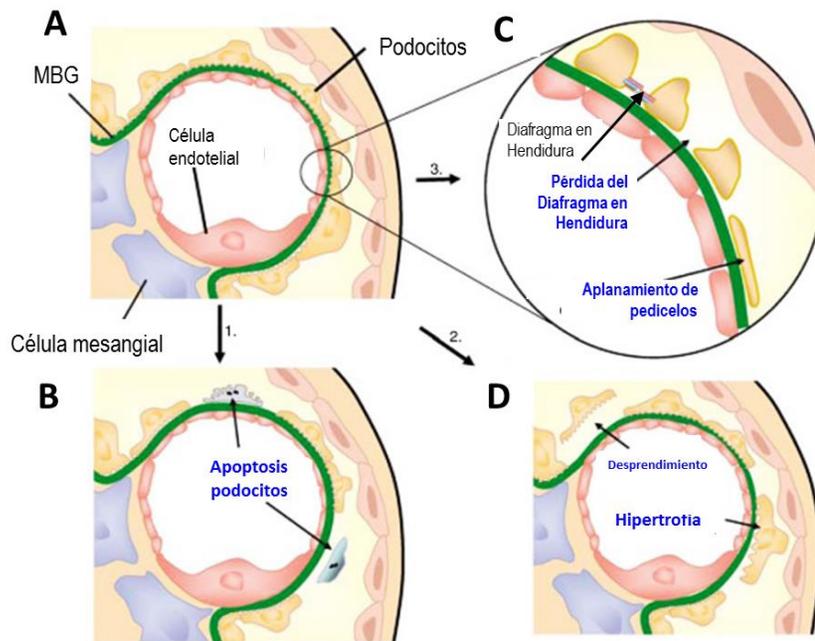
1. El desprendimiento de los podocitos de la membrana basal glomerular. Los podocitos normalmente se encuentran adheridos a la membrana basal glomerular por la integrina  $\alpha3\beta1$  y distroglicanos. Los defectos en la expresión de la integrina  $\alpha3\beta1$  y los distroglicanos favorece el desprendimiento de los podocitos de la MBG. Estudios previos han demostrado una disminución en la expresión de la integrina  $\alpha3\beta1$  en pacientes con nefropatía diabética (82,83). También, se ha observado que altas concentraciones de glucosa modulan negativamente la expresión de la integrina  $\alpha3\beta1$  y los distroglicanos en cultivos celulares de podocitos (84,85). Existe evidencia documentada del desprendimiento de podocitos de la MBG y su subsecuente aparición en la orina (podocituria) (86–89).
2. La apoptosis de podocitos. La muerte celular programada de los podocitos es otra causa importante de podocitopenia (90). Estudios previos han demostrado que el aumento exógeno de TGF- $\beta1$  induce apoptosis en cultivos celulares de podocitos vía p38 MAPK y la vía clásica de caspasas (91). También altas concentraciones de angiotensina II inducen la apoptosis de podocitos mediante la activación de los receptores para angiotensina tipos I y II (92,93). Es importante recordar que en condiciones crónicas de alta glucosa existe una sobre expresión de TGF- $\beta1$  y Angiotensina II.

3. La incapacidad de proliferar de los podocitos. La capacidad de replicación para restablecer el número de podocitos resulta nula ante la pérdida de podocitos por el desprendimiento de la MBG o por apoptosis celular, ya que los podocitos son incapaces de proliferar (86). Algunos estudios han demostrado que la baja capacidad de proliferación se debe al desequilibrio en la expresión las de proteínas específicas que regulan el ciclo celular (94). Se ha descrito *in vivo* e *in vitro* una expresión baja (casi nula) de la ciclina A y de la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) en podocitos (95,96). También, se ha observado una alta expresión de los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas como p21 y p27 evitando la progresión del ciclo celular (97–100).

La pérdida de podocitos en la nefropatía diabética representa un factor determinante para la evolución del daño renal, desarrollando en casos severos insuficiencia renal crónica. Los podocitos por ser células altamente diferenciadas y con una tasa de proliferación nula presentan mecanismos de regeneración deficientes frente a patologías como la diabetes, limitando así la función glomerular (9).

### **3.5 Regeneración de podocitos**

Los podocitos forman parte de la barrera de filtración glomerular, la disfunción o pérdida de los mismos representa un punto crucial en el desarrollo inicial de enfermedades glomerulares con la consecuente progresión a glomerulosclerosis para finalizar con la enfermedad renal crónica (101–103). La disminución del número de podocitos en el glomérulo es un estado patológico alarmante, ya que los podocitos no poseen la capacidad para replicarse, por lo cual, carecen de mecanismos para compensar las células que se han perdido, este declive en el número de podocitos fatalmente induce una disfunción glomerular progresiva e irreversible.

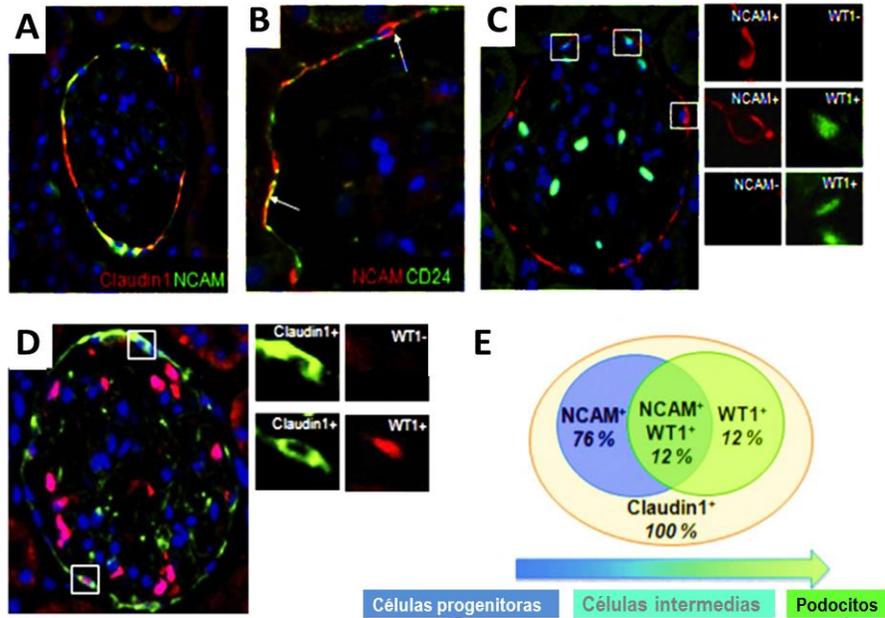


**Figura 10.** Alteraciones de los podocitos en la nefropatía diabética. (A) Estructura normal de los podocitos y del glomérulo. En la nefropatía diabética: (B) algunos podocitos entran en apoptosis celular dando como resultado una notable reducción en el número total de podocitos. (C) La arquitectura normal del diafragma en hendidura se pierde, principalmente por los cambios estructurales que sufren los pedicelos (hipertrofia o aplanamiento). (D) Los podocitos sufren cambios morfológicos como el incremento del tamaño celular (hipertrofia), induciendo el desprendimiento de los podocitos de la membrana basal glomerular, en la zona visceral glomerular. Tomado de Jefferson *et al.* (2008) (9).

Se han realizado diversos estudios en modelos experimentales de daño glomerular agudo con podocitopenia abrupta en donde existe una restauración del número de podocitos. Los podocitos remanentes al daño, no muestran actividad proliferativa, ya que expresan al inhibidor de la cinasa dependiente de ciclinas p57, sugiriendo así que existe un mecanismo de regeneración de podocitos, en el cual intervienen otro tipo de células renales. El origen de las células que participan en este proceso se desconoce (104–106).

Estudios previos han descrito 3 subpoblaciones de células parietales epiteliales (**Figura 11**) en la cápsula de Bowman: células progenitoras parietales (CPP) (31,32,107) que expresan marcadores de células progenitoras como NCAM<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> y CD133<sup>+</sup>; células intermedias (CI) que expresan marcadores de células progenitoras y

marcadores específicos de podocitos (NCAM<sup>+</sup>/WT1<sup>+</sup>) y células que expresan únicamente marcadores de podocitos como WT1<sup>+</sup> y podocalixina<sup>+</sup>, identificándolos como podocitos parietales (PP). Estos resultados demostraron que existen células progenitoras parietales con un fenotipo inmaduro y con un alto potencial de diferenciación a podocitos (108–110).



**Figura 11.** Células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman en un riñón normal de rata. (A) Imagen representativa de la inmunofluorescencia de la proteína específica de células parietales de la cápsula de Bowman, claudina-1 (rojo) y el marcador de células progenitoras NCAM (verde). Existe co-localización de ambas proteínas (zonas amarillas). (B) Imagen representativa de la inmunofluorescencia de los marcadores de células progenitoras renales NCAM (rojo) y CD24 (verde). Se observa la co-localización de ambas proteínas en las células de la cápsula de Bowman (zonas amarillas). (C) Imagen representativa de la inmunofluorescencia, donde se observan tres diferentes subpoblaciones celulares en la cápsula de Bowman: células parietales progenitoras (NCAM<sup>+</sup>/WT1<sup>-</sup>); células intermedias (NCAM<sup>+</sup>/WT1<sup>+</sup>) y podocitos parietales (NCAM<sup>-</sup>/WT1<sup>+</sup>). (D) Identificación de células parietales (claudina-1<sup>+</sup>) que expresan marcadores específicos de podocito (WT1<sup>+</sup>) en la cápsula de Bowman. (E) Representación esquemática de las subpoblaciones celulares identificadas en la cápsula de Bowman en ratas Wistar. Todas las células fueron positivas para el marcador de células parietales claudina 1. Se describió por primera vez una subpoblación de células en la cápsula de Bowman con diferentes grados de diferenciación: 76% de las células muestran un fenotipo de célula progenitoras, 12% son células con fenotipo de célula intermedia y 12% son podocitos parietales. Tomado de Benigni *et al.* (2011) (108).

Con estos hallazgos se propone por primera vez un mecanismo de regeneración de podocitos, sugiriendo que la cápsula de Bowman es un nicho de células progenitoras

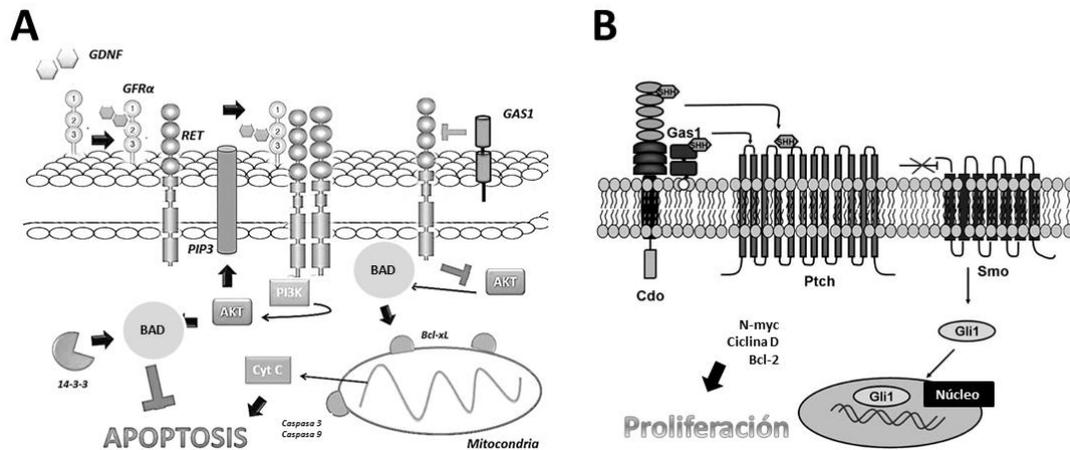
parietales. Es posible que frente a la pérdida de podocitos inducida por el daño glomerular, las células parietales progenitoras se activen, iniciando así su proceso de diferenciación a podocitos en la cápsula de Bowman, para después migrar de la zona parietal a la zona visceral y poder compensar el número de podocitos que se han perdido inicialmente. Hasta el momento, no se han estudiado ampliamente los mecanismos moleculares involucrados en la activación y en la diferenciación de las células progenitoras parietales a podocitos (109).

Recientemente, se describió que el ácido retinoico juega un papel importante en el proceso de diferenciación de las células progenitoras parietales a podocitos, en modelos experimentales murinos de nefropatía membranosa y glomeruloesclerosis. Los resultados demuestran que el ácido retinoico aumenta el número de células que expresan marcadores de células progenitoras y de podocitos (células intermedias), así como el aumento del número total de podocitos (111,112). También, se ha demostrado que el tratamiento con el inhibidor BIO de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), aumenta la diferenciación de las células progenitoras parietales a podocitos en un modelo experimental de nefropatía inducida por doxorubicina, sugiriendo que la inducción de la diferenciación de las CPP a podocitos, podría ser una estrategia farmacológica para el tratamiento de la enfermedad glomerular (113). Por lo que el estudio de nuevas proteínas en el riñón podría ser la clave para describir los mecanismos de regeneración de podocitos.

#### **4. La proteína específica de arresto del crecimiento 1**

La proteína específica de arresto de crecimiento 1 (Gas1, por sus siglas en inglés) es una proteína integral de membrana con un anclaje glucosil-fosfatidil-inositol (GPI), compuesta por 345 aminoácidos y con un peso molecular de 37 kDa (114–116). Gas1 es una proteína pleiotrópica implicada en diversos procesos celulares incluyendo funciones pro-apoptóticas y de arresto celular. En muestras humanas de gliomas y adenocarcinoma de pulmón, la sobreexpresión de Gas1 inhibe la proliferación celular e induce un estado quiescente en las células tumorales, sugiriendo un papel importante de Gas1 como supresor de tumores al bloquear la transición de la fase G0/S en el ciclo

celular. También, la sobreexpresión de Gas1 induce la apoptosis de neuronas del hipocampo y astrocitos, así como en condiciones patológicas de neuroblastomas y gliomas (117,118). Gas1 participa en las vías de señalización de Sonic Hedgehog y del factor neurotrófico derivado de la Glía/ret, mecanismos moleculares bajo los cuales induce sus funciones anti-proliferativas y pro apoptóticas (**Figura 12**) (119–121).



**Figura 12.** Mecanismos moleculares de interacción de Gas1. **(A)** Vía del GDNF-RET. En condiciones normales, el ligando GDNF se une a su co-receptor GFR $\alpha$  para formar un complejo con los receptores RET permitiendo la autofosforilación de los receptores. La fosforilación del complejo Ret, favorece la interacción con PI3K. PI3K activa la vía de señalización de AKT favoreciendo el secuestro de la proteína pro-apoptótica BAD en el citoplasma por la proteína 14-3-3 inhibiendo así la apoptosis celular. Se ha descrito que Gas1 interacciona directamente con el co-receptor GFR $\alpha$  evitando así la formación del complejo Ret y la activación de la vía PI3K-AKT, favoreciendo la translocación de la proteína BAD a la mitocondria y como resultado la liberación del citocromo C al citoplasmas, activando a la caspasa-3 y -9, induciendo la muerte celular. La vía del GDNF-RET tiene un papel importante en los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo de diferentes órganos. **(B)** Vía de Sonic Hedgehog (Shh). El receptor para el ligando Shh es Patched (Ptch). Patched está constitutivamente inhibido por la proteína Smoothened (Smo). La interacción ligando-receptor (Shh-Ptch), desinhibe a Ptch por Smo y se lleva a cabo la vía de señalización intracelular en la que se activan proteínas como Gli1, -2, y -3, que se traslocan al núcleo y activan la transcripción de genes como N-myc, ciclina-D y Bcl-2 que promueven la proliferación. Gas1 interacciona directamente con el ligando Shh, inhibiendo la vía de señalización e induciendo el arresto celular. Tomado de Domínguez-Monzon *et al.* (2011) (122).

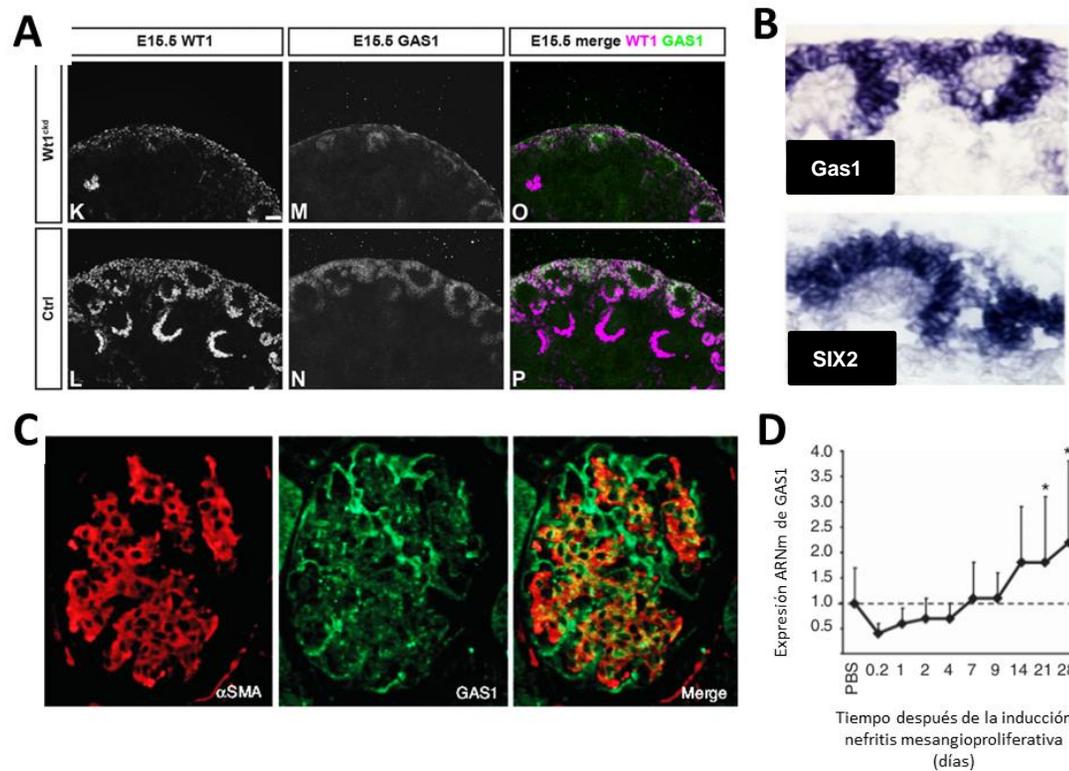
Estudios recientes han demostrado que Gas1 presenta propiedades específicas como supresión de metástasis y promoción de la apoptosis en los tumores de pulmón, la vejiga, la tiroides, el estómago y en las células de melanoma, sugiriendo un papel potencial como proteína supresora de tumores. Otros estudios han propuesto a Gas1

como marcador de metástasis en el cáncer de vejiga y colorrectal (123–126). Previamente, se reportó la regulación positiva de Gas1 por VE-caderina y por el factor de crecimiento vascular endotelial (VGEF) en células endoteliales (127). También, se ha descrito la expresión de Gas1 durante el desarrollo folicular y su modulación por el factor de transcripción C/EBP, sugiriendo un rol importante en los procesos de ovulación y luteinización (128).

#### 4.1 Expresión de Gas1 en el riñón

La expresión y función de Gas1 no ha sido estudiada extensamente en el riñón. Un estudio previo describió la expresión de Gas1 en las células progenitoras de nefronas Six2<sup>+</sup> en las etapas tempranas de la embriogénesis renal y demostró que la expresión de Gas1 es modulada por el factor de transcripción WT1. Se ha propuesto que la expresión de Gas1 durante la nefrogénesis se asocia al mantenimiento de las células progenitoras en la mesénquima metanéfrica (**Figura 13 A-B**) (129).

En el riñón maduro, se ha descrito la expresión de Gas1 en el glomérulo, principalmente en las células mesangiales. En un modelo de glomerulonefritis mesangioproliferativa se observó que la expresión de Gas1 disminuyó significativamente durante la fase de proliferación de las células mesangiales, sugiriendo la función de Gas1 como inhibidor endógeno de la proliferación de células glomerulares (**Figura 13 C-D**) (130). Otro estudio, ha mostrado que la expresión de Gas1 es modulada negativamente por el miR-34a en condiciones de alta glucosa *in vitro*. También se ha descrito la expresión de Gas1 en carcinoma renal (131,132).



**Figura 13.** Expresión de Gas1 en el riñón. **(A)** Expresión de Gas1 en la mesénquima metanéfrica durante las primeras etapas de la embriogénesis renal. Gas1 es modulada positivamente por el factor de transcripción WT1. **(B)** Hibridación *in situ* del ARNm de Gas1 y SIX2. Gas1 tiene un patrón de expresión similar al de las células progenitoras de nefronas (CPN) SIX2<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que Gas1 se expresa en las CPN durante la nefrogénesis. Expresión de Gas1 en riñón maduro. **(C)** Imagen representativa de inmunofluorescencia del marcador específico de células mesangiales,  $\alpha$ -SMA (rojo) y Gas1 (verde). Existe co-localización de Gas1 y  $\alpha$ -SMA. Estos resultados sugieren que las células mesangiales expresan Gas1. **(D)** En un modelo experimental de nefritis mesangioproliferativa, se observa que en los primeros días del modelo experimental, caracterizado por el aumento de la proliferación de células mesangiales, la expresión del ARNm de Gas1 disminuye significativamente en comparación con el control. A partir del día 7 y hasta el día 28, en donde la proliferación de células mesangiales disminuye drásticamente en el modelo experimental de nefritis, la expresión del ARNm de Gas1 aumenta de forma gradual. Estos resultados sugieren que Gas1 podría tener un papel importante como inhibidor endógeno de la proliferación de células glomerulares en el riñón. Tomado de van Roeyen *et al.* (2012) y Kann *et al.* (2015) (129,130)

## II. Justificación

La incidencia mundial de la diabetes ha aumentado abruptamente en los últimos años. Un 8.4% de la población global padece esta enfermedad crónico-degenerativa. Cerca de 1.2 millones de defunciones anuales son asociadas directamente a la diabetes y a sus complicaciones. Estos datos resultan alarmantes, por lo que se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas y farmacológicas basadas en el estudio de la fisiopatología de la diabetes. Una característica importante de esta patología es la hiperglucemia crónica, que compromete severamente la función de diversos órganos entre ellos los riñones. La nefropatía diabética es una de las complicaciones de la diabetes y la principal causa de la enfermedad renal terminal, que se caracteriza por el daño glomerular, tubular y la disfunción de la unidad de ultrafiltración conduciendo al desarrollo de proteinuria e insuficiencia renal crónica. La patogénesis renal de la diabetes es compleja. Sin embargo, se ha descrito que el daño glomerular en las primeras etapas de la nefropatía diabética se caracteriza por una notable disminución de podocitos. Los podocitos son células epiteliales altamente diferenciadas con una nula capacidad de proliferación, por lo que su pérdida representa un factor clave para la evolución del daño renal. Se tiene evidencia que en la cápsula de Bowman existe una sub-población de células progenitoras renales con un alto potencial de diferenciación a podocitos. Hasta ahora no se han realizado estudios que describan la regeneración de podocitos en las primeras etapas de la nefropatía diabética. Recientemente, se describió la expresión de la proteína Gas1 en células progenitoras renales durante la nefrogénesis, pero la expresión y función de Gas1 en el riñón maduro se desconocen. Por esta razón, en este estudio se explora la expresión de Gas1 en las células parietales progenitoras de la cápsula de Bowman y su papel en la proliferación y diferenciación a podocitos en las primeras etapas de diabetes como un posible mecanismo de regeneración. También se analiza la expresión de Gas1 en otros segmentos de la nefrona como los podocitos, el túbulo proximal y la nefrona distal, para conocer la expresión de Gas1 en el riñón maduro y su relación con el daño renal inducido por la diabetes.

### III. Hipótesis

La proteína Gas1 se expresa en diferentes segmentos de la nefrona como en las células de la cápsula de Bowman y la nefrona distal. Se espera que Gas1 inhiba la proliferación y la diferenciación de las células parietales progenitoras de la cápsula de Bowman. Por lo tanto, en etapas tempranas de la nefropatía diabética, la disminución de Gas1 en la cápsula de Bowman favorece la activación de las células progenitoras parietales y su diferenciación a podocitos en el glomérulo. En la nefrona distal Gas1 participa en la diferenciación de células principales a células intercaladas.

### IV. Objetivo general

Analizar la expresión y función de Gas1 en diferentes segmentos de la nefrona, especialmente en las células parietales y en las células progenitoras de la cápsula de Bowman en un modelo de diabetes experimental murina.

### V. Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de Gas1 en células parietales de la cápsula de Bowman en condiciones normales y en el daño renal inducido por la diabetes.
2. Evaluar la expresión de marcadores de células progenitoras renales (CD24, NCAM, SIX1/2) y de Gas1 en la cápsula de Bowman en condiciones normales y en el daño renal inducido por la diabetes.
3. Analizar la expresión de marcadores mesenquimales (PAX2) y de Gas1 en la cápsula de Bowman en condiciones normales y en el daño renal inducido por la diabetes.
4. Evaluar la expresión de marcadores específicos del podocito (WT1) en las células de la cápsula de Bowman en condiciones normales y en el daño renal inducido por la diabetes.
5. Evaluar la expresión de marcadores de proliferación celular (Ki67, PCNA) y de Gas1 en las células parietales de la cápsula de Bowman en condiciones normales y en el daño renal inducido por la diabetes.
6. Analizar la expresión de Gas1 en los podocitos, el túbulo proximal y la nefrona distal (túbulo distal y túbulo colector) y su relación con la diabetes.
7. Estudiar la expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector y su posible relación con la diferenciación celular.

## VI. Materiales y métodos

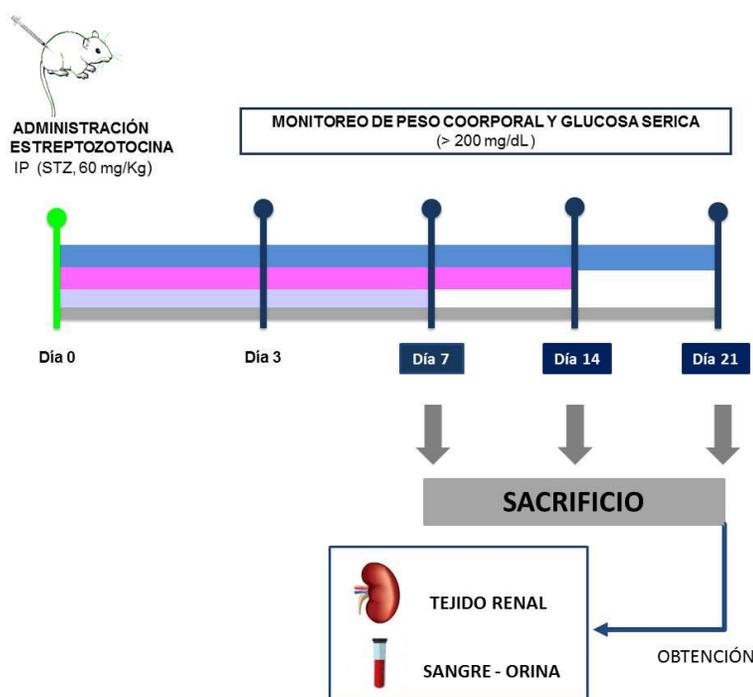
### 1. Diseño Experimental y reactivos

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se aprobaron por la Unidad Institucional de Producción y Experimentación con Animales de Laboratorio (UPEAL) con el protocolo No. 491. Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar con un peso corporal entre 200-250 g. Las ratas se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) a  $22 \pm$  °C de temperatura ambiente y  $50 \pm 5\%$  de humedad ambiental. Los animales se mantuvieron con acceso libre a agua y alimento. La diabetes tipo I se indujo mediante la administración intraperitoneal de una dosis única de estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg de peso corporal) diluida en amortiguador de citratos, pH 6.0. A las ratas controles (no diabéticas) se les administró únicamente amortiguador de citratos, pH 6.0, por vía intraperitoneal. Tres días después de la administración de STZ, se midió la concentración de glucosa en sangre con el glucómetro OneTouch Ultra® (Milpitas, California, EUA), para confirmar la inducción de diabetes. Las ratas se consideraron diabéticas cuando la concentración de glucosa en sangre fue igual o superior a 200 mg/dL. Las ratas se sacrificaron a la primera, segunda y tercera semana después de la administración de STZ (**Figura 14**). Los reactivos empleados se adquirieron en su mayoría de Sigma-Aldrich Co., o en otras empresas mencionadas. Se muestra la lista de anticuerpos utilizados en los ensayos de western blot e inmunofluorescencia (**Tabla 1**).

### 2. Análisis de los parámetros fisiológicos y bioquímicos

Se monitoreó la concentración de glucosa en sangre y el peso corporal de las ratas en condiciones previas a la administración de la STZ y cada 7 días por tres semanas después de la inducción de la diabetes. Para la recolección de muestras urinarias, las ratas se colocaron 24 h previas al sacrificio en jaulas metabólicas y se midió el volumen urinario (**Figura 14**). Para la obtención de suero, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal). Previo al sacrificio se recolectó la sangre por punción cardíaca. La sangre se centrifugó (800 x g durante 10 minutos). Para evaluar la función renal, se midió la proteinuria y la depuración de

creatinina. La proteinuria se midió mediante el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, California, EUA) (133). La creatinina sérica y urinaria se midió mediante el método de Jaffé, previamente descrito (134). Las ratas diabéticas presentan poliuria persistente que podría generar valores elevados de la excreción urinaria de proteínas de los grupos diabéticos. La proteinuria se corrigió por la cantidad de creatinina urinaria, calculando el cociente proteinuria/creatinina (ambos se expresaron en unidades de mg/dL).



**Figura 14.** Diseño experimental. En el día 0, se indujo la diabetes en ratas. Se administró por vía intraperitoneal (IP) la estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg) en una sola dosis. Al día 3, se confirmó la inducción de la diabetes experimental midiendo los índices glucémicos de las ratas. Se consideraron como ratas diabéticas, aquellas que presentaron valores iguales o superiores a 200 mg/dL. Se monitoreó el peso y glucosa sérica en las ratas diabéticas desde el día 3 hasta el día 21. 24 h antes de cada sacrificio, las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas para obtener muestras de orina y sangre por punción cardiaca para las pruebas de la función renal. El sacrificio de las ratas se realizó el día 7, 14 y 21 para obtener el tejido renal.

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados en western blot (Wb) e inmunofluorescencia (IMF).

<b>Anticuerpo (especie)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>No. Catalogo</b>
Alexa-flúor 488 (conejo)	1:200 (IF)	Invitrogen	A21206
Alexa-flúor 488 (cabra)	1:200 (IF)	Invitrogen	A11055
Alexa-flúor 488 (ratón)	1:200 (IF)	Life Technologies	A21202
Alexa-flúor 594 (ratón)	1:200 (IF)	Invitrogen	A21203
Alexa-flúor 594 (conejo)	1:200 (IF)	Invitrogen	A21442
AQP2 (cabra)	1:200 (IF)	Santa Cruz Biotech.	SC-9882
V-ATPasaB1/B2 (ratón)	1:500 (WB);1:50 (IF)	Santa Cruz Biotech.	SC-271832
Calbindina (ratón)	1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	SC-365360
Claudina-2 (ratón)	1:500 (WB);1:100 (IF)	Invitrogen	32-5600
Claudina-8 (cabra)	1:200 (IF)	Santa Cruz Biotech.	Sc-33065
Claudina-4 (ratón)	1:200 (WB)	Invitrogen	32-9400
CD24 (cabra)	1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	Sc-7034
CD24 (ratón)	1:400 (WB)	BD Biosciences	551133
CD133 (	1:100 (IF)		
DPP4 (ratón)	1:200 (IF)	AbD Serotec	MCA924
Dendrina (cabra)	1:250 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-167616
GAPDH (ratón)	1:500 (WB)	Millipore	32233
GAPDH (ratón)	1:500 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-47724
Gas1 (conejo)	1:100 (IF); 1:500 (WB)	ProSci Inc.	
Histona H4 (conejo)	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotech	Sc-34263
Ki67 (conejo)	1:50 (IF)	Abcam	AB16667
NCAM (cabra)	1:100 (IF);1:250 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-1507
Nefrina (cabra)	1:500 (WB);1:300 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-19000
PAX2 (conejo)	1:300 (WB); 1:50 (IF)	Invitrogen	71-6000
PCNA (rata)	1:500 (WB)	ICN/CAPPEL	PC10MAB
Peroxidasa-conjugado (conejo)	1:20000 (WB)	Invitrogen	65-6120
Santa Cruz Biotechnology	1:20000 (WB)	Invitrogen	62-6520
Peroxidasa-conjugado (cabra)	1:20000 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-2020
SIX 1/2	1:300 (WB)	Santa Cruz Biotech.	Sc-398193
WT1	1:400 (WB); 1:100 (IF)	Santa Cruz Biotech.	Sc-192

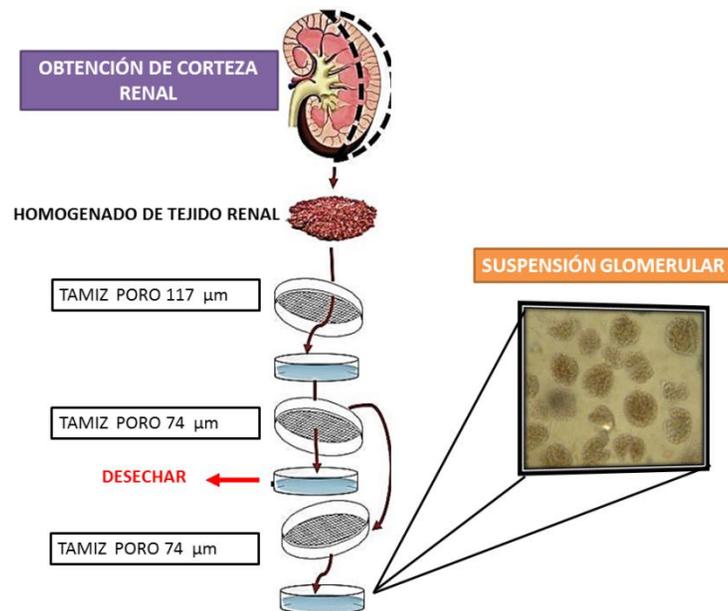
### 3. Obtención del tejido renal y aislamiento de los glomérulos totales

Los glomérulos se aislaron de la manera descrita en la técnica de los artículos citados (135,136). Los riñones se obtuvieron de ratas control y ratas diabéticas de una, dos y tres semanas. Los riñones se perfundieron con solución salina isotónica (SSI 0.9% NaCl), se descapsularon, se pesaron y se aisló la corteza. Posteriormente, se criopreservaron en 2-metilbutano a 4°C y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el día de los experimentos. Los glomérulos totales se aislaron como se ha descrito previamente. En resumen, la corteza renal se homogeneizó manualmente. Después la mezcla cortical homogeneizada se tamizó a través de una malla de acero inoxidable con un tamaño de poro de 117 µm (Cat. No. 8321A44: Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) aplicando presión y lavando generosamente con solución 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 NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 5.5 glucosa, 5 alanina, 0.5 de albúmina sérica bovina (ASB) y pH 7.4 con una osmolaridad de 290 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O. La suspensión obtenida se transfirió a una segunda malla con un poro de 74 µm (Cat. No. 8321A58: Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) aplicando presión y lavando con solución RKB. Se recuperó el tejido que quedó en la parte superior de la malla, el cual contenía los glomérulos aislados (**Figura 15**). La suspensión glomerular obtenida se centrifugó en solución RKB durante 10 minutos a 20000 x g. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el botón final.

### 4. Aislamiento de túbulos distales mediante gradientes de Percoll

Los túbulos distales se aislaron mediante gradientes de Percoll como se describió en la técnica de los artículos citados (137,138). En resumen, se aisló la corteza renal de ratas control y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. La corteza renal se homogeneizó y se resuspendió en 3 mL de solución RKB adicionado con 15 mg de colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (Sigma- Aldrich Co.) y 0.5 mL de ASB al 10%. Todas las muestras se gasificaron por 20 minutos con 95% de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico en un baño de H<sub>2</sub>O con agitación vigorosa a 37°C. Se adicionaron 20 mL de solución RKB a 4°C con inhibidores de proteasa (Complete 1X; Boehringer Mannheim, Alemania) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1mM), la mezcla se

agitó vigorosamente para combinar bien todos las soluciones y favorecer la dispersión de los fragmentos de tejido renal. Posteriormente, la suspensión se filtró para remover las fibras de tejido conectivo y se centrifugó ( $18 \times g/10 \text{ min}$ ). El botón se resuspendió en 10 mL de solución RKB más inhibidores de proteasa y se centrifugó nuevamente ( $18 \times g/10 \text{ min}$ ). Este proceso de lavado se repitió dos veces. Por último, el botón obtenido en el último lavado se resuspendió con 5 mL de ASB al 5 % y con Complete 1X, se incubó por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se centrifugó ( $18 \times g/10 \text{ min}$ ). Se retiró el sobrenadante y el botón final se resuspendió con una mezcla de 30 mL de solución de Percoll fría y RKB (1:1 v/v). Finalmente, la mezcla se centrifugó ( $107 \times g/40 \text{ min}$ ). Se observó la formación de 4 fracciones: la primera fracción (F1) estaba enriquecida con túbulos distales, la segunda (F2) y tercera fracción (F3) contenía una mezcla de diferentes segmentos de la nefrona (glomérulos, túbulos proximales y distales), la cuarta fracción (F4) enriquecida con túbulos proximales (**Figura 16**). Las fracciones se analizaron en un microscopio de luz para confirmar las características morfológicas de todos los segmentos tubulares que se obtuvieron.



**Figura 15.** Aislamiento de glomérulos.

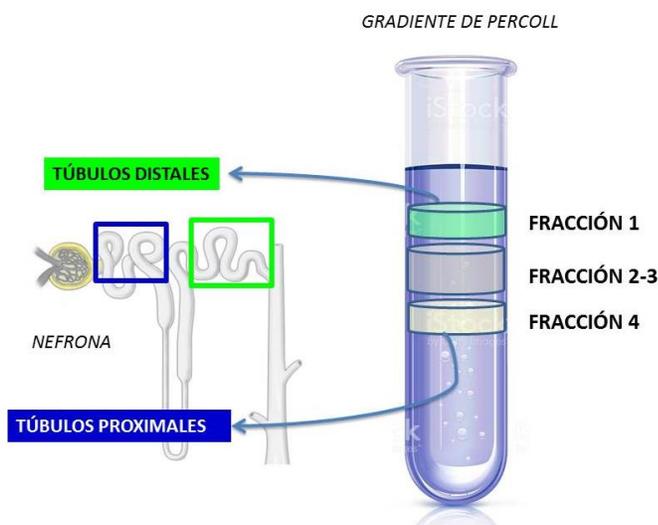
## 5. Extracción de proteínas totales de la médula renal

Para realizar la extracción de proteínas totales, se obtuvo la médula renal de ratas control y de ratas diabéticas de 7,14 y 21 días. La médula renal se homogeneizó manualmente y se resuspendió en 10 mL de solución RKB con 15 mg de colagenasa tipo II. Las muestras se gasificaron durante 20 min con 95 % de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico en un baño de agua a 37 °C con agitación vigorosa. A continuación, se adicionaron 20 mL de solución RKB frío que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete 1x) y PMSF, para inactivar la colagenasa. Para remover las fibras de colágeno del tejido medular, la suspensión se centrifugó (18 x g/10 min). Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. El botón final se resuspendió en 250-300 µL de amortiguador de RIPA, que contenía en mM: 40 Tris-HCl, 150 NaCl, 2 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.5 % desoxicolato de Na<sup>+</sup> y 0.2 % de dodecil sulfato de Na<sup>+</sup> (SDS) a pH7.6 y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se sonicaron 3 veces durante 3 segundos cada vez en un sonicador ultrasónico de alta intensidad (Vibracell; Sonics & Materials, Inc., Connecticut, EUA) y se centrifugaron durante 30 minutos. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes.

## 6. Western blot

El análisis de la expresión de las proteínas mediante western blot se realizó de la manera descrita en la técnica del artículo citado (139). En resumen, las muestras de proteínas totales de médula renal y glomerulares se diluyeron (1:5) en amortiguador de Laemmli con urea (5 M) y se desnaturalizaron por calor durante 12 min. Las proteínas se cargaron en geles de SDS-PAGE al 10 %. En paralelo con las muestras se cargaron marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) para identificar correctamente las proteínas a analizar. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Bioscience, Upsala, Suecia). Para las uniones no específicas, las membranas se bloquearon/incubaron con una solución de caseína 3X (VECTOR, sp-5020; Burlingame, California, EUA) diluida en PBS con 0.05% de tween 20. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios. (Tablas 1). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBS

con tween 20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 1) a temperatura ambiente por 1 h. Las membranas se revelaron con el reactivo de detección ECL (Amersham™, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), después de 5 lavados con PBS con tween 20, para retirar el exceso de anticuerpo secundario remanente en las membranas. La quimioluminiscencia se detectó utilizando el software EC3 Imaging System (UVP BioImaging Systems, Cambridge, Reino Unido). La densitometría de las bandas se cuantificó mediante transmitancia (UVP BioImaging Systems Software).



**Figura 16.** Gradiente de Percoll de corteza renal. En el gradiente de Percoll de corteza renal se distinguen cuatro fracciones. En la fracción 1 (F1) se separan los túbulos distales, en las fracciones 2 y 3 (F2-F3) se encuentra una mezcla de glomérulos -túbulos renales y por último, en la fracción 4 (F4) se separan los túbulos proximales.

## 7. Inmunofluorescencia

### *Inmunofluorescencia con fijación del tejido renal con metanol*

Las muestras de tejido renal se prepararon para inmunofluorescencia como se describió en la técnica de los artículos citados (136,139,140). En resumen, se cortaron rebanadas de riñón de 0.5 cm de espesor y se sumergieron por 5 minutos en 2-metilbutano a 4°C para congelarlas posteriormente en nitrógeno líquido. Se cortaron rebanadas de 4 µm de espesor en un criostato (Leica CM 1510 Cryostat, Wetzlar, Alemania) y se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina.

Para los experimentos de inmunofluorescencia, los cortes de tejido renal se fijaron en metanol por 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se re-hidrataron con PBS 1X (5 minutos a temperatura ambiente) para permeabilizar posteriormente con PBS con 1% Tritón X-100 (durante 12 minutos). Posteriormente, las rebanadas se lavaron 3 veces (PBS 1X) y se bloquearon con 1% (v/v) de ASB libre de IgGs (1331-A, Research Organics, Cleveland, Ohio, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios por 16 h a  $4^{\circ}\text{C}$  (**Tabla 1**). Después, los cortes se lavaron 3 veces con PBS (5 min a temperatura ambiente) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 1**) por 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBS 1X (5 min a temperatura ambiente). Los núcleos se marcaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente, a las preparaciones se les adicionó el medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, California, EUA) para preservar la fluorescencia y se les colocó un cubreobjetos (montaje). Las inmunofluorescencias se analizaron con un microscopio confocal invertido (TCS-SP2 Leica, Heidelberg, Alemania), y con el programa LAS AF LITE Leica Microsystem software. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron de manera independiente por lo menos tres veces utilizando tres muestras diferentes por grupo. Como control negativo, las laminillas se marcaron de manera específica en ausencia de los anticuerpos primarios

### ***Inmunofluorescencia con exposición de epitopos por citrato de sodio y calor***

Las muestras de tejido renal se prepararon para inmunofluorescencia como se describió previamente. En resumen, los cortes de tejido renal se fijaron en paraformaldehído al 3% (Aldrich M3, 263-1; Milwaukee, Wisconsin, EUA) y se lavaron con PBS tres veces (5 minutos a temperatura ambiente). Los cortes se incubaron con buffer de citrato de sodio (J. T. Baker, Xalostoc, México) 10 mM, primero por 20 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$  y después por 20 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con PBS con 2% Tween 20 por 10 minutos. Posteriormente, las rebanadas se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 1% (v/v) de ASB libre de IgGs (1331-A, Research Organics, Cleveland, Ohio, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con los

anticuerpos primarios por 16 h a 4°C (**Tabla 1**). Posteriormente, el protocolo de inmunofluorescencia continuó como se describió anteriormente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron de manera independiente por lo menos tres veces utilizando tres muestras diferentes por grupo. Como control negativo, las laminillas se marcaron de manera específica en ausencia de los anticuerpos primarios

### **8. Disección de túbulos colectores del riñón de rata**

La disección de los túbulos colectores se realizó de la manera descrita en la técnica de los artículos citados (141,142). En resumen, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal) y se obtuvieron los riñones. Inmediatamente, los riñones se descapsularon y se colocaron en una solución de 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 NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 5.5 glucosa, 5 alanina, 0.5 de albúmina sérica bovina (ASB) y pH 7.4 con una osmolaridad de 290 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O a 4°C y se cortaron rebanadas de 1-2 mm de espesor a lo largo del eje cortico-medular. Los cortes se mantuvieron en RKB a 4°C, pH 7.4, 95% de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico durante la disección. Para la disección se utilizó un microscopio estereoscópico. Los túbulos colectores se aislaron manualmente utilizando pinzas de punta fina y jeringas alargadas con punta extrafina. Los túbulos colectores aislados se identificaron por su morfología y se colocaron en portaobjetos recubiertos con gelatina. Posteriormente, se realizó el protocolo para inmunofluorescencia. En resumen, las preparaciones se lavaron con PBS con Ca<sup>2+</sup> (0.1 M) tres veces y se fijaron con 95% etanol frío por 1 minuto y con acetona hasta evaporación a temperatura ambiente. Para permeabilizar, las preparaciones se incubaron con PBS con 1% Tritón X-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) durante 10 minutos y se lavaron 5 veces con PBS con Ca<sup>2+</sup> para después bloquearlas con 1% (v/v) de ASB libre de IgGs (1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, USA) durante 40 minutos. Posteriormente, el protocolo de inmunofluorescencia continuó como se describió anteriormente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron de manera independiente por lo menos tres veces utilizando tres ratas diferentes por cada grupo.

### **9. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para Gas1**

El ensayo de ELISA se realizó de la manera descrita en la técnica de los artículos citados (143,144). En resumen, la extracción de proteínas se realizó utilizando amortiguador de RIPA, que contenía en mM: 40 Tris-HCl, 150 NaCl, 2 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.5 % desoxicolato de Na<sup>+</sup> y 0.2 % de dodecil sulfato de Na<sup>+</sup> (SDS). La proteína Gas1 se cuantificó por un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima utilizando el kit Duoset ELISA (R&D Systems, Mineápolis, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada ensayo se utilizó 50 µg de proteína total de cada muestra. Los datos se analizaron y normalizaron para obtener la cantidad de proteína Gas1 en picogramos por microgramo de proteína total.

### **10. Cuantificación de pixeles para Gas1, Claudina-2 y NCAM en la cápsula de Bowman**

Para cuantificar a Gas1, Claudina-2 y NCAM en la cápsula de Bowman, se realizó una segmentación por umbrales combinada con una segmentación manual y se aplicó un sistema de binarización a las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia de la manera descrita previamente (145,146). En resumen, primero el tamaño de las imágenes se homogeneizó a 354x355 pixeles y se aplicó una segmentación por umbral (entropía de Rényi) con un valor de umbral de 150 a 175. Posteriormente, se aplicó el sistema de binarización, reduciendo la composición de la imagen a colores blanco/negro y se realizó una segmentación manual de las imágenes manteniéndose únicamente el contorno glomerular (cápsula de Bowman) (**Figura 17**). El número de pixeles blancos y negros se cuantificó con el software ImageJ (Versión 1.50). Se analizaron de tres a seis glomérulos por grupo en cada experimento.

### **11. Cuantificación de células Ki67 y NCAM en la cápsula de Bowman**

La cuantificación de las células Ki67 y NCAM positivas en la cápsula de Bowman se realizó de la manera descrita en la técnica del artículo citado (147). En resumen, se utilizó una combinación de microscopía fluorescente y campo claro para

identificar a las células Ki67 y NCAM positivas. El número de glomérulos analizados fue de tres por cada grupo.

El conteo de células se realizó manualmente con el programa ImageJ. Debido a los cambios morfológicos glomerulares relacionados por la edad y el peso de los animales, se midió la longitud de la cápsula de Bowman (mm) de cada glomérulo analizado. Se utilizó el programa ImageJ para medir la longitud de la cápsula de Bowman. Finalmente, estas medidas se usaron como denominadores para el número total de células Ki67 y NCAM positivas a lo largo de la cápsula de Bowman.

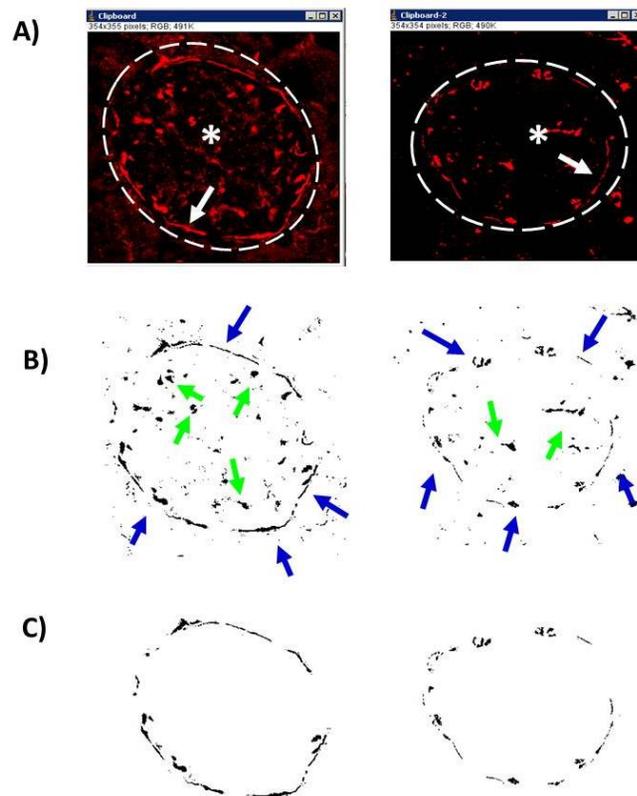
## **12. Cuantificación de las células principales, las células intercalares y las células intermedias en túbulos colectores aislados**

La composición del tipo celular en el túbulo colector se cuantificó de la manera descrita en la técnica del artículo citado (148). En resumen, se cuantificaron las células de tres túbulos colectores aislados manualmente por cada grupo experimental por rata. Las células que expresaron Gas1 y AQP2 se consideraron como células principales, aquellas células que únicamente expresaron V-ATPasa se consideraron como células intercalares y las células que expresaron Gas1 y V-ATPasa se consideraron como células intermedias. Las células con una expresión ambigua o sin tinción del marcador específico se excluyeron de la cuantificación. La cuantificación se evaluó usando el microscopio confocal y el programa ImageJ (versión 1.50)

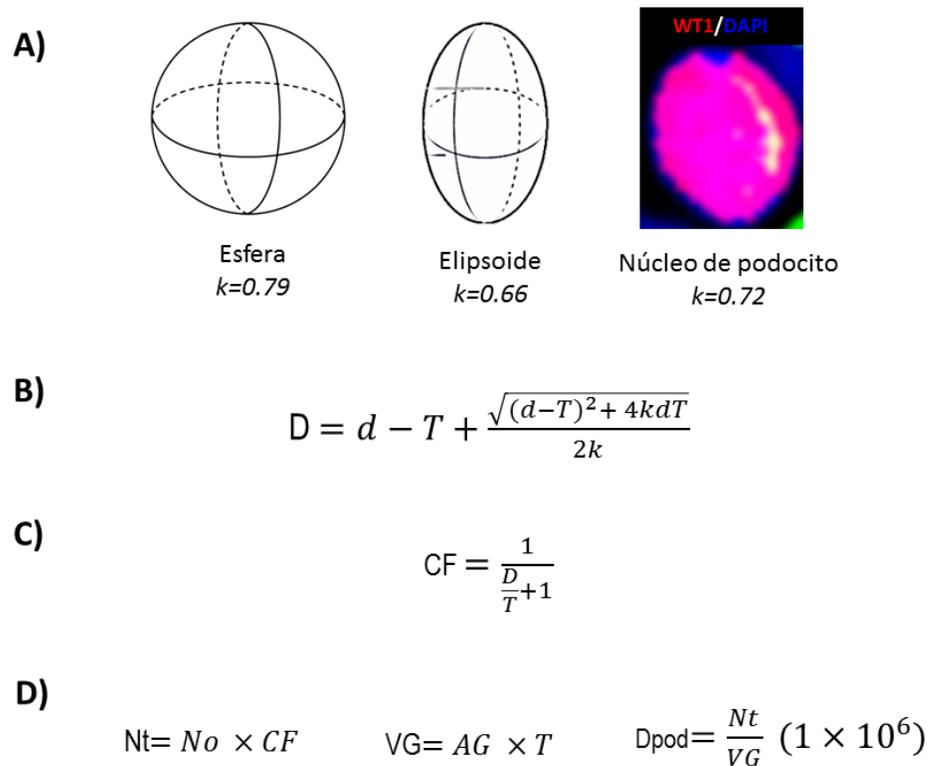
## **13. Densidad de podocitos en secciones histológicas**

La densidad de podocitos se realizó de la manera descrita en la técnica de los artículos citados (149,150). En resumen, se obtuvieron imágenes por inmunofluorescencia marcando específicamente el núcleo de los podocitos con el factor de transcripción del tumor de Wilms (WT1), seguido de un conteo manual de núcleos de podocitos WT1<sup>+</sup> en el glomérulo. Este conteo estimado de podocitos se corrigió por el factor de corrección (CF) para evitar una sobre estimación de la densidad aparente de podocitos, considerando el grosor (T) y la variación del tamaño/forma de los núcleos dada por diámetro promedio (D) de la estructura nuclear orientada aleatoriamente en una dimensión. Para obtener el CF fue necesario obtener el valor real

de D considerando a los núcleos como formas de esferoides prolatos u ovoides constantes ( $k= 0.72$ ). Se obtuvo el volumen glomerular a partir del área del glomérulo multiplicada por el grosor del corte de tejido sobre el cual se realizó la inmunofluorescencia. Por último, la densidad de podocitos se obtuvo a partir del conteo de podocitos corregido por el CF sobre el volumen glomerular (**Figura 18**). Los experimentos de la inmunofluorescencia se realizaron de manera independiente, por lo menos tres veces utilizando tres muestras diferentes por grupo.



**Figura 17.** Cuantificación de los pixeles de la cápsula de Bowman. **(A)** Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía fluorescente. Se observa la estructura de un glomérulo perfectamente delimitada por la cápsula de Bowman. En rojo, la expresión de Gas1 a nivel de la cápsula de Bowman y la zona intraglomerular. El lado izquierdo representa la condición control y el lado derecho, la condición diabética de dos semanas. Todas las imágenes se homogeneizaron a un tamaño de 354x355 pixeles. Las flechas blancas señalan la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman. **(B)** Posteriormente, se aplicó el sistema de binarización, reduciendo la composición de la imagen a colores blanco/negro. Expresión de Gas1 en negro. Flechas azules señalan la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman. Flechas verdes señalan la zona intraglomerular con expresión de Gas1. **(C)** Finalmente se realizó una segmentación de la imagen manteniendo únicamente la expresión de Gas1 (negro) en la cápsula de Bowman.



**Figura 18.** Densidad de los podocitos. Para obtener una estimación de la densidad de los podocitos, se realizó el conteo de núcleos de podocitos WT1<sup>+</sup>. De cada núcleo WT1<sup>+</sup> se obtuvo el diámetro aparente (d) mediante el programa ImageJ. Para obtener el valor del diámetro real de los núcleos (D) fue necesario considerar la forma y orientación del núcleo en una imagen de una sola dimensión. **(A)** La constante de la forma del núcleo de podocitos (k); se obtuvo al considerar una forma nuclear oscilante entre una esfera y una elipsoide, dando un valor intermedio de  $k=0.72$ . **(B)** Para obtener el valor real del diámetro (D), se aplicó la siguiente fórmula donde: (d) es el diámetro estimado de los núcleos, (T) el grosor de la imagen y (k) la constante de la forma nuclear. Una vez obtenido el valor real del diámetro de los núcleos, se obtuvo un factor de corrección (CF), con la finalidad de evitar una sobre estimación del número real de podocitos, mediante la siguiente fórmula **(C)** CF, es el factor de corrección, (D) el diámetro real del núcleo. **(D)** Para obtener el conteo de podocitos real (Nt) se multiplicó el número de núcleos de podocitos aparente (No) por el factor de corrección (CF). Para obtener el volumen del glomérulo (VG), se obtuvo el área del glomérulo (AG) por el programa ImageJ y se multiplicó por el grosor de la imagen (T). Se obtuvo la densidad de podocitos (Dpod) dividiendo Nt sobre VG y multiplicando el resultado por  $1 \times 10^6$ .

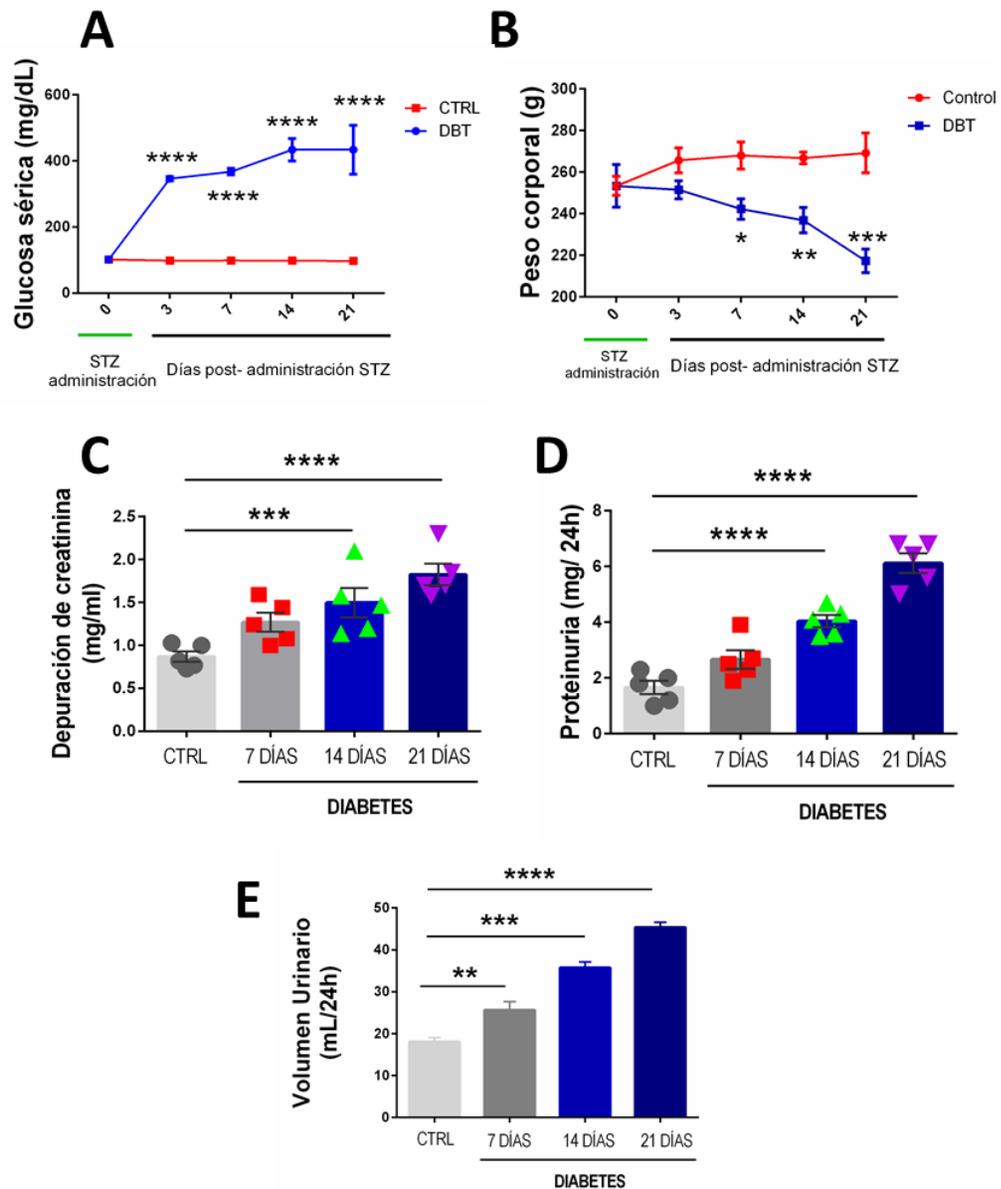
**14. Análisis estadístico de datos**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). Para la comparación de grupos múltiples se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Se utilizó la prueba *pos hoc* de Dunett y se consideró estadísticamente significativa a partir de un valor de  $p < 0.05$ .

## VII. Resultados

### 1. Modelo de diabetes experimental y daño renal

Para confirmar la diabetes experimental inducida por la administración de estreptozotocina (STZ) en ratas Wistar, se analizó el índice glucémico en los grupos con diabetes experimental al día 3, 7, 14 y 21 posterior a la administración de STZ (**Figura 19A**). A partir del día 3 y hasta el día 21 posterior a la administración de STZ, se observó un aumento del nivel sérico de la glucosa en los grupos con diabetes experimental (día 3,  $346.6 \pm 10.8$  mg/dL; día 7,  $367.8 \pm 9.9$  mg/dL; día 14,  $434.2 \pm 36$  mg/dL; día 21,  $434 \pm 74.3$  mg/dL) en comparación con el grupo control (día 3,  $95.4 \pm 10.8$  mg/dL; día 7,  $98 \pm 5.9$  mg/dL, día 14,  $84.8 \pm 9.8$  mg/dL, día 21,  $96.8 \pm 12.3$  mg/dL). También se monitoreó el peso corporal y el volumen urinario. Las ratas con diabetes experimental mostraron una disminución significativa del peso corporal a partir del día 3 posterior a la administración de STZ y hasta el día 21 (día 3,  $241.9 \pm 7.7$  g; día 7,  $234.1 \pm 8.8$  g; día 14,  $229.9 \pm 5.2$  g; día 21,  $217.1 \pm 5.7$  g) en comparación con las ratas control que mostraron un aumento progresivo del peso corporal (día 3,  $269.7 \pm 10.9$  g; día 7,  $271.6 \pm 10.5$  g; día 14,  $266.8 \pm 6.2$  g; día 21,  $276.2 \pm 12.3$  g) (**Figura 19B**). El volumen urinario aumentó significativamente en las ratas con diabetes experimental (día 7,  $25.6 \pm 4.5$  mL; día 14,  $35.6 \pm 3.03$  mL; día 21,  $45.3 \pm 2.7$  mL); en contraste en las ratas control el flujo urinario se mantuvo constante ( $18.08 \pm 2.2$  mL) (**Figura 19E**). Con estos hallazgos se confirmó la diabetes experimental, ya que las ratas presentaron hiperglucemia, pérdida de peso corporal y poliuria, las cuales son características clínicas y metabólicas similares a las que manifiesta un paciente diabético. Posteriormente, se evaluó la función renal mediante la medición de proteinuria y la depuración de creatinina (**Figura 19 C-D**), ambos parámetros importantes de la función glomerular. En las ratas con diabetes experimental la excreción urinaria de proteínas y la depuración de creatinina aumentaron progresivamente desde el día 7 hasta el día 21 con diabetes, con un aumento significativo en comparación con las ratas control desde el día 14 y hasta el día 21 con diabetes. Con base en estos hallazgos se confirmó que la diabetes indujo disfunción glomerular debido al aumento de la excreción urinaria de proteínas y al desarrollo de hiperfiltración, ambas características importantes durante las primeras etapas del daño renal.



**Figura 19. Parámetros fisiológicos y bioquímicos en las ratas diabéticas inducidas con STZ.** La inducción de la diabetes experimental se confirmó por (A) hiperglucemia, (B) pérdida de peso y (E) poliuria. También se evaluaron pruebas de función renal como (C) depuración de creatinina y (D) proteinuria. Ambas pruebas muestran el aumento de la filtración glomerular y el incremento de la excreción de proteínas, ambos indicadores de daño renal temprano en las ratas con diabetes experimental. DBT, diabetes. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunett. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 6$

## 2. Las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1

Para determinar si las células epiteliales parietales (CEP) de la cápsula de Bowman expresan Gas1, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y de la proteína específica de la unión estrecha de las CEP, claudina-2 (CLDN2), en ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días y en ratas control (**Figura 20**). Se encontró que Gas1 co-localiza con CLDN2, en la condición diabética y en los controles (**Figura 20 C-D**). La expresión de Gas1 en las células de la cápsula de Bowman es homogénea en las ratas control. En contraste, en las ratas diabéticas de 7 y 14 días, la expresión de Gas1 disminuyó gradualmente en las células de la cápsula de Bowman, siendo más notable a los 21 días de diabetes (**Figura 20A**) en comparación con el control. Por otro lado, la expresión de CLDN2 se observó homogénea y sin cambios, tanto en la condición control como en la diabetes (**Figura 20B**). Esto se confirmó con la semicuantificación de pixeles para Gas1 y CLDN2 (**Figura 20E**). Estos resultados sugieren que las células parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1 y la diabetes favorece su disminución.

## 3. La diabetes favorece la disminución de Gas1 e induce la expresión de los marcadores de células progenitoras en la cápsula de Bowman

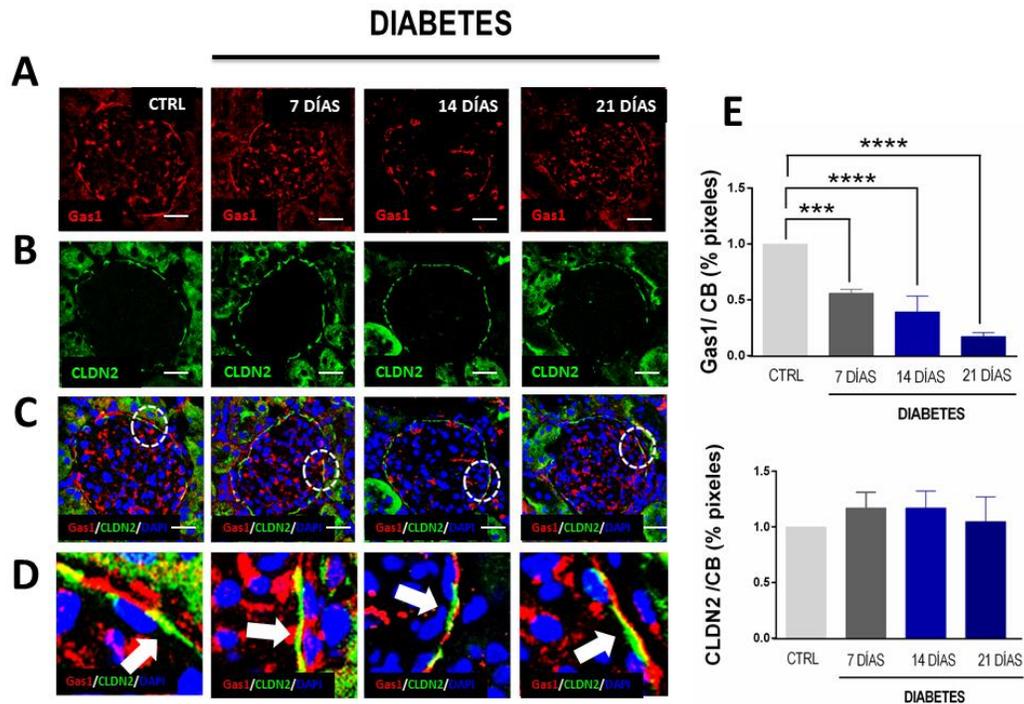
Recientemente, se confirmó la existencia de una subpoblación de células parietales denominadas células progenitoras parietales en la cápsula de Bowman con capacidad de autorrenovación y con un alto potencial de diferenciación a podocitos y a células tubulares (151). Para explorar si las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1, se evaluó la expresión de NCAM (marcador de células progenitoras renales) (108,152) y de Gas1 por inmunofluorescencia (**Figura 21**). La expresión de Gas1 es homogénea en la cápsula de Bowman en las ratas control y disminuyó gradualmente en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días como se describió previamente (**Figura 21A**). En contraste, la expresión de NCAM es intermitente en las células de la cápsula de Bowman en la condición control y aumenta gradualmente con respecto al tiempo en la diabetes, observándose una expresión más homogénea o regular en la cápsula de Bowman (**Figura 21B**). Esto se confirmó con la semicuantificación de pixeles para Gas1 y NCAM (**Figura 21D**). Gas1 co-localiza con

NCAM en la condición control confirmando que las células parietales progenitoras NCAM<sup>+</sup> expresan Gas1; sin embargo, en la condición diabética de 7, 14 y 21 días se observó una muy baja sobreposición de ambas proteínas, a consecuencia de la expresión inversa de Gas1 y NCAM en la diabetes (**Figura 22**). Con el fin de evaluar otros marcadores de células progenitoras renales de la cápsula de Bowman, la expresión de CD24 y SIX1/2 se analizó por western blot en una fracción enriquecida de glomérulos (que intrínsecamente poseen células parietales de la cápsula de Bowman) (**Figura 21E-F**). Se encontró la expresión de CD24 y SIX1/2 en las ratas control, indicando la presencia de células progenitoras en condiciones normales. En las ratas diabéticas de 14 y 21 días, se observó el aumento de la expresión de CD24 en comparación con los controles. También se observó que la expresión de SIX1/2 aumentó significativamente a partir de los 7 días de diabetes en comparación con los controles. Estos hallazgos sugieren que la diabetes promueve la disminución de la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman y el aumento de marcadores de células progenitoras como NCAM, CD24 y SIX1/2; favoreciendo así la activación y/o proliferación de las células parietales progenitoras.

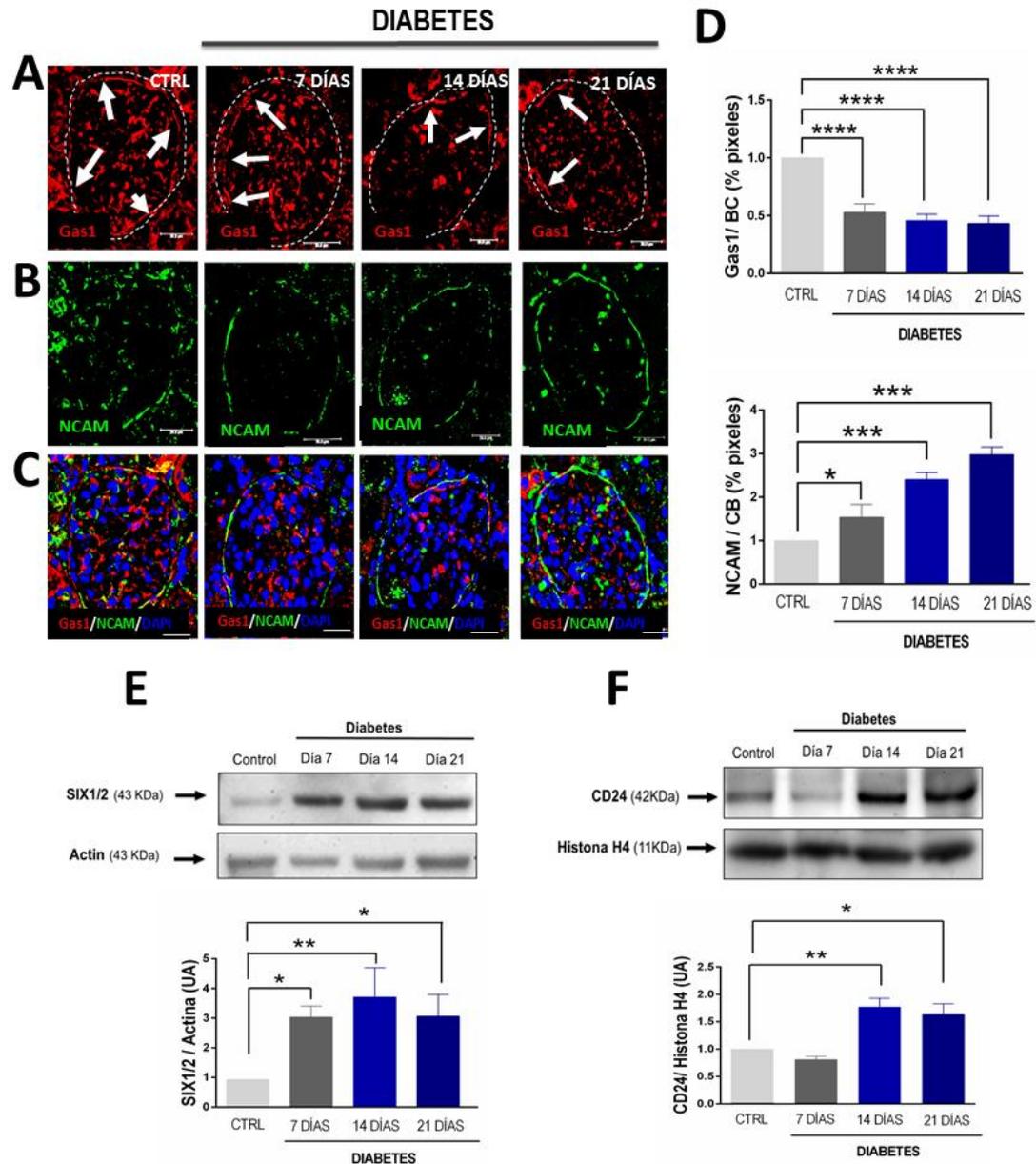
#### **4. La diabetes favorece el aumento de la expresión de PAX2 en la cápsula de Bowman**

Las células progenitoras renales llevan a cabo un proceso de reprogramación adquiriendo marcadores mesenquimales embrionarios cuando se activan para posteriormente diferenciarse a determinado tipo celular (151). Para determinar si la disminución de Gas1 en la diabetes favorece un aumento de los marcadores mesenquimales, se analizó la expresión PAX2 en la cápsula de Bowman por inmunofluorescencia y por western blot (**Figura 23**). PAX2 es un factor de transcripción que expresan las células precursoras de las células parietales durante la nefrogénesis (153). Se observó tanto por inmunofluorescencia como por western blot, que en la condición control hay una fina expresión de PAX2. Durante los primeros 7 días de diabetes, la expresión de PAX2 disminuye significativamente en comparación con el control, pero en el día 14 y 21 de diabetes, se observó una recuperación y sobreexpresión de PAX2 con respecto al control (**Figura 23A, C**). También se realizó

la cuantificación de las células PAX2<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman (**Figura 23B**) y se encontró la misma tendencia en la expresión de PAX2 observada previamente por western blot. Estos resultados sugieren que la diabetes promueve la disminución de la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman e induce la activación y reprogramación en las células progenitoras parietales.

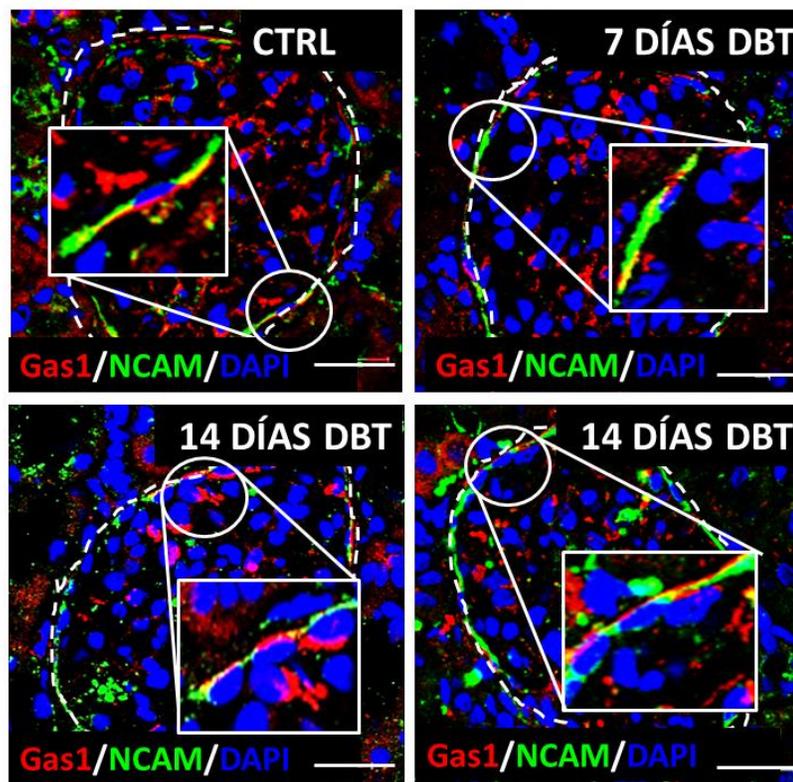


**Figura 20. Las células parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1.** Se analizó la expresión de Gas1 y CLDN2 por inmunofluorescencia. **(A)** La expresión de Gas1 es homogénea en la cápsula de Bowman en las ratas control. En contraste, en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días, se observa una disminución gradual en la expresión de Gas1. La disminución de Gas1 en la CB es más notable en las ratas diabéticas de 21 días. **(B)** Para identificar a las células parietales de la cápsula de Bowman se utilizó a la proteína de la unión estrecha CLDN2. La expresión de CLDN2 es homogénea en la cápsula de Bowman y sin alteraciones en su expresión entre las ratas control y diabéticas. **(C-D)** Gas1 y CLDN2 co-localizan (flechas blancas y zonas amarillas), describiendo por primera vez la expresión de Gas1 en las células parietales de la cápsula de Bowman. **(E)** Análisis semicuantitativo de la expresión de Gas1 y CLDN2 en las células de la CB en las ratas control y diabéticas. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), CLDN2 (verde), DAPI (azul). Círculos blancos indican acercamientos de la cápsula de Bowman. Flechas blancas indican co-localización de Gas1 y CLDN2 (zonas amarillas). Escala = 40  $\mu$ m. CB, cápsula de Bowman. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunnett \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 21.** La diabetes favorece la disminución de Gas1 en la cápsula de Bowman y el aumento de marcadores de las células progenitoras (NCAM, CD24, SIX1/2). Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y NCAM. (A) Las células parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1 (rojo) homogéneamente en las ratas control pero en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días, la expresión de Gas1 disminuye gradualmente. Por otro lado, (B) las células de la cápsula de Bowman expresan de manera intermitente NCAM (verde) en la cápsula de Bowman en las ratas control. En contraste, en la condición diabética de 7, 14 y 21 días, la expresión de NCAM en las células de la cápsula de Bowman aumenta gradualmente y se observa más homogénea en la cápsula de Bowman. (C) Expresión de Gas1 y NCAM en la cápsula de Bowman. (D) Análisis semicuantitativo de la expresión de Gas1 y NCAM en las células de la cápsula de Bowman en las ratas control y diabéticas. (E-F) También la expresión de otros marcadores de las células progenitoras como CD24 y SIX1/2 se analizaron por western blot en un enriquecido glomerular de ratas control y diabéticas, observando un aumento significativo de estos

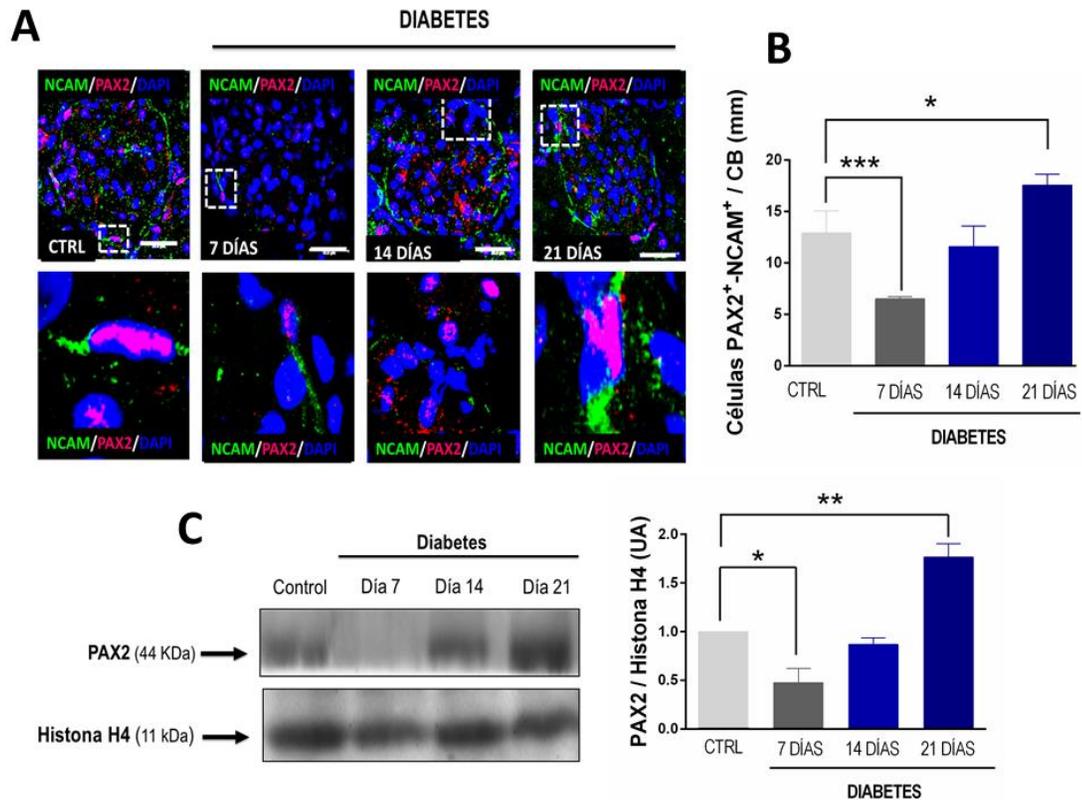
marcadores en las ratas diabéticas. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), NCAM (verde), DAPI (azul). Flechas blancas indican la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman. Línea blanca y punteada delimita la cápsula de Bowman en el glomérulo. Escala = 50  $\mu$ m. CB, cápsula de Bowman. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar (DS). El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina e histona H4 como control de carga. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunett. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).



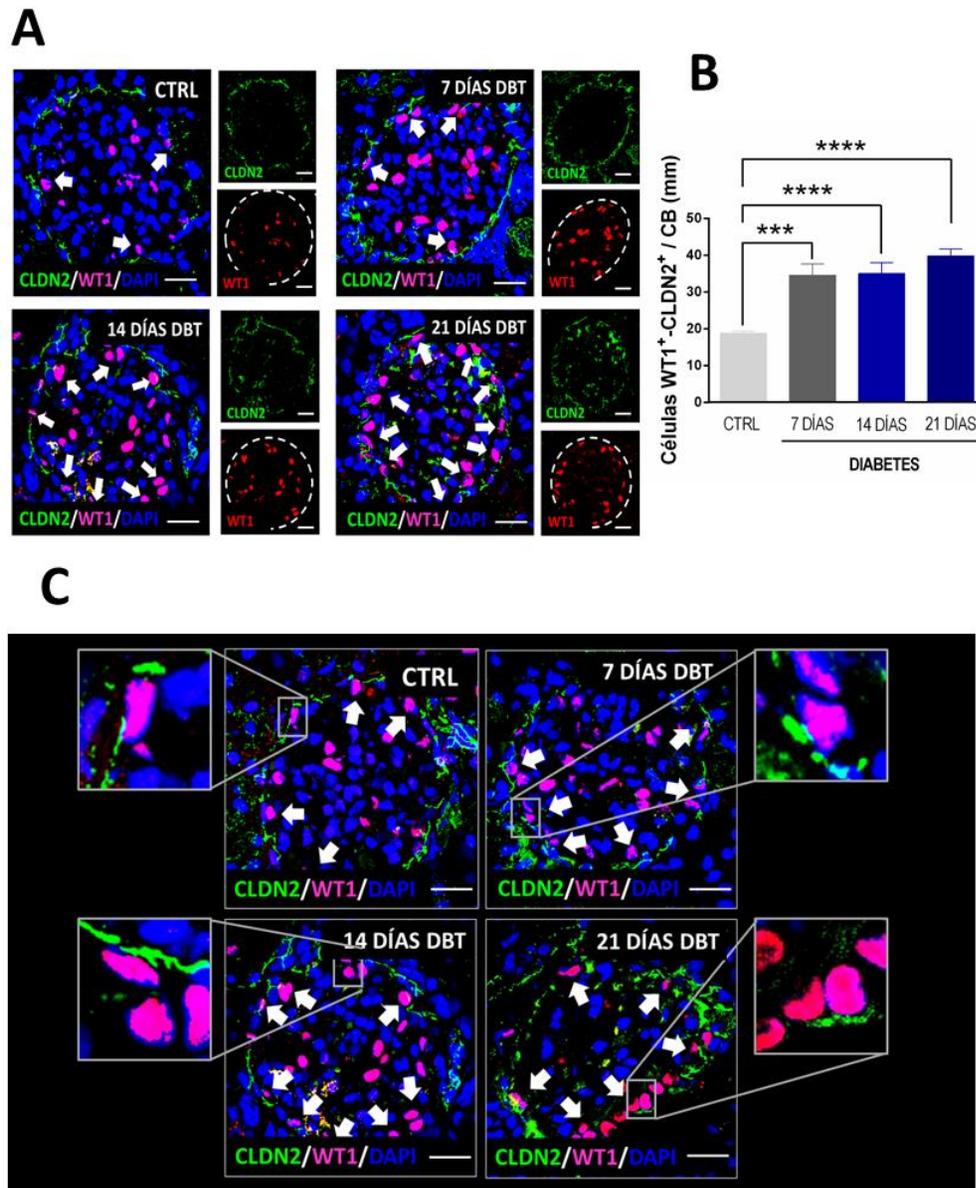
**Figura 22. Las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman expresan Gas1.** Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y NCAM. En los acercamientos (recuadros) se observa la co-localización de Gas1 y NCAM en la cápsula de Bowman de ratas control (zonas amarillas). En contraste, en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días se observó una muy baja sobreposición de ambas proteínas, a consecuencia de la expresión inversa de Gas1 y NCAM en la diabetes. En la inmunofluorescencia: Gas1 (rojo), NCAM (verde), DAPI (azul). DBT, diabetes. Círculos blancos indican acercamientos de la cápsula de Bowman que muestran la co-localización de Gas1 y NCAM (zonas amarillas). Línea blanca y punteada delimita la cápsula de Bowman en el glomérulo. Escala = 40  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

## 5. La diabetes aumenta el número de células WT1<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman

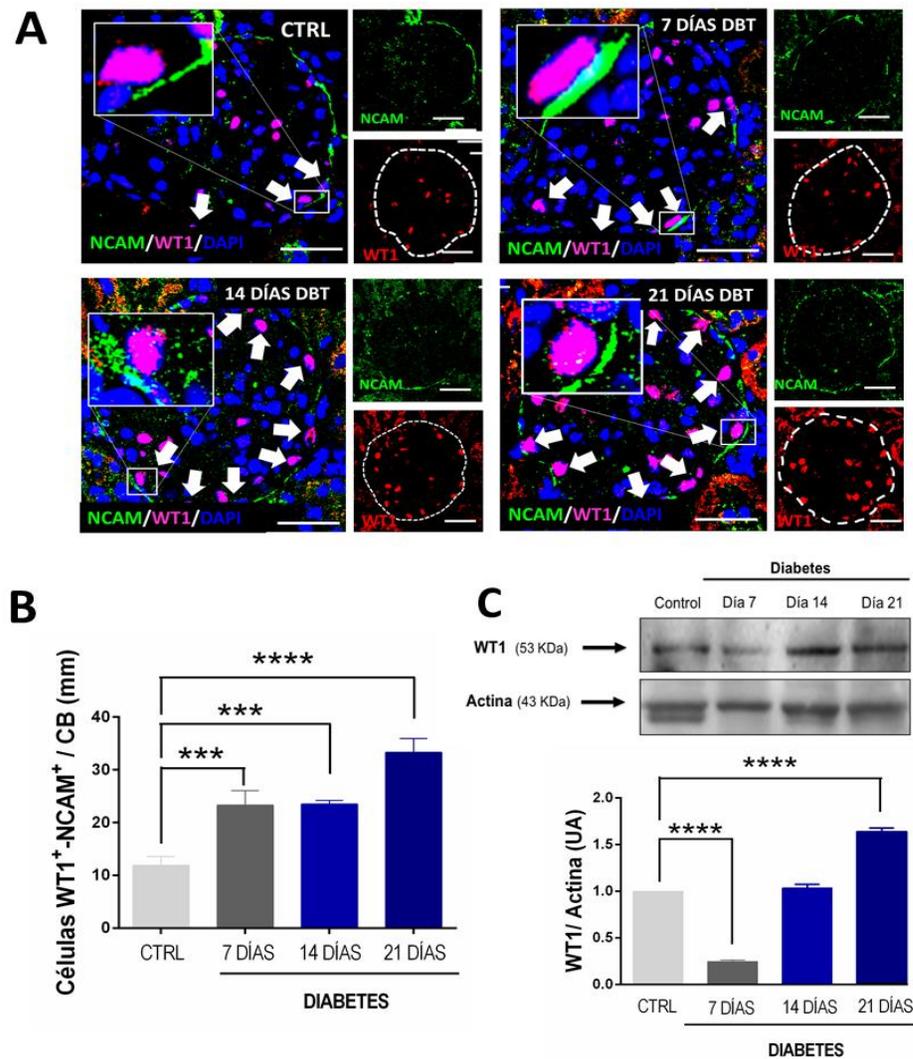
Para explorar si las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman que se han activado en la diabetes se diferencian a podocitos, se analizó la expresión de la proteína específica de podocitos WT1 (154) en la cápsula de Bowman (**Figura 24**). Para identificar específicamente la expresión de WT1 en la cápsula de Bowman, primero se analizó por inmunofluorescencia la expresión de WT1 y CLDN2 (marcador usado para delimitar la cápsula de Bowman) (26). En las ratas control, se encontraron pocas células WT1<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup>. En contraste, en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días, el número de células WT1<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup> aumentó significativamente en comparación con el control. Estos resultados indican que las células de la cápsula de Bowman expresan el marcador específico de podocitos WT1. Con el objetivo de dilucidar si las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman expresan el marcador de podocitos WT1, se evaluó la expresión de WT1 y del marcador de célula progenitora renal NCAM por inmunofluorescencia (**Figura 25 A-B**). Se observaron escasas células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en las ratas control, sin embargo, en la condición diabética de 7, 14 y 21 días, el número de células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> aumentaron significativamente en comparación con el control. Interesantemente, no se identificaron células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>-</sup>; demostrando que las células que expresan WT1 en la cápsula de Bowman son las células progenitoras parietales NCAM<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que la diabetes promueve la activación y diferenciación de las células progenitoras parietales a podocitos en la cápsula de Bowman, y es posible que la proteína Gas1 tenga un papel importante en estos procesos.



**Figura 23. La diabetes favorece la expresión de PAX2 en las células de la cápsula de Bowman. (A)** Análisis por inmunofluorescencia del factor de transcripción PAX2. **(B)** Cuantificación de células PAX2<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en ratas control y diabéticas. Se observó que en las ratas control hay  $12.9 \pm 2.14$  células PAX2<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup>. En contraste, durante los primeros 7 días de diabetes, el número de células PAX2<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> disminuyó significativamente a  $6.5 \pm 0.207$ . En el día 14 y 21 de diabetes, el número de células se restableció y aumentó de  $11.6 \pm 1.99$  a  $18.5 \pm 1.05$  células PAX2<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup>. **(C)** Análisis por western blot de la expresión de PAX2 en un enriquecido glomerular. En la inmunofluorescencia PAX2 (rojo), NCAM (verde), DAPI (azul). Recuadros blancos indican acercamientos de células con expresión nuclear PAX2 (rosa) en la cápsula de Bowman. Escala = 50  $\mu$ m. CB, cápsula de Bowman. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunnett. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con histona H4 como control de carga. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 24. La diabetes favorece la expresión de WT1 en las células de la cápsula de Bowman. (A)** Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de WT1 (marcador específico de podocitos). Se utilizó CLDN2 para identificar a las células de la cápsula de Bowman. En las ratas control observamos escasas células WT1<sup>+</sup> (rosa) en la cápsula de Bowman. En contraste, en las ratas de 7, 14 y 21 días con diabetes, el número de células WT1<sup>+</sup> (flechas blancas) aumentó. **(B)** Cuantificación de células WT1<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en ratas control y diabéticas. **(C)** Inmunofluorescencia de WT1 y CLDN2. Se muestran acercamientos de células WT1<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman. En la inmunofluorescencia WT1 (rojo), CLDN2 (verde), DAPI (azul). Flechas blancas muestran células WT1<sup>+</sup> (rosa) en la cápsula de Bowman. Recuadros blancos indican acercamientos de células WT1<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup>. DBT, diabetes. CB, cápsula de Bowman. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunnett. \*\*\* $p$ <0.001 y \*\*\*\* $p$ <0.0001. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 25. Las células progenitoras parietales NCAM<sup>+</sup> expresan WT1 en las etapas tempranas de la diabetes.** Con la finalidad de evaluar si las células que expresan el marcador específico de podocitos WT1 en la cápsula de Bowman son células progenitoras renales, se analizó por (A) inmunofluorescencia la expresión de WT1 y del marcador de células progenitoras renales NCAM. Se observaron escasas células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en las ratas control. En contraste, en las ratas de 7, 14 y 21 días de diabetes, el número de células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> aumentó. Estos resultados sugieren que las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman expresan WT1. (B) Cuantificación de células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en ratas control y diabéticas. (C) Análisis por western blot de WT1 en un enriquecido glomerular. En la inmunofluorescencia WT1 (rojo), NCAM (verde), DAPI (azul). Flechas blancas indican células WT1<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman. Recuadros blancos indican acercamientos. Línea blanca y punteada delimita la cápsula de Bowman en el glomérulo. DBT, diabetes. CB, cápsula de Bowman. Escala = 50  $\mu$ m. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina como control de carga. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunnett. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).

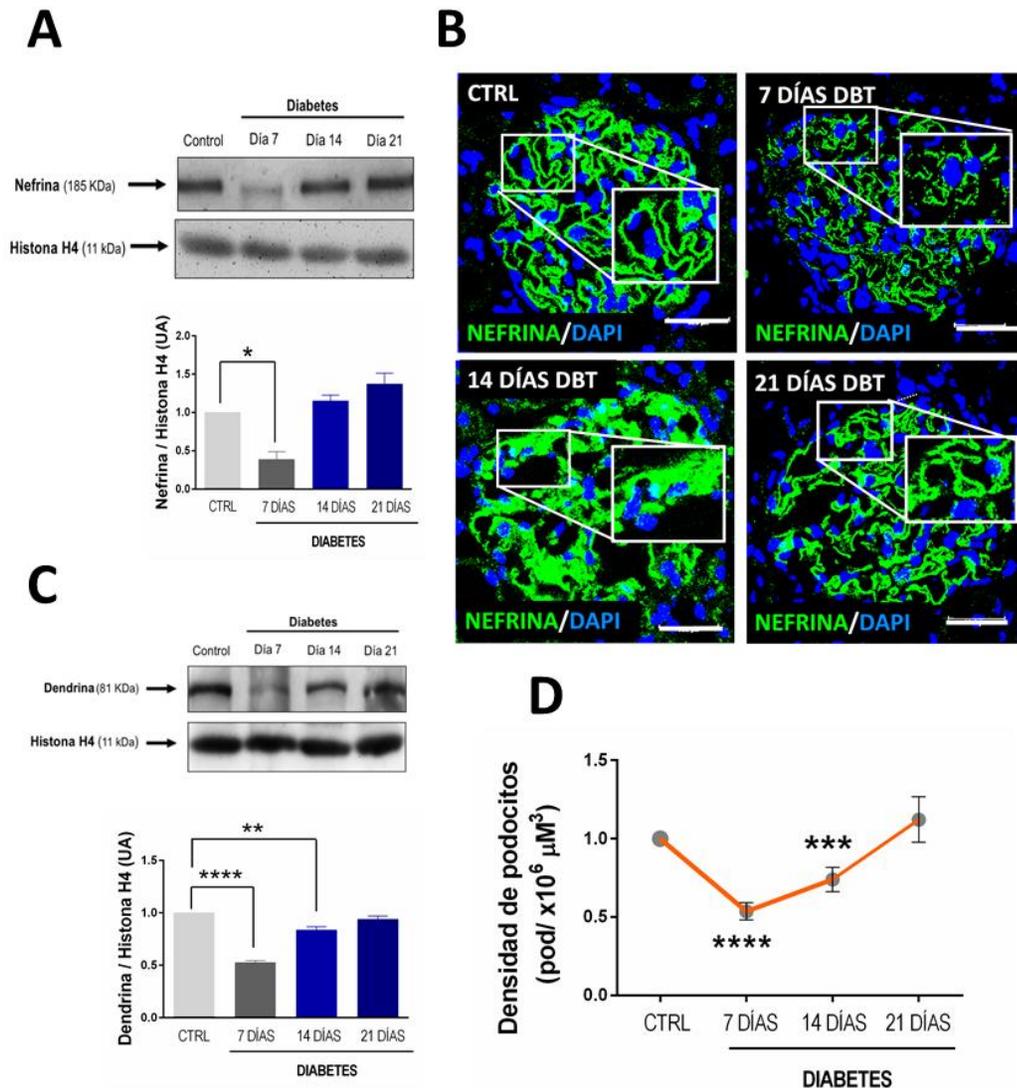
## 6. Expresión de nefrina y dendrina durante la etapa temprana de la nefropatía diabética

Para conocer las condiciones de los podocitos durante los primeros días de diabetes, se analizó la expresión de la nefrina y la dendrina (proteínas específicas de los podocitos) (12,14) por inmunofluorescencia e inmunoblot. Se encontró que la diabetes disminuyó la expresión de nefrina durante los primeros 7 días y se restableció a partir de los 14 días de diabetes (**Figura 26 A-B**). De manera similar, se observó mediante western blot, que la expresión de la dendrina también disminuyó significativamente en comparación del control a los 7 días de diabetes; pero en el día 14, la expresión de la dendrina aumentó gradualmente hasta restablecerse por completo a los 21 días de diabetes (**Figura 26C**). Los resultados anteriormente descritos podrían indicar que durante los primeros 7 días de diabetes existe una pérdida importante de podocitos, ya que se observó una disminución significativa de las proteínas podocitarias como WT1 (**Figura 25C**), nefrina y dendrina. Paradójicamente, la expresión de estas proteínas se restableció gradualmente durante los 14 y 21 días de diabetes, insinuando la recuperación de podocitos. Como se describió anteriormente, los podocitos poseen una nula tasa de proliferación y regeneración; es posible que la recuperación de podocitos en la diabetes se asocie fuertemente a la diferenciación de células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman.

Con el objetivo de confirmar la pérdida y posible recuperación de podocitos; se calculó la densidad podocitaria por glomérulo en ratas diabéticas y controles (**Figura 26D**). Los resultados mostraron que en las ratas control, la densidad de los podocitos fue de  $1 \times 10^6$  podocitos/ $\mu\text{m}^3$ . En contraste, en las ratas con 7 días de diabetes, se observó una disminución significativa del 46.2% de la densidad podocitaria en comparación con las ratas control, mostrando una densidad estimada de  $0.537 \times 10^6$  podocitos/ $\mu\text{m}^3$ . En las ratas con 14 días de diabetes la densidad fue de  $0.740 \times 10^6$  podocitos/ $\mu\text{m}^3$ , mostrando una disminución significativa de podocitos en comparación con las ratas control. Sin embargo, en comparación con las ratas de 7 días con diabetes, se observó un aumento de la densidad de podocitos del 20.3%. Notablemente, la densidad de podocitos en las ratas con 21 días de diabetes se restableció por completo, mostrando

valores similares a los controles. La densidad de podocitos en este grupo experimental fue de  $1.122 \times 10^6$  podocitos/ $\mu\text{m}^3$ , sin diferencias significativas con la densidad de podocitos del grupo control pero con un sutil incremento del 12.22% de podocitos por volumen glomerular. Estos resultados confirman que en la condición diabética de 7 días existe una pérdida importante del número podocitos, subsecuente a un aumento gradual del número de podocitos a los 14 días de diabetes y a un evidente restablecimiento del número de podocitos en la condición diabética de 21 días. Los resultados anteriormente descritos sugieren que en las etapas tempranas de la nefropatía diabética existe un mecanismo de regeneración de podocitos y es posible que las células progenitoras parietales Gas1<sup>+</sup> de la cápsula de Bowman estén involucradas.

Con base en los resultados anteriormente descritos, se propone que la diabetes favorece la disminución de la expresión de la proteína Gas1 en las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman, induciendo que las células progenitoras parietales, que en condiciones normales se encuentran en un estado quiescente, inicien sus procesos de activación y reprogramación para poder diferenciarse a podocitos y compensar así la pérdida significativa de podocitos que se observó durante los primeros 7 días de diabetes, como un mecanismo de regeneración temprano. Esto sugiere que la proteína Gas1 mantiene en un estado inactivo a las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman en condiciones normales; pero en hiperglucemia, la disminución de la expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman podría ser considerada como una señal de instrucción celular para que las células progenitoras parietales se activen y elijan un linaje celular específico de diferenciación, siendo su destino final la diferenciación a podocitos.



**Figura 26. Expresión de nefrina y dendrina en las etapas tempranas de la diabetes. (A-B)** La expresión de la nefrina se analizó por inmunofluorescencia y western blot. Los resultados en ambas técnicas muestran una disminución significativa en la expresión de nefrina en las ratas con 7 días de diabetes. En los grupos de ratas diabéticas de 14 y 21 días, la expresión de la nefrina se recuperó en comparación con las ratas diabéticas de 7 días pero sin ningún cambio en comparación con las ratas control. **(C)** Análisis por western blot de la expresión de la dendrina. Observamos un patrón de expresión muy similar a la nefrina. La expresión de la dendrina disminuye significativamente en las ratas diabéticas de 7 días y comienza a aumentar en las ratas diabéticas de 14 días, restableciéndose por completo la expresión de la dendrina en las ratas diabéticas de 21 días. **(D)** Estimación de la densidad de podocitos. En la inmunofluorescencia nefrina (verde) y DAPI (azul). Recuadros blancos muestran acercamientos de podocitos (nefrina<sup>+</sup>) en la zona visceral del glomérulo. DBT, diabetes. Pod, podocitos. Escala = 50 μm. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con histona H4 como control de carga. Se muestra la media ± desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunnett. \**p*<0.05, \*\**p*< 0.01 y \*\*\*\**p*<0.0001. Se muestra un experimento representativo (n=3).

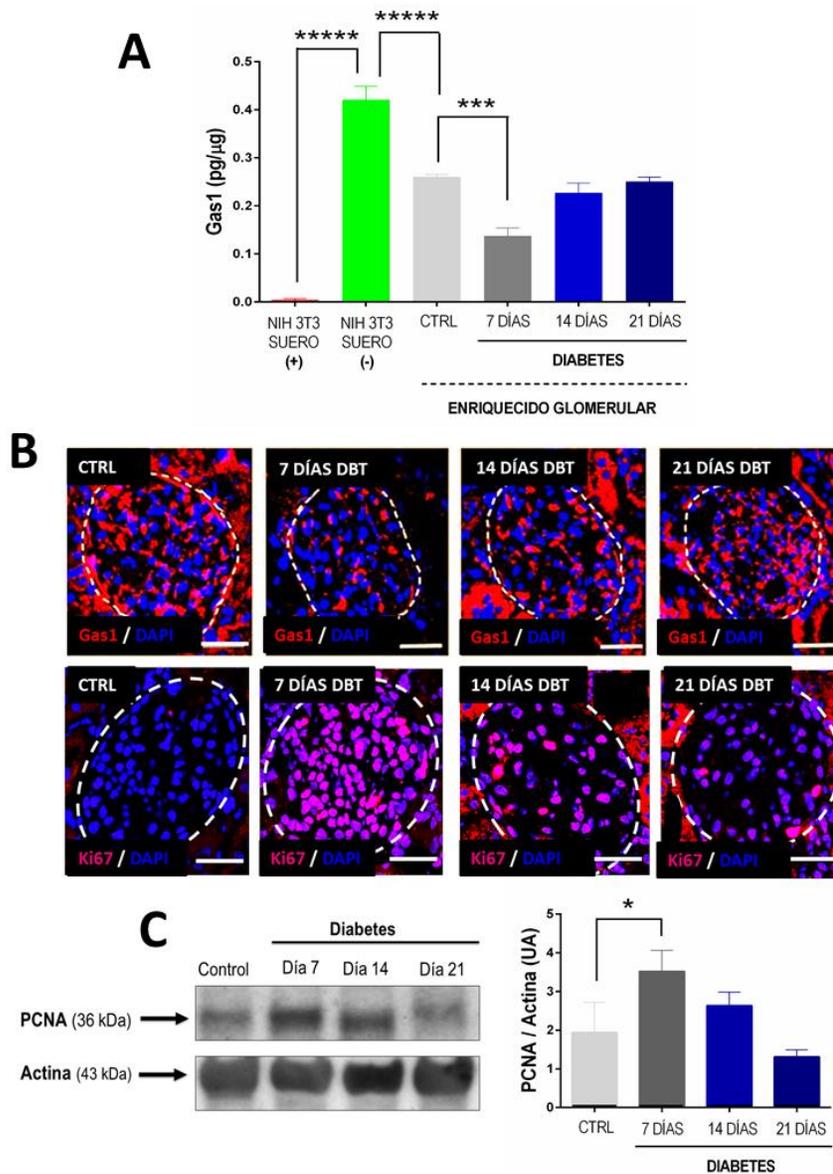
## 7. La diabetes favorece la proliferación de células parietales de la cápsula de Bowman

Estudios previos han descrito la función de Gas1 en el arresto celular en las células del sistema nervioso (155). En este trabajo, se realizó un ensayo por ELISA para Gas1 y el análisis por inmunoblot del antígeno nuclear de las células en proliferación (PCNA), ambos en enriquecidos glomerulares de ratas control y diabéticas. Se encontró que la concentración de Gas1 en las células glomerulares disminuyó significativamente a los 7 días de diabetes ( $0.136 \text{ pg}/\mu\text{g} \pm 0.0305$ ) en comparación con el control ( $0.260 \text{ pg}/\mu\text{g} \pm 0.01$ ). Sin embargo, a los días 14 y 21 de diabetes se restableció la concentración de Gas1 ( $0.226 \text{ pg}/\mu\text{g} \pm 0.020$  y  $0.25 \text{ pg}/\mu\text{g} \pm 0.01$ ) sin existir diferencias significativas con la concentración de la condición control (**Figura 27A**). En el análisis por western blot de PCNA, se observó que a los 7 días de diabetes, cuando la concentración de Gas1 disminuye, la expresión de PCNA aumenta significativamente en comparación con el control. A los 14 y 21 días de diabetes, cuando la expresión de Gas1 se restableció, se observó que la expresión de PCNA disminuyó en comparación con el día 7 de diabetes (**Figura 27C**). También se analizó la expresión de Gas1 y Ki67 (marcador de proliferación celular) por inmunofluorescencia en la estructura glomerular (**Figura 27B**), donde se observó el mismo patrón de expresión antes descrito, en la condición control donde existe una expresión homogénea de Gas1, no se observan células glomerulares proliferativas Ki67<sup>+</sup>. En contraste a los 7 días de diabetes, donde la expresión de Gas1 disminuye, se observó notablemente un aumento de células Ki67<sup>+</sup>. En los días 14 y 21 de diabetes, hay un restablecimiento gradual de la expresión de Gas1 en el glomérulo y se observa una disminución progresiva de las células Ki67<sup>+</sup>. Estos hallazgos muestran que existe una expresión inversa o diferencial entre Gas1 y los marcadores de proliferación PCNA y Ki67, sugiriendo que Gas1 podría tener un papel sobre la proliferación de células glomerulares durante la diabetes.

Para explorar si la diabetes favorece la proliferación de las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman, se analizó por inmunofluorescencia la expresión del marcador de proliferación celular, Ki67 y CLDN2 (utilizado para delimitar la

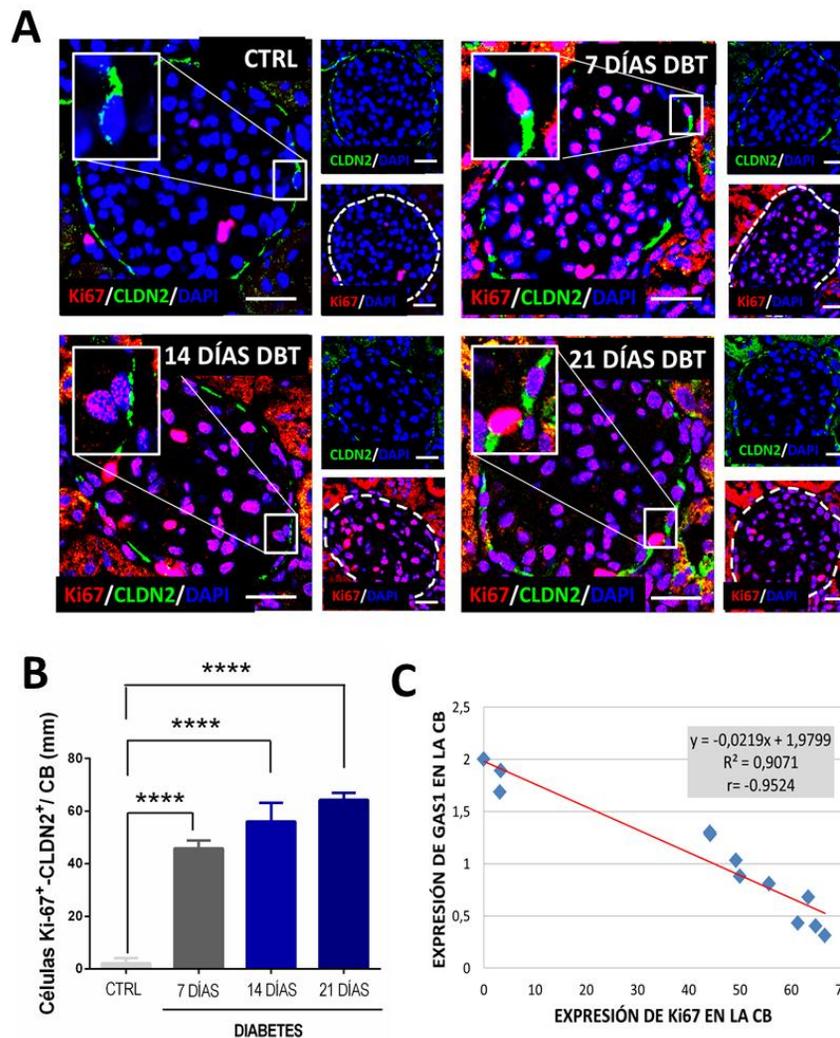
cápsula de Bowman) (**Figura 28**). Se observó que en las ratas control no hay células Ki67<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup>. En contraste, a los 7, 14 y 21 días de diabetes, el número de células Ki67<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup> aumentó significativamente en comparación con el control. Estos resultados indican que la diabetes favorece la proliferación de las células de la cápsula de Bowman. Para explorar si la diabetes también induce la proliferación de las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Ki67 y del marcador de las células progenitoras renales NCAM (**Figura 29A**). Se encontró que en la condición control hay escasas células NCAM<sup>+</sup>, pero ninguna Ki67<sup>+</sup>. Durante los días 7, 14 y 21 de diabetes, el número de células NCAM<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> aumentó significativamente en comparación con el control, sugiriendo que la diabetes también induce la proliferación de las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman. Esto se confirmó con la cuantificación de células NCAM<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman (**Figura 29B**).

Con el objetivo de conocer si la disminución de la expresión de Gas1 en la diabetes guarda una relación con la proliferación de las células de la cápsula de Bowman, se realizó un coeficiente de correlación de Pearson de la expresión de Gas1 y el número de células epiteliales parietales y parietales progenitoras en proliferación (Ki67<sup>+</sup>) en la cápsula de Bowman. Tanto en las células parietales (CLDN2<sup>+</sup>) como en la subpoblación de células progenitoras parietales (NCAM<sup>+</sup>) de la cápsula de Bowman, se encontró un coeficiente de correlación de -0.9524 y -0.9584, respectivamente, indicando una relación inversa en proporción constante entre la expresión de Gas1 y la proliferación celular en la cápsula de Bowman (**Figura 28C y 29C**). Con base en los resultados antes descritos se sugiere que la proteína Gas1 podría tener un papel importante como modulador endógeno de la proliferación de células parietales de la cápsula de Bowman.



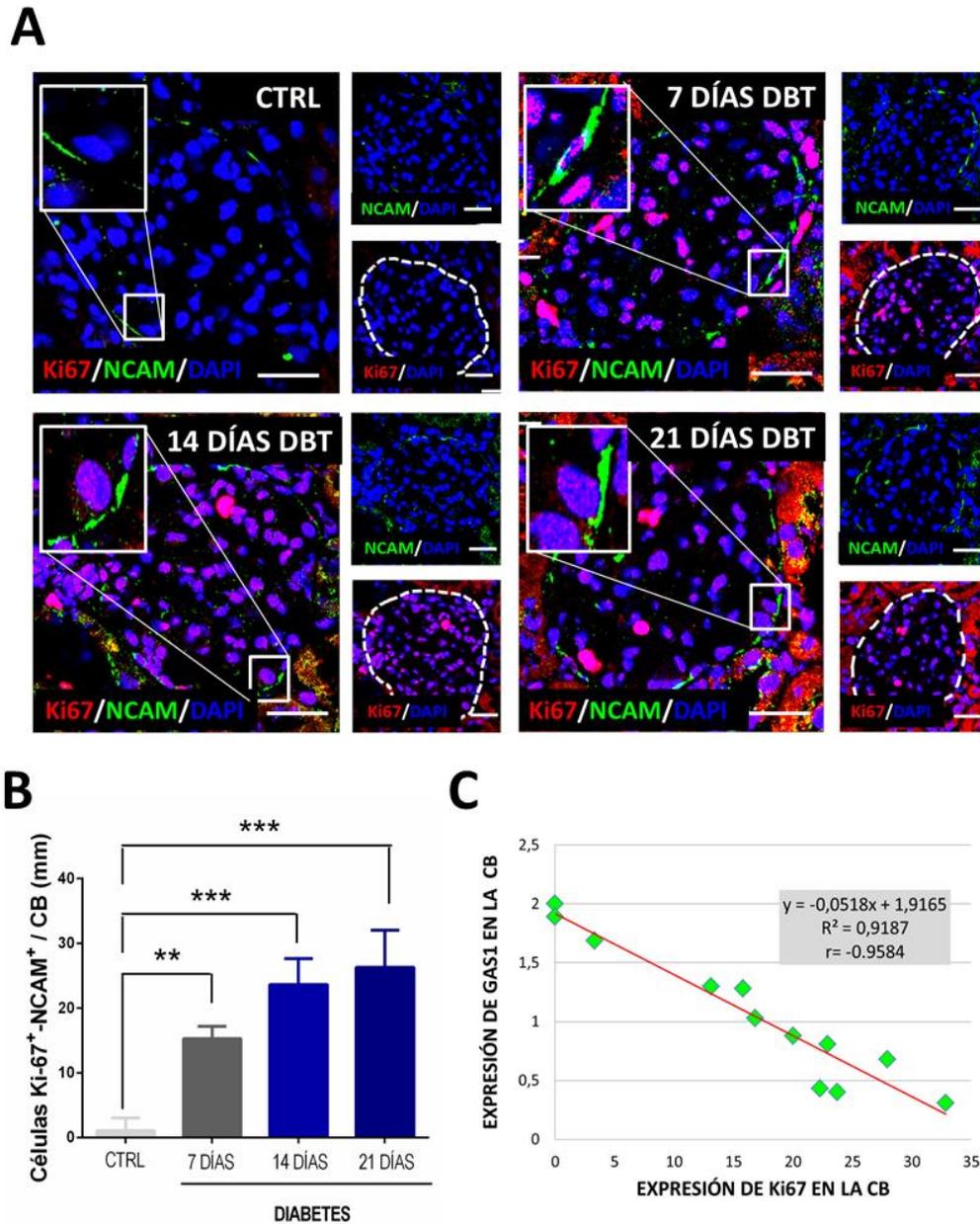
**Figura 27. La proliferación de células glomerulares y la expresión de Gas1 en las etapas tempranas de la diabetes.** (A) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de la proteína Gas1 en un enriquecido glomerular. (B) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Gas1 y el factor de proliferación celular Ki67. En el panel superior se observa la expresión de Gas1 (rojo) en el glomérulo. En la condición control se observa una fuerte expresión de Gas1 en la zona visceral. En contraste, en las ratas con 7 días de diabetes la expresión de Gas1 disminuyó notablemente en ésta zona, pero en las ratas de 14 y 21 días de diabetes se observó un aumento gradual de la expresión de Gas1 en la zona visceral o interna del glomérulo. En el panel inferior se observa la expresión nuclear de Ki67 (rosa) en el glomérulo. En la condición control no se observaron células Ki67<sup>+</sup>. En contraste, en las ratas diabéticas de 7 días se observaron abundantes células Ki67<sup>+</sup> en la zona visceral glomerular. En las ratas diabéticas de 14 y 21 días, disminuyó el número de células Ki67<sup>+</sup>. De manera general, se observó una expresión inversa entre Gas1 y Ki67 en las células glomerulares. (C) Western blot de PCNA en un enriquecido glomerular. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), Ki67 (rosa) y DAPI (azul). Líneas blancas y

punteadas demarcan glomérulos. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Para el análisis por ELISA se utilizó como control positivo células NIH 3T3 con medio sin suero y como control negativo células NIH-3T3 con suero. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina como control de carga. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunett. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 28. La diabetes favorece la proliferación de las células parietales de la cápsula de Bowman.**

(A) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Ki67 y CLDN2 en las células de la cápsula de Bowman. (B) Cuantificación de células Ki67<sup>+</sup>/CLDN2<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en ratas control y diabéticas. (C) Coeficiente de correlación de Pearson de la expresión de Gas1 y Ki67 en la cápsula de Bowman. En la inmunofluorescencia Ki67 (rojo), CLDN2 (verde), DAPI (azul). Recuadros blancos muestran acercamientos de células Ki67<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman. DBT, diabetes. CB, cápsula de Bowman. Líneas blancas y punteadas demarcan glomérulos. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunett. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).

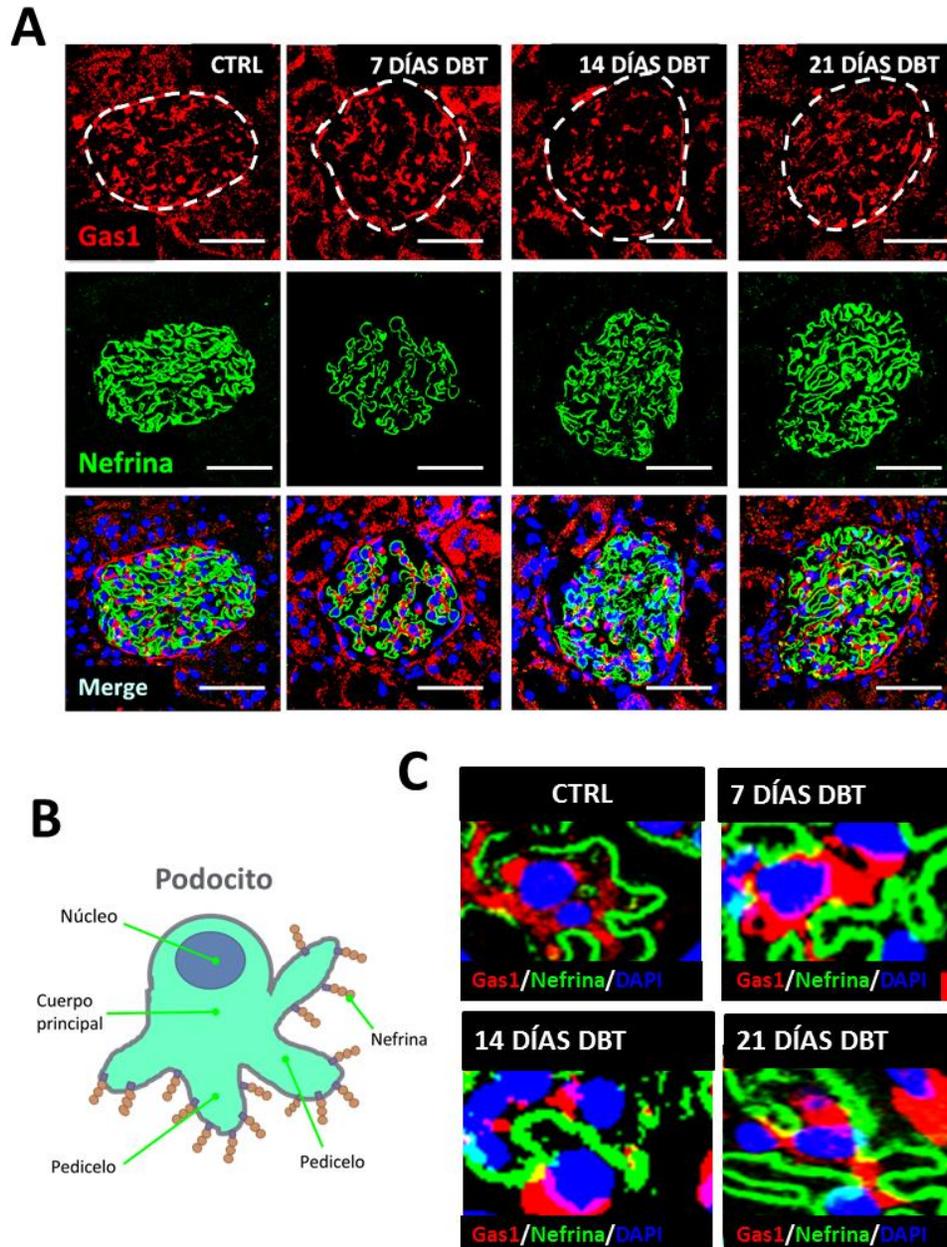


**Figura 29. La diabetes favorece la proliferación de las células progenitoras parietales NCAM<sup>+</sup> de la cápsula de Bowman.** (A) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Ki67 y NCAM en las células de la cápsula de Bowman. (B) Cuantificación de células Ki67<sup>+</sup>/NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en ratas control y diabéticas. (C) Coeficiente de correlación de Pearson de la expresión de Gas1 y la expresión de Ki67 en células NCAM<sup>+</sup> de la cápsula de Bowman. En la inmunofluorescencia Ki67 (rojo), NCAM (verde), DAPI (azul). Recuadros blancos muestran acercamientos de células Ki67<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman. DBT, diabetes. CB, cápsula de Bowman. Líneas blancas y punteadas demarcan glomerulos. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunett. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).

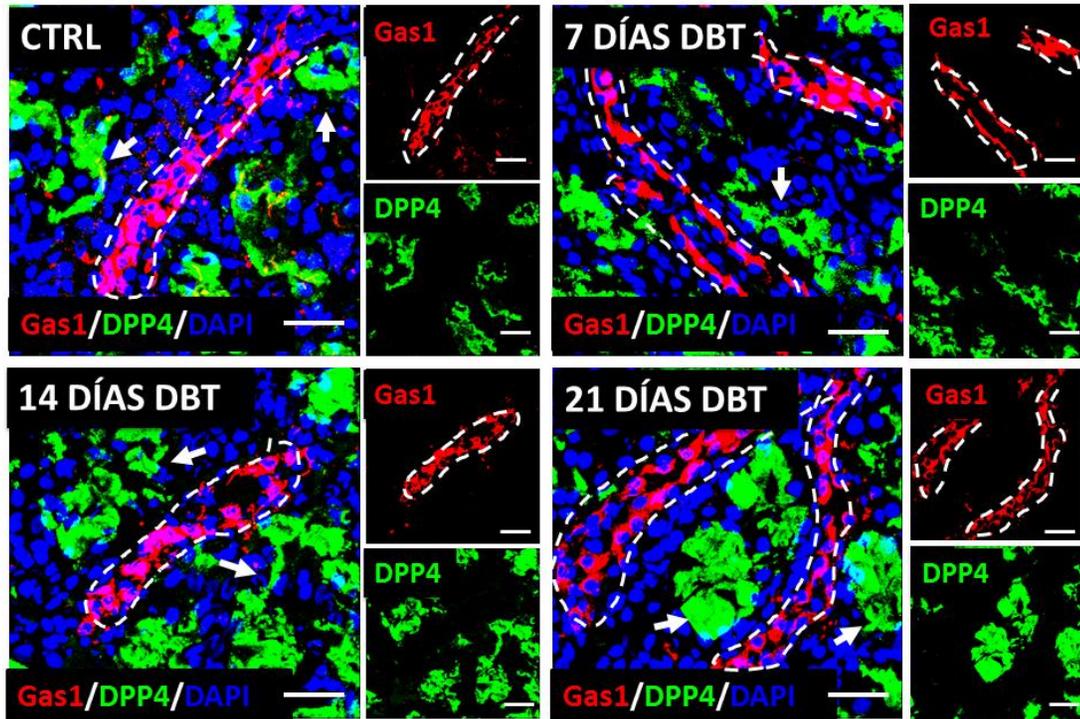
## 8. Expresión de Gas1 en otros segmentos de la nefrona

En el riñón, la expresión de la proteína Gas1 ha sido descrita únicamente en el glomérulo, específicamente en las células mesangiales (130,131); mostrando un análisis parcial de la expresión de Gas1 en las células renales. Por lo anterior, se decidió explorar la expresión de Gas1 en otros segmentos de la nefrona como los podocitos, las células del túbulo proximal y en la nefrona distal en condiciones normales y en las etapas tempranas de la diabetes. Para evaluar si los podocitos expresan Gas1 se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y de nefrina (proteína específica del diafragma en hendidura de los podocitos) (**Figura 30A**). No se observó co-localización de Gas1 y nefrina ni en las ratas control ni en los grupos de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Sin embargo, se observó que muy cerca de la expresión de nefrina y de los núcleos celulares (DAPI<sup>+</sup>) hay expresión de Gas1 tanto en las condiciones normales como en la diabetes, sugiriendo que Gas1 podría expresarse en el cuerpo principal de los podocitos y no en sus prolongaciones primarias y secundarias (pedicelos) que forman el diafragma en hendidura (**Figura 30 B-C**). Para analizar la expresión de Gas1 en las células del túbulo proximal, se realizó una inmunofluorescencia de Gas1 y de dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) (**Figura 31**). La DPP4 se utilizó como marcador específico del túbulo proximal. Se encontró que Gas1 y DPP4 no co-localizan ni en la condición control ni en la condición diabética de 7, 14 y 21 días. Estos resultados demuestran que las células del túbulo proximal no expresan a la proteína Gas1.

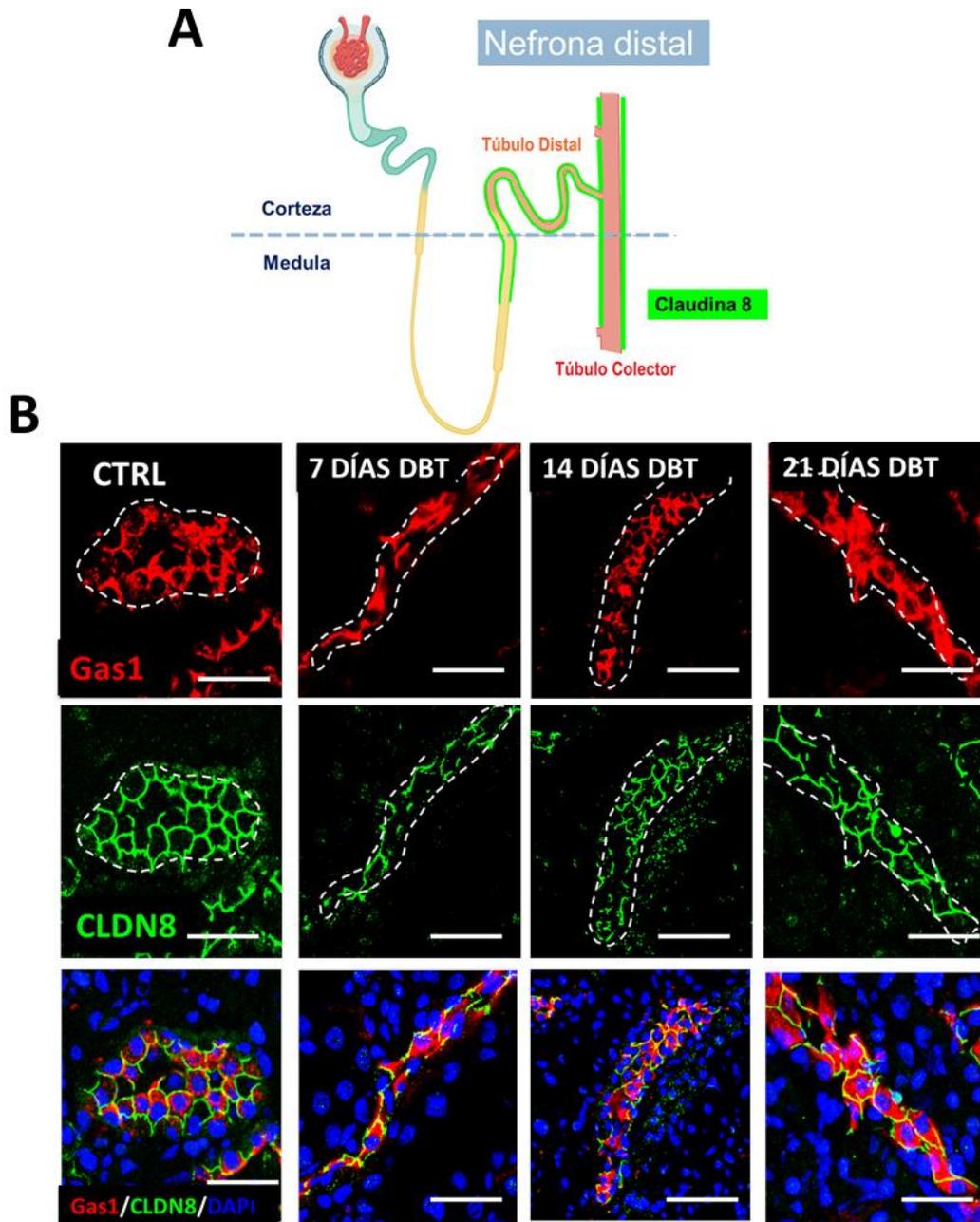
La nefrona distal es la porción de la nefrona que comienza con la parte terminal del asa ascendente de Henle, continúa con el túbulo distal y termina en los túbulos colectores (156) (**Figura 32A**). Para explorar si la proteína Gas1 se expresa en la nefrona distal, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y de claudina-8 (CLDN8). La CLDN8 es una proteína de la unión estrecha específica de los componentes celulares de la nefrona distal (19,141) (**Figura 32B**). Se observó que tanto en las ratas control como en los grupos de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días hay co-localización de Gas1 y CLDN8. Estos resultados sugieren que los componentes de la nefrona distal expresan a Gas1.



**Figura 30. Expresión de Gas1 en los podocitos.** (A) Inmunofluorescencia de Gas1 y nefrina (marcador específico de podocitos) en ratas control y en ratas diabéticas de 7, 14, y 21 días. (B) Esquema representativo de la morfología de los podocitos. (C) Acercamiento de zonas glomerulares con expresión de Gas1-nefrina-DAPI. En inmunofluorescencia Gas1 (rojo), nefrina (verde), DAPI (azul). DBT, diabetes. Líneas blancas y punteadas demarcan glomerulos. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 31. Las células del túbulo proximal no expresan Gas1.** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Gas1 y dipeptidil peptidasa-4 (DPP4). No se observa co-localización ni de Gas1 ni DPP4 en las ratas control y diabéticas de 7, 14 y 21 días. Línea blanca punteada delimita la estructura tubular. Las flechas blancas indican túbulos proximales DPP4<sup>+</sup>. DBT, diabetes. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), DPP4 (verde), DAPI (azul). Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).



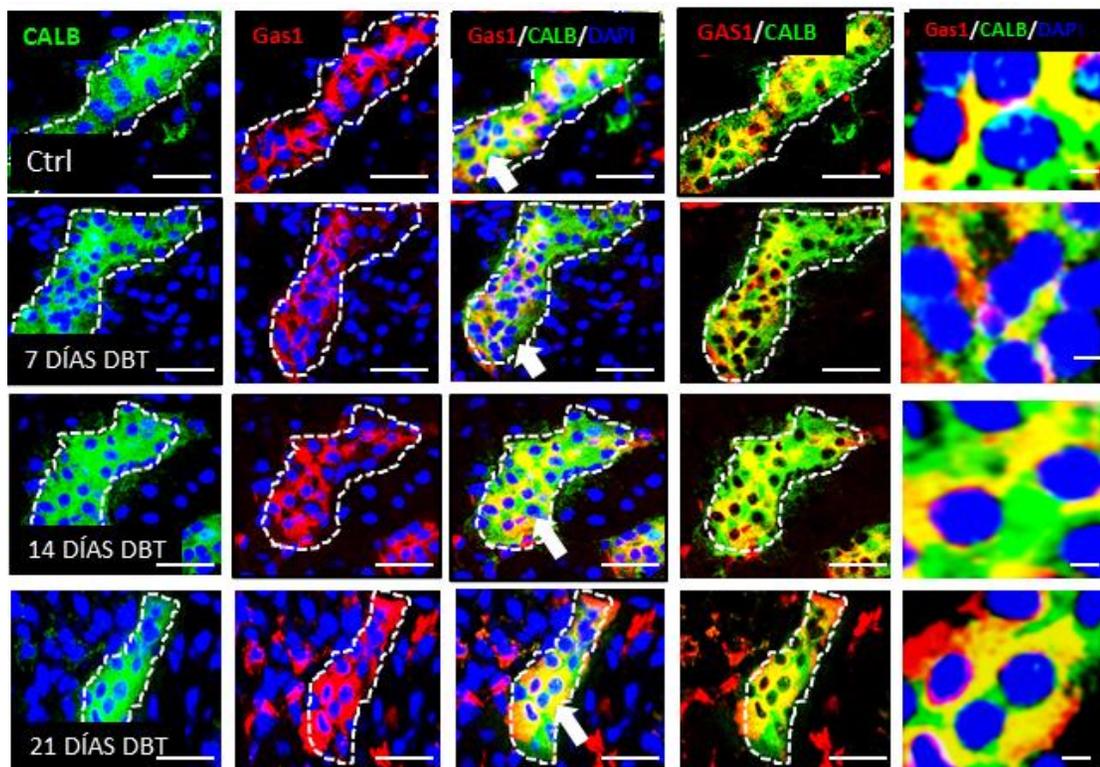
**Figura 32. Expresión de Gas1 en la nefrona distal.** (A) Esquema representativo de la nefrona distal. (B) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Gas1 y claudina-8 (CLDN8). Se encontró que tanto en los grupos de ratas control como en los grupos de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días Gas1 y CLDN8 co-localizan. Esto sugiere que Gas1 se expresa en esta zona renal. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), CLDN8 (verde), DAPI (azul). Línea blanca punteada delimita la estructura tubular. DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

## 9. Expresión de Gas1 en el túbulo distal

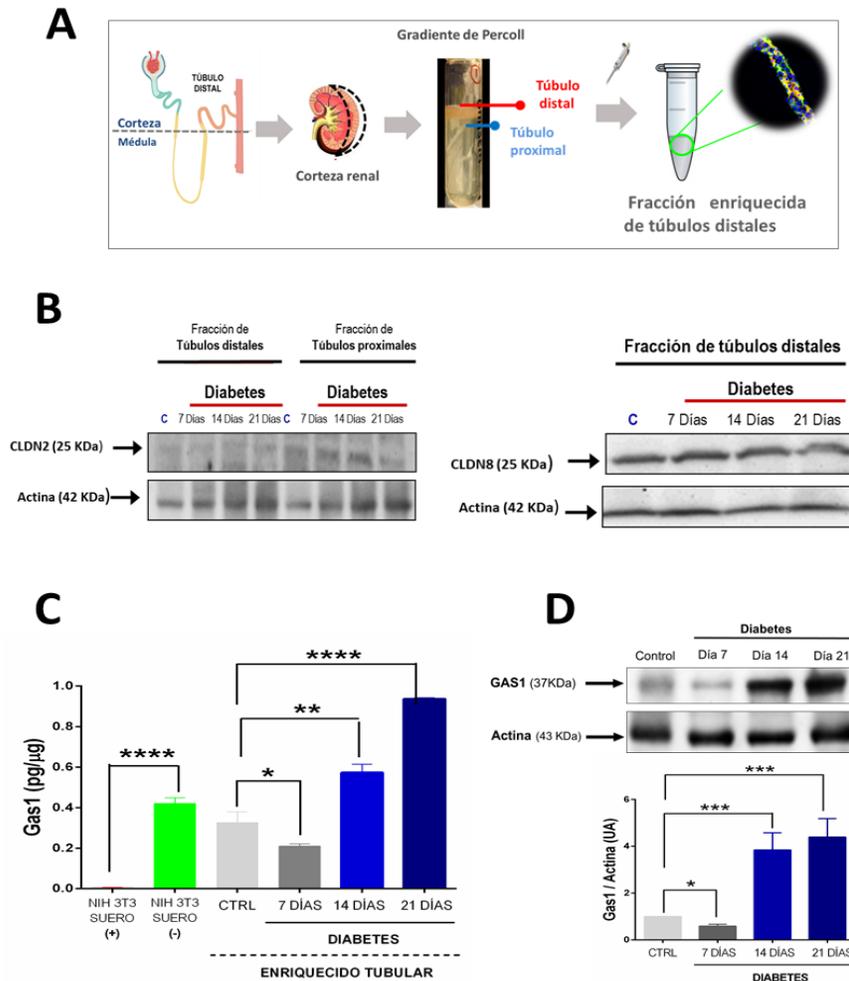
Previamente, se describió la expresión de Gas1 en la nefrona distal. Para confirmar que las células del túbulo distal expresan específicamente a la proteína Gas1 en condiciones normales y en diabetes, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y de calbindina (CALB), un marcador específico del túbulo distal (**Figura 33**) (157). Se encontró que Gas1 y CALB co-localizan en los túbulos renales de las ratas control y las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Posteriormente, se obtuvo una fracción enriquecida de túbulos distales de las ratas control y diabéticas por gradiente de Percoll (**Figura 34 A-B**) para analizar la expresión de Gas1 por western blot y ELISA. En el análisis por western blot se encontró que hay expresión de Gas1 en las ratas control. En contraste, en las ratas diabéticas de 7 días, la expresión de Gas1 disminuyó significativamente, pero en los enriquecidos tubulares de ratas diabéticas de 14 y 21 días, se observó un aumento significativo en comparación con el control (**Figura 34D**). De manera similar al western blot, en el análisis por ELISA (**Figura 34C**) se observó expresión de Gas1 en las ratas control ( $0.326 \pm 0.090$  pg/ $\mu$ g), seguida de una disminución significativa en las ratas diabéticas de 7 días ( $0.210 \pm 0.020$  pg/ $\mu$ g). En contraste, en las ratas diabéticas de 14 días se encontró un aumento gradual de Gas1 ( $0.573 \pm 0.041$  pg/ $\mu$ g) y una subsecuente sobreexpresión ( $0.936 \pm 0.0057$  pg/ $\mu$ g) en las ratas diabéticas de 21 días en comparación con el grupo control, respectivamente. Estos hallazgos demuestran que las células del túbulo distal expresan Gas1 en condiciones normales y en las etapas tempranas de la diabetes.

Anteriormente, se describió la expresión de Gas1 en las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman. Con el objetivo de explorar si el túbulo distal maduro posee células progenitoras que expresen Gas1 se analizó la expresión de Gas1 y CD24 (un marcador célula progenitora renal) por inmunofluorescencia (**Figura 35A**). Se encontró que Gas1 y CD24 co-localizan en los túbulos de ratas control y de las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Estos resultados sugieren que las células del túbulo distal de riñones maduros de rata poseen células progenitoras y que expresan Gas1 en condiciones normales y en las etapas tempranas de la diabetes. Para confirmar estos hallazgos, se evaluó la expresión de CD24 por western blot en fracciones enriquecidas

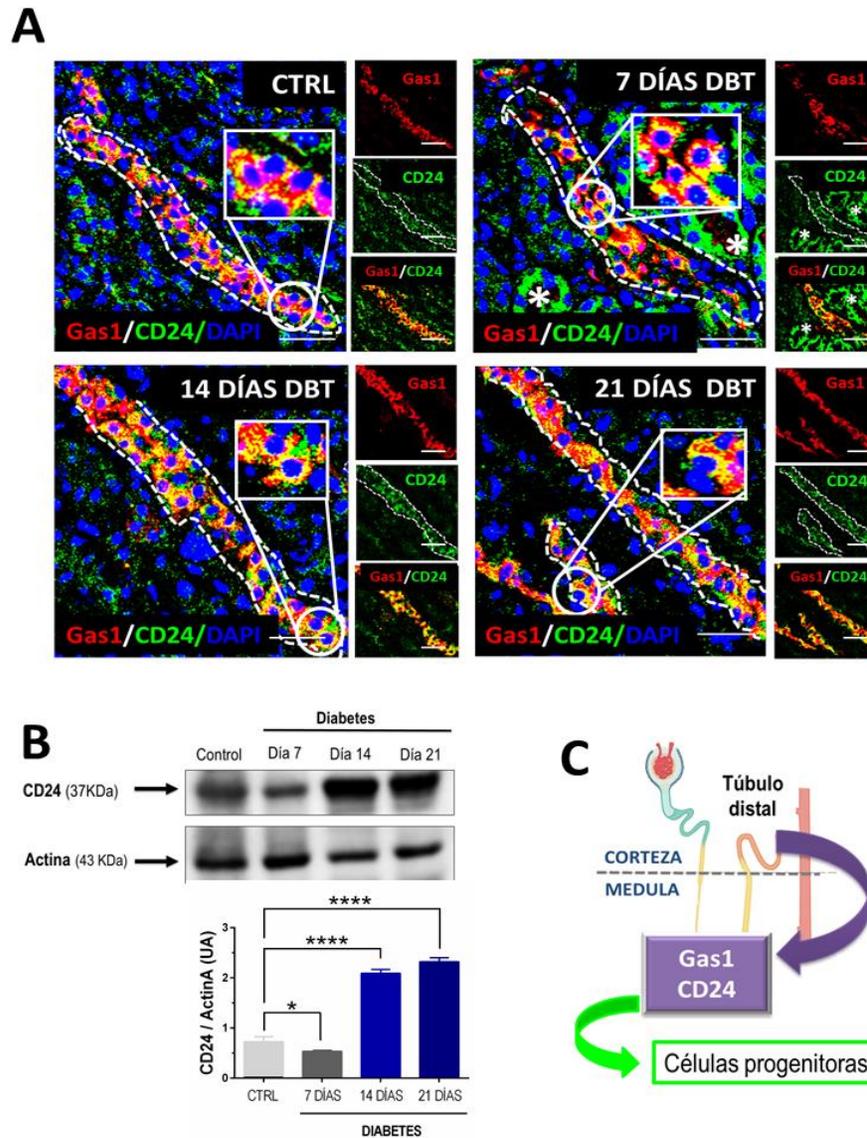
de túbulo distales (**Figura 35B**). Se encontró un patrón de expresión de CD24 muy similar al de Gas1 obtenido por western blot y ELISA. Se observó la expresión de CD24 en las fracciones tubulares de las ratas control, pero en las ratas diabéticas de 7 días, la expresión de CD24 disminuyó significativamente. Por otro lado, se observó que en las fracciones tubulares de ratas diabéticas de 14 y 21 días la expresión de CD24 aumentó significativamente en comparación con el grupo control. Los hallazgos anteriormente descritos demuestran por vez primera que las células del túbulo distal expresan Gas1 en condiciones normales y en diabetes. También sugieren que el túbulo distal maduro posee una población de células progenitoras al expresar el marcador específico CD24<sup>+</sup> (**Figura 35C**).



**Figura 33. Expresión de Gas1 en las células del túbulo distal.** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Gas1 y calbindina (CALB). Se encontró que tanto en los grupos de ratas control como en los grupos de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días, Gas1 y CALB co-localizan. En el último panel (derecha) se muestra un acercamiento de la co-localización de Gas1 y CALB (amarillo) tanto en la condición control como en diabetes. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), CALB (verde), DAPI (azul). La línea blanca punteada delimita la estructura tubular. Las fechas blancas indican las zonas de los acercamientos mostrados en el último panel de la derecha. DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 34. Expresión de Gas1 en fracciones enriquecidas con túbulo distales.** (A) Esquema representativo del gradiente de Percoll y obtención de túbulo distales y proximales. (B) Para evaluar la pureza de las fracciones tubulares aisladas se analizó por western blot la expresión de claudina 2 (CLDN2) en las fracciones obtenidas de túbulo proximales y túbulo distales. La proteína de la unión estrecha CLDN2 es abundante en los túbulo proximales. Se encontró que en las fracciones de túbulo distales, la expresión de CLDN2 está ausente. En contraste, en las fracciones aisladas de túbulo proximales se observó expresión de CLDN2. Para confirmar que las fracciones de túbulo distales son específicas, se analizó por western blot la expresión de claudina-8 (CLDN8). CLDN8 es una proteína profusa y específica de los túbulo distales. En las fracciones aisladas de los túbulo distales de ratas control y diabéticas, se observó de manera consistente la expresión de CLDN8. Estos resultados demuestran que las fracciones aisladas son puras y enriquecidas en túbulo distales de ratas. (C) Análisis por ELISA de Gas1 en un enriquecido de túbulo distales. (D) Análisis por western blot de Gas1. Para el análisis por ELISA se utilizó como control positivo células NIH 3T3 con medio sin suero y como control negativo células NIH-3T3 con suero. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina como control de carga. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunnett. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo (n=3).



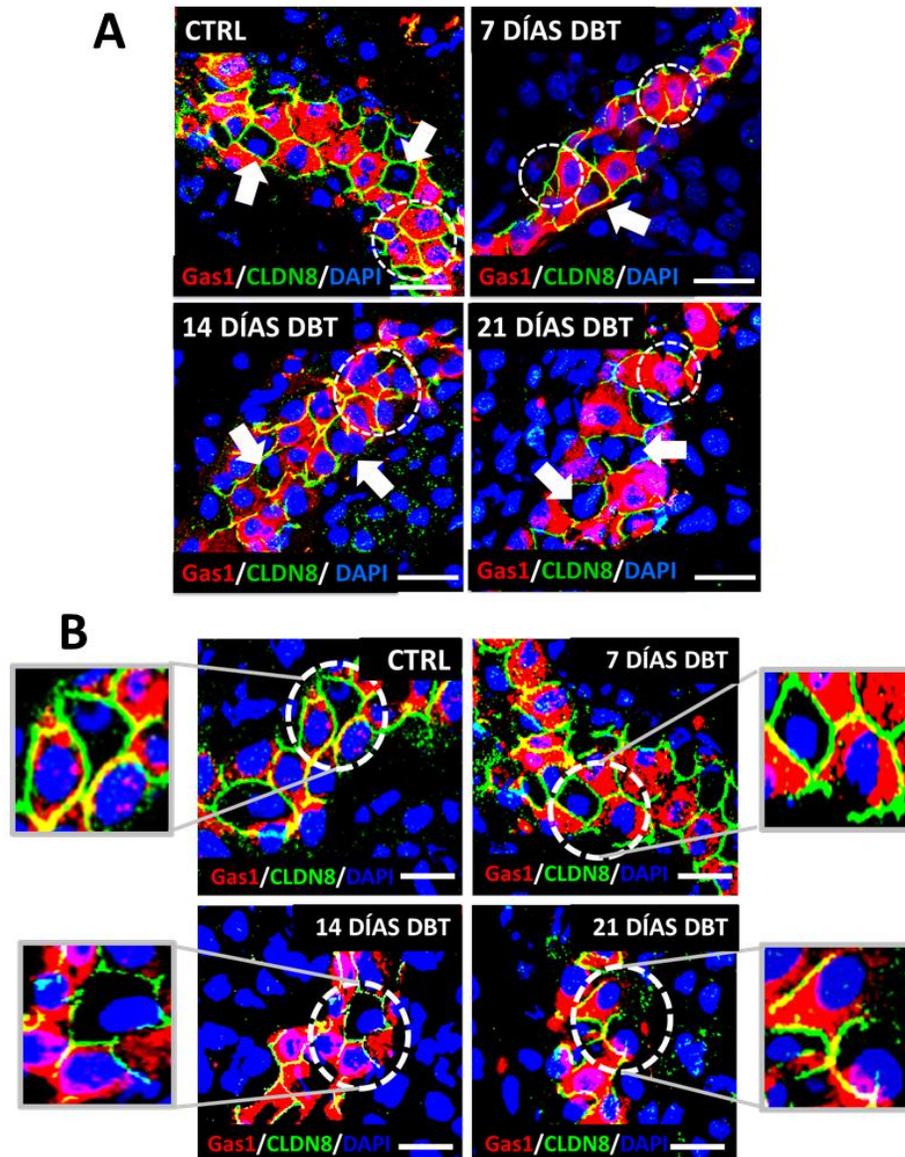
**Figura 35. Expresión de marcadores de células progenitoras en los túbulos distales de rata adulta.** (A) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Gas1 y del marcador de células progenitoras CD24 en las ratas control y en las ratas diabéticas de 7,14 y 21 días. Se encontró co-localización de Gas1 y CD24 en condiciones control y diabéticas. (B) Expresión por western blot de CD24 en fracciones enriquecidas de túbulos distales. (C) Los hallazgos anteriormente descritos sugieren que las células del túbulo distal expresan Gas1 en condiciones normales y en diabetes. También sugieren que el túbulo distal maduro posee una población de células progenitoras ya que expresan el marcador específico CD24. En la inmunofluorescencia se muestra a Gas1 (rojo), CD24 (verde) y DAPI (azul). Líneas blancas y punteadas delimitan túbulos distales. Asteriscos blancos indican otras estructuras tubulares. DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina como control de carga. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *post hoc* de Dunnett. \* $p$ <0.05 y \*\*\*\* $p$ <0.0001. Se muestra un experimento representativo (n=3).

## 10. Expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector

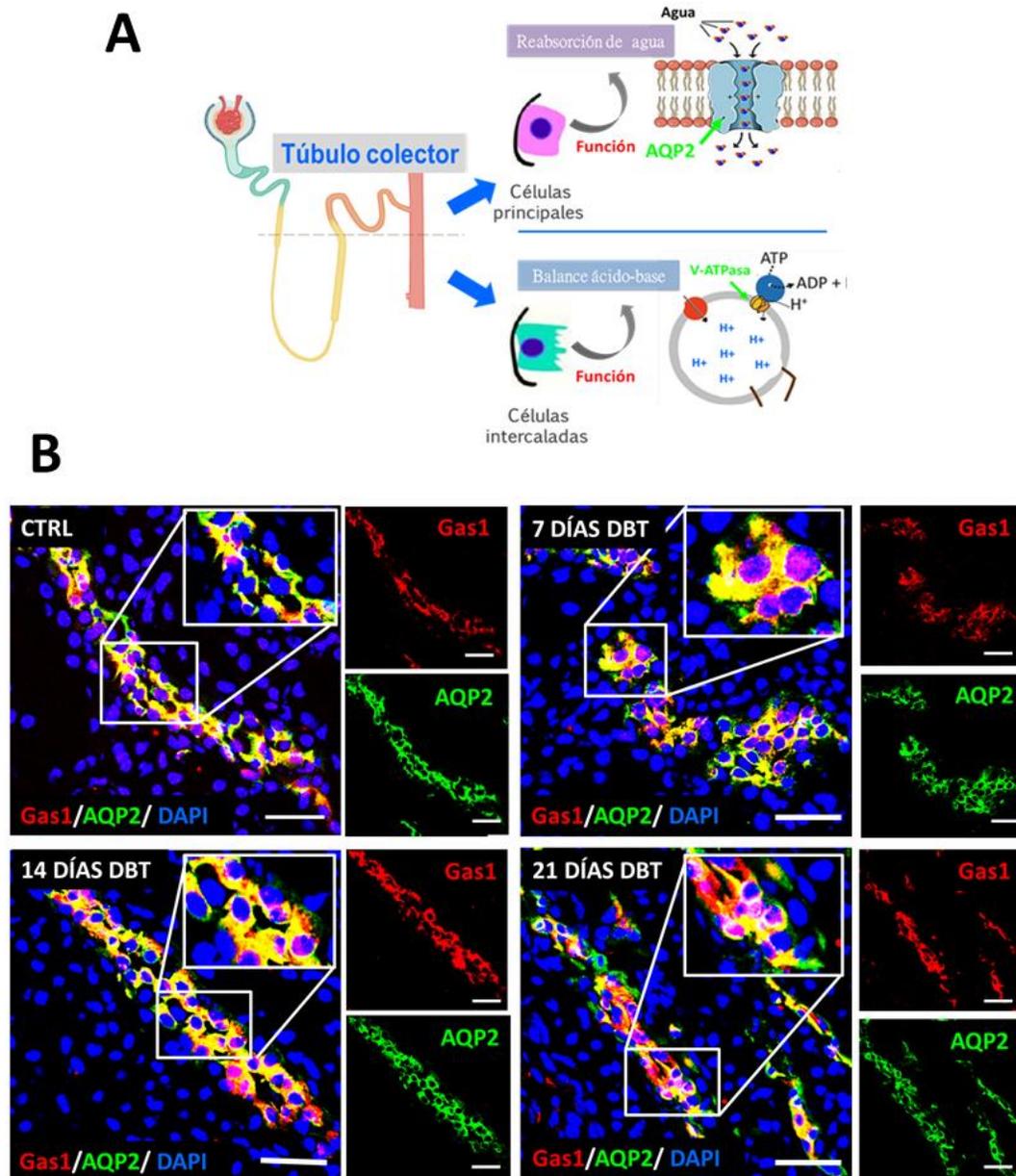
Para evaluar la expresión de Gas1 que el túbulo colector, componente terminal de la nefrona distal, se analizó la expresión de Gas1 y CLDN8 por inmunofluorescencia en la médula, zona renal donde abundan los túbulos colectores. La inmunofluorescencia se realizó en cortes de tejido renal de ratas sanas y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Se encontró que claudina-8 y Gas1 co-localizan. La expresión de Gas1 se detectó tanto en la membrana celular como en el citoplasma de los túbulos colectores en las ratas control y diabéticas (**Figura 36A**).

También se observó un patrón de expresión heterogéneo de Gas1 entre las células, es decir, se encontró que unas células expresan Gas1 y otras no (**Figura 36B**). Estos resultados son interesantes, ya que el túbulo colector se caracteriza por poseer dos tipos de células epiteliales: las células principales y las células intercaladas. Ambas poblaciones celulares son morfológica y funcionalmente distintas. La función central de las células principales es el transporte de sodio y de agua a través del canal de sodio epitelial y del canal aquaporina-2 (AQP2). Por otro lado, las células intercaladas se encargan de la regulación de la homeostasis ácido-base; una de sus proteínas importantes es la bomba de protones vacuolar (V-ATPasa), que acidifica el medio intracelular mediante la introducción de protones (158,159) (**Figura 37A**). Para determinar si Gas1 se expresa de manera específica en alguna de las poblaciones celulares del túbulo colector, se realizó una inmunofluorescencia de Gas1 y AQP2 en tejido renal para explorar la expresión de Gas1 en las células principales. Se encontró que Gas1 y AQP2 co-localizan en las ratas control y en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días (**Figura 37B**). Estos resultados sugieren que Gas1 se expresa en las células principales del túbulo colector. Para un análisis más preciso, se realizó una disección manual de túbulos colectores de ratas sanas y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días (**Figura 38**). Se analizó la expresión de Gas1 y AQP2 por inmunofluorescencia en los túbulos aislados y se encontró que Gas1 y AQP2 co-localizan en los túbulos de las ratas control y en las ratas diabéticas. No se observó expresión de Gas1 en otras zonas del túbulo colector que no expresaran AQP2. Los resultados anteriormente descritos confirman la

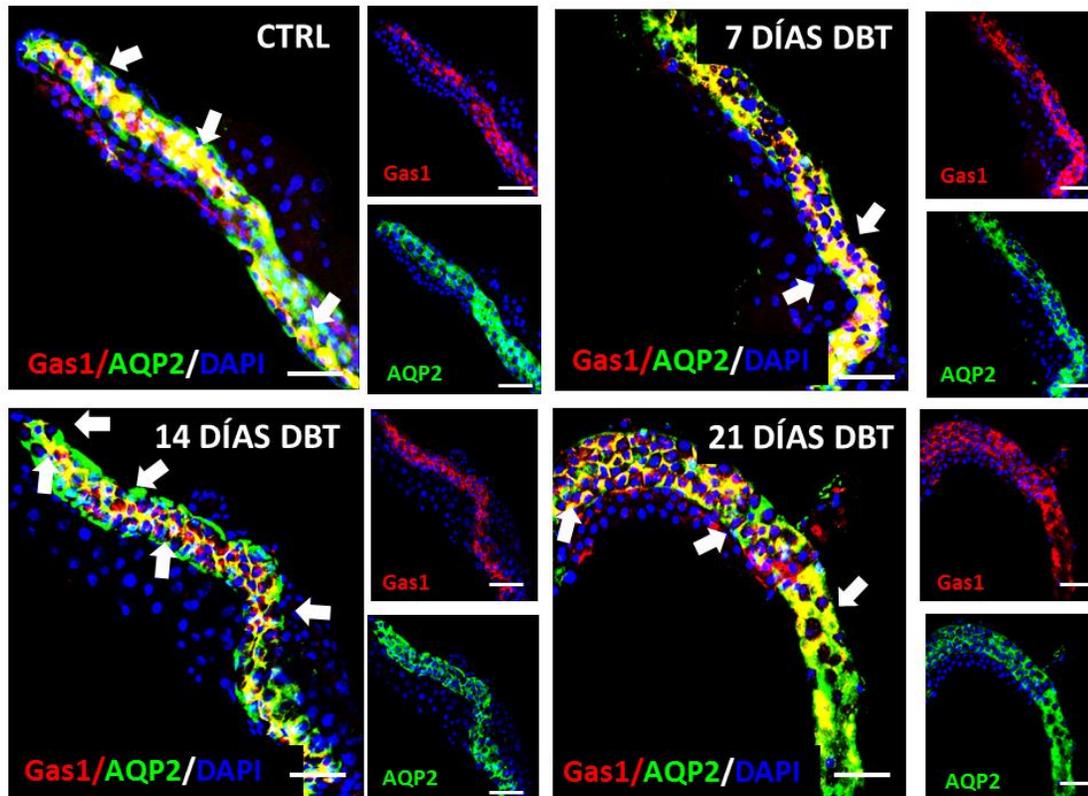
expresión de Gas1 en el túbulo colector y revelan que las células principales expresan específicamente a Gas1 en las condiciones control y en diabetes.



**Figura 36. Expresión de Gas1 en el túbulo colector.** Análisis por inmunofluorescencia de Gas1 y CLDN8 en la zona medular. **(A)** Se encontró que tanto en los grupos de ratas control como en los grupos de ratas diabéticas de 7,14 y 21 días, Gas1 y CLDN8 co-localizan. Se observó la expresión de Gas1 en la membrana celular y en el citoplasma. **(B)** También se encontró una expresión heterogénea de Gas1 entre las células. Unas células expresan Gas1 y otras no. En los acercamientos se aprecia a detalle que hay células que expresan Gas1 en la membrana y en el citoplasma y células vecinas no. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), CLDN8 (verde), DAPI (azul). Círculos blancos punteados señalan células Gas1<sup>+</sup>. Las flechas blancas apuntan a células que no expresan Gas1. DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

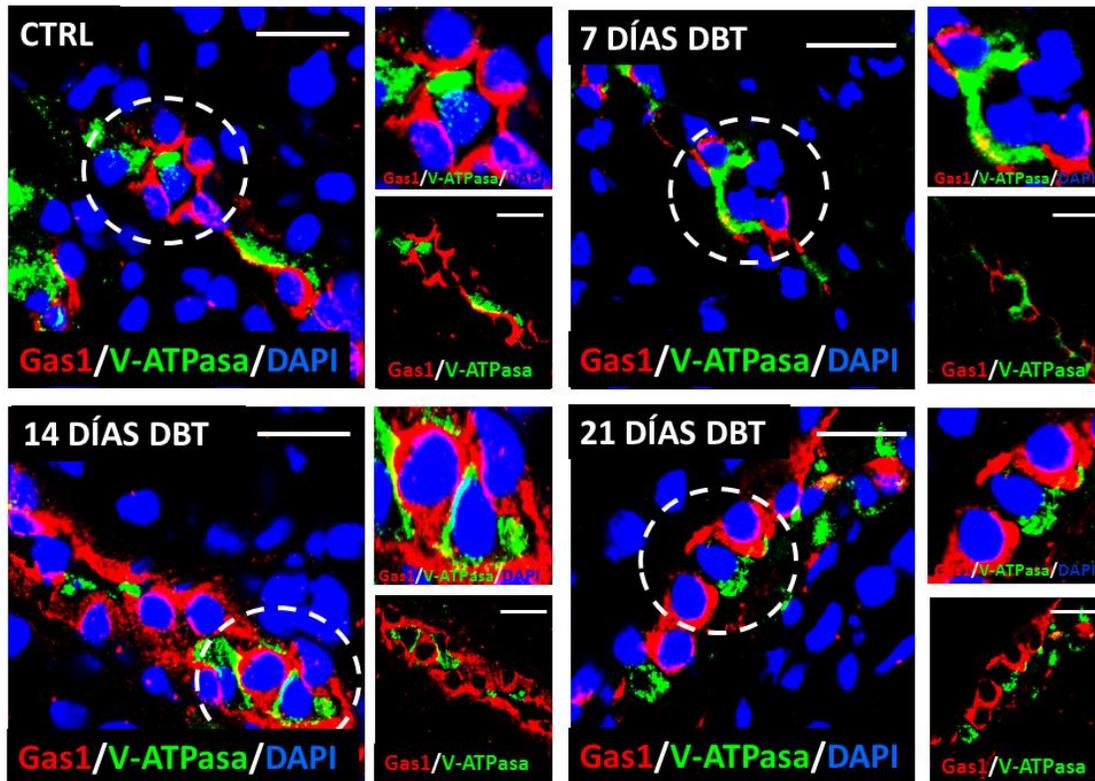


**Figura 37. Expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector.** (A) Esquema representativo del túbulo colector. El túbulo colector se caracteriza por poseer dos tipos celulares: células principales (AQP2<sup>+</sup>) y células intercaladas (V-ATPasa<sup>+</sup>), las cuales son morfológica y funcionalmente distintas. Para identificar si alguno de estos dos tipos celulares del túbulo colector, expresa específicamente a Gas1, (B) se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y AQP2 en el tejido renal de ratas sanas y diabéticas de 7, 14 y 21 días. Se encontró que Gas1 y AQP2 co-localizan en los grupos control y diabéticos, sugiriendo que las células principales expresan Gas1. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Recuadros blancos indican acercamientos de células Gas1<sup>+</sup>/AQP2<sup>+</sup> (zonas amarillas). DBT, diabetes. Escala = 50 μm. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 38. Confirmación de la expresión de Gas1 en las células principales en túbulos colectores aislados.** Para confirmar la expresión de Gas1 en los túbulos colectores, se realizó una disección manual de túbulos colectores en riñones maduros de ratas control y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y AQP2 en los túbulos aislados. Se encontró que Gas1 y AQP2 co-localizan en la condición control y en la diabetes, confirmando la expresión de Gas1 en el túbulo colector, específicamente en las células principales. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Las flechas blancas indican células Gas1<sup>+</sup>/AQP2<sup>+</sup> (zonas amarillas). DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

Para corroborar los resultados previos sobre la expresión de Gas1 en las células principales, se decidió explorar si las células intercaladas expresan igualmente Gas1. Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y de la bomba de protones vacuolar (V-ATPasa), proteína de las células intercaladas (**Figura 39**). La inmunofluorescencia se realizó en el tejido renal de ratas control y de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Tanto en la condición control como en la condición diabética de 7, 14 y 21 días se encontró que Gas1 y V-ATPasa no co-localizan, sugiriendo que las células intercaladas no expresan a la proteína Gas1.

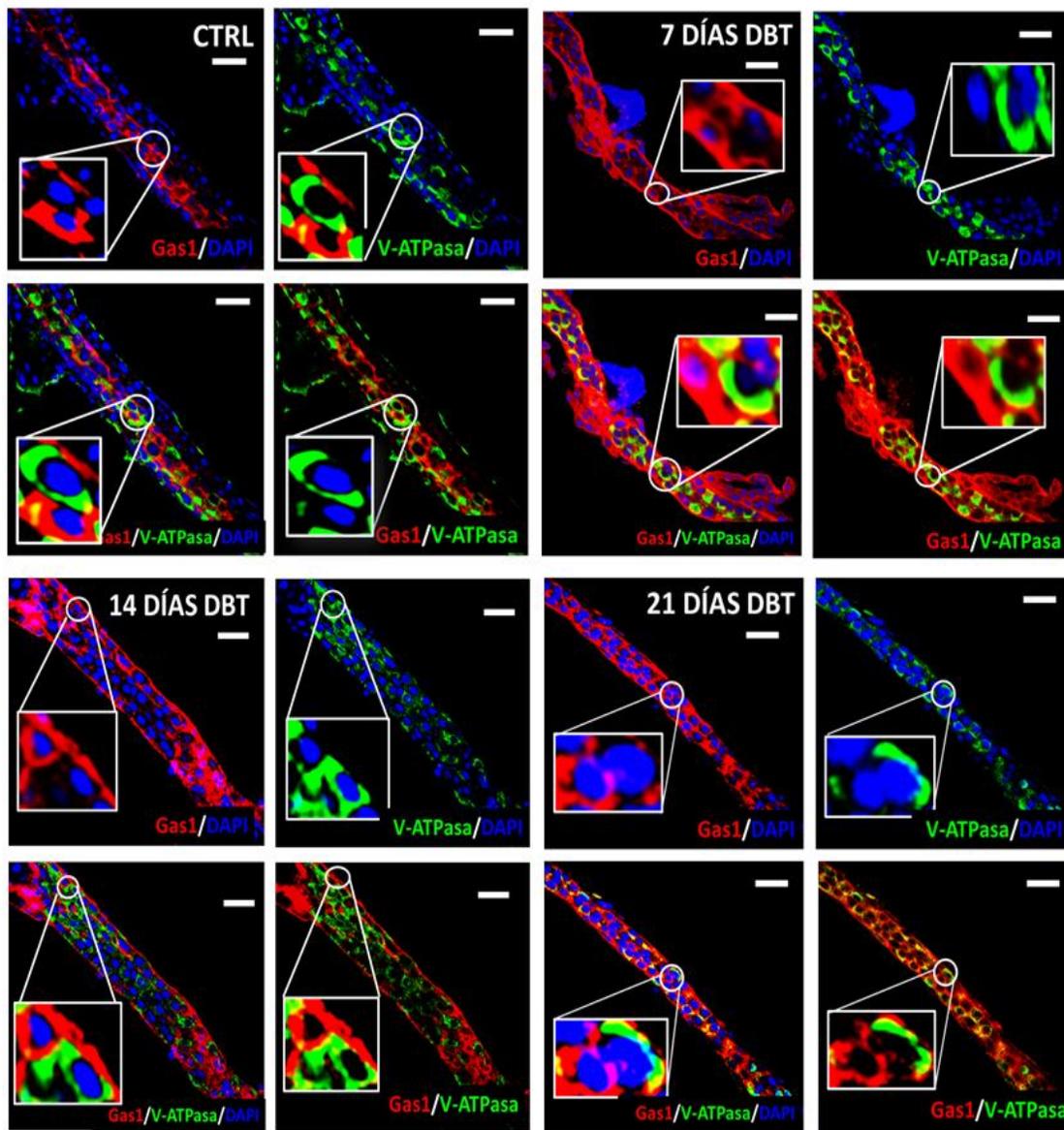


**Figura 39.** Análisis de la expresión de Gas1 en las células intercaladas del túbulo colector. Inmunofluorescencia de Gas1 y V-ATPasa en cortes de tejido renal de ratas controles y diabéticas de 7, 14 y 21 días. V-ATPasa es un marcador específico de las células intercaladas. Se encontró que Gas1 y V-ATPasa no co-localizan en las ratas controles y diabéticas. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), V-ATPasa (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos indican acercamientos que se observan a detalle en el recuadro superior derecho. DBT, diabetes. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

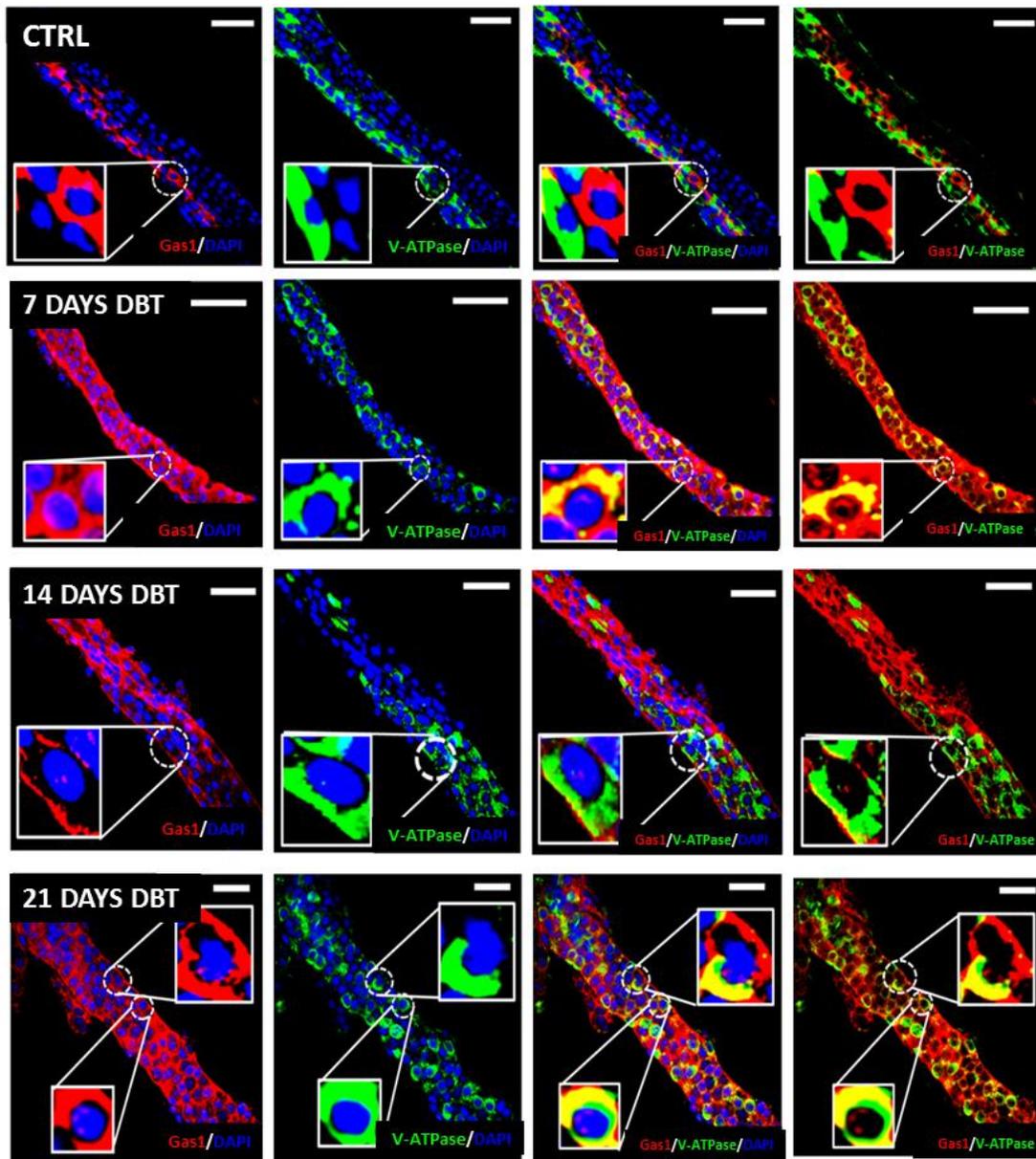
### 11. Expresión de Gas1 en las células intercaladas y presencia de células intermedias en el túbulo colector en la diabetes

Para confirmar los resultados previos, se realizó la inmunofluorescencia de Gas1 y V-ATPasa en túbulos colectores aislados (**Figura 40**) y se observó que en la condición control Gas1 y V-ATPasa no co-localizan. De manera similar, en la condición diabética la mayor parte de las células no presenta co-localización de Gas1 y V-ATPasa. Sin embargo, se observó un fenómeno muy interesante, algunas células muestran una co-localización tenue y parcial de Gas1 y del marcador de célula intercalada, V-ATPasa, denominándolas como células intermedias (**Figura 41**). Por lo

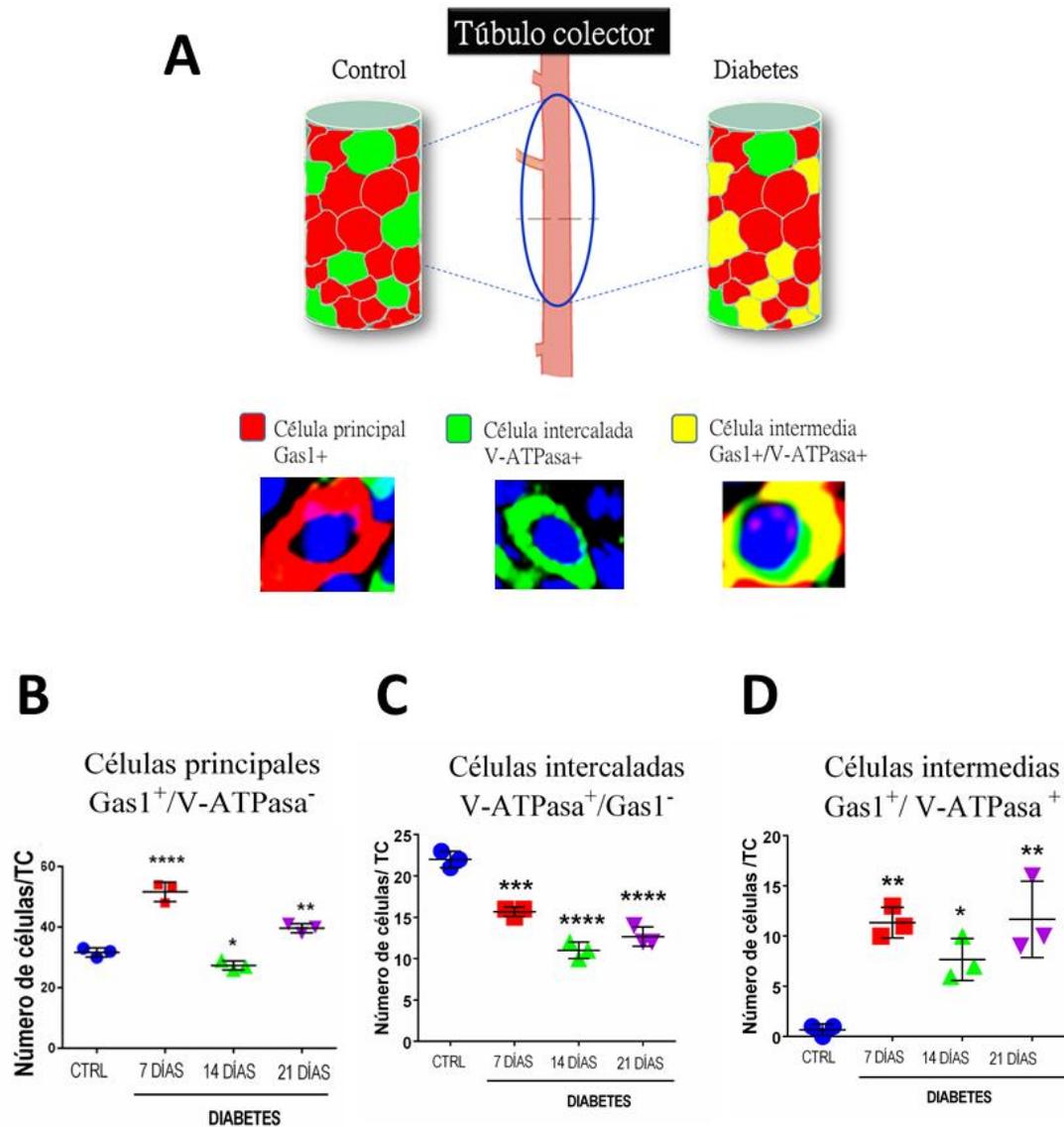
anterior, se realizó la cuantificación de células principales Gas1<sup>+</sup>, células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> y células intermedias Gas1<sup>+</sup>/V-ATPasa<sup>+</sup> (**Figura 42A**) en condiciones normales y en diabetes. Los resultados de la cuantificación muestran que en la condición diabética de 7, 14 y 21 días hay una disminución gradual y significativa del número de células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> (**Figura 42C**), así como el aumento de células principales Gas1<sup>+</sup> con una pequeña oscilación a la baja a los 14 días de diabetes (**Figura 42B**). También se observó que el número de células intermedias Gas1<sup>+</sup>/V-ATPasa<sup>+</sup> (**Figura 42D**) aumentó en las ratas diabéticas (día 7,  $11.3 \pm 1.52$  células; día 14,  $7.6 \pm 2.08$  células; día 21,  $11.6 \pm 3.78$  células) en comparación con las ratas control ( $0.66 \pm 0.57$  células). Estos resultados son sumamente importantes, porque recientemente se ha descrito el alto grado de plasticidad de las células principales AQP2<sup>+</sup> del túbulo colector y su potencialidad para diferenciarse a células intercaladas en modelos de daño tubular por litio y depleción de potasio. Los hallazgos anteriormente descritos muestran que existe una pérdida significativa de células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> en la condición diabética de 7, 14 y 21 días; es posible que ante esta condición fisiológica, las células principales Gas1<sup>+</sup> comiencen un proceso de diferenciación a célula intercalada para poder compensar la pérdida de células por la hiperglucemia. Probablemente, las células que se observaron con marca de Gas1<sup>+</sup>/V-ATPasa<sup>+</sup> (células intermedias) son células principales Gas1<sup>+</sup> en un paso intermedio en su proceso de diferenciación a células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup>, sugiriendo que las células intercaladas no expresan Gas1.



**Figura 40. Las células intercaladas no expresan a Gas1.** Se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Gas1 y V-ATPasa en túbulos colectores aislados de ratas sanas y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Se observó que en la condición control y diabética, predominantemente las células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> no expresan Gas1. En los acercamientos se observa a detalle cómo en la condición control y en la diabetes hay células V-ATPasa<sup>+</sup> y células Gas1<sup>+</sup> adyacentes. En la inmunofluorescencia Gas1 (rojo), V-ATPasa (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos muestran acercamientos de células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> y células principales Gas1<sup>+</sup>. CTRL, control. DBT, diabetes. Escala = 20  $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).



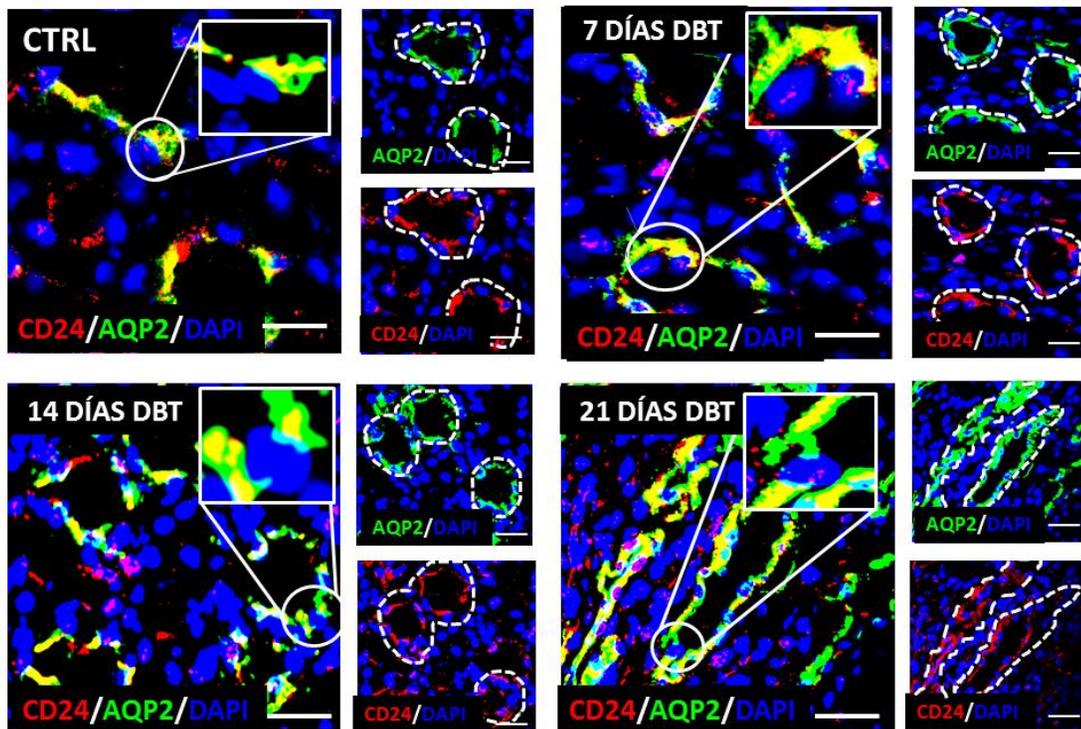
**Figura 41. Células intermedias  $\text{Gas1}^+/\text{V-ATPase}^+$  en el túbulo colector en diabetes.** Aunque la mayoría de las células intercaladas  $\text{V-ATPase}^+$  no expresan  $\text{Gas1}$ , se encontraron algunas células  $\text{Gas1}^+/\text{V-ATPase}^+$  en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. En los acercamientos se observa que en el grupo control, las células intercaladas  $\text{V-ATPase}^+$  no expresan  $\text{Gas1}$ , pero en los grupos de ratas diabéticas se observaron algunas células  $\text{V-ATPase}^+/\text{Gas1}^+$ . En la inmunofluorescencia  $\text{Gas1}$  (rojo),  $\text{V-ATPase}$  (verde),  $\text{DAPI}$  (azul). Los círculos blancos muestran acercamientos de células intermedias  $\text{V-ATPase}^+/\text{Gas1}^+$  (amarillo). DBT, diabetes. Escala =  $20\mu\text{m}$ . Se muestra un experimento representativo ( $n=3$ ).



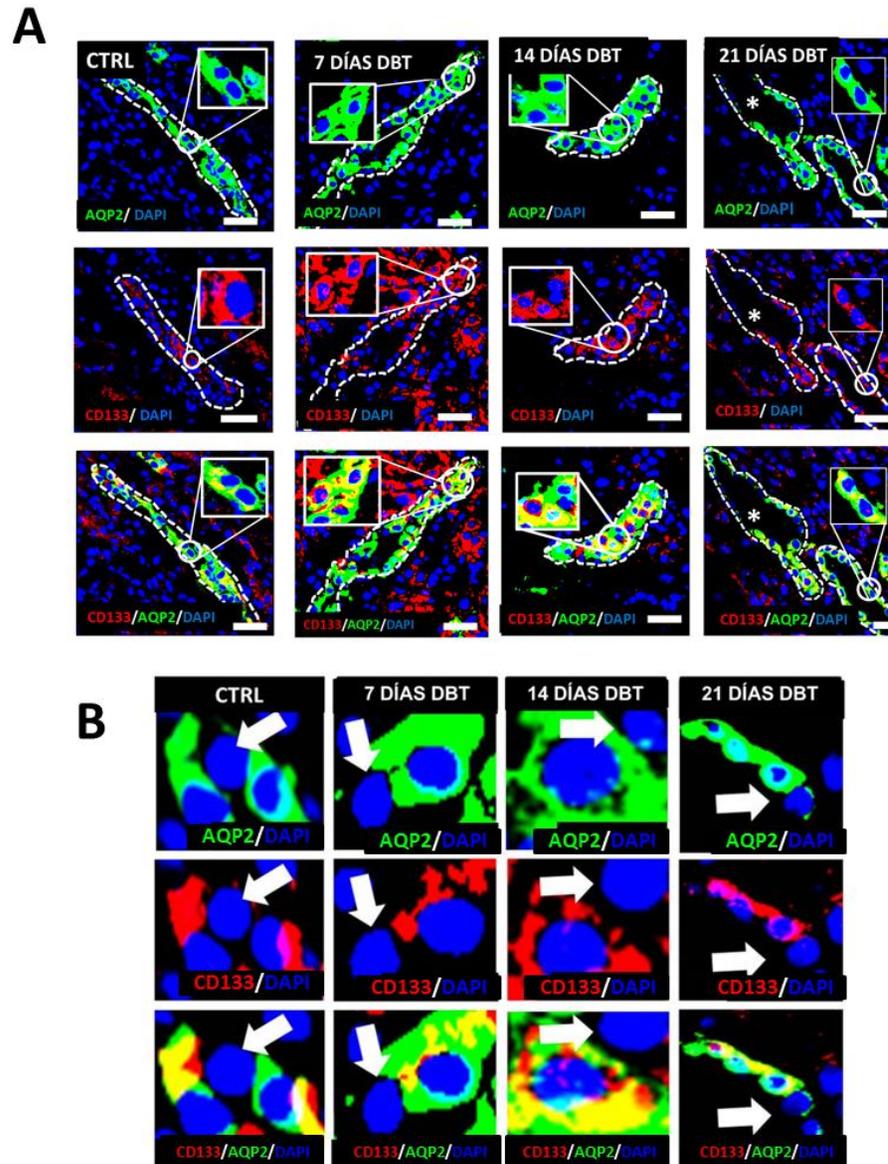
**Figura 42. Cuantificación de células principales, células intercaladas y células intermedias del túbulo colector en etapas tempranas de la diabetes.** (A) Esquema representativo de la población celular en el túbulo colector. En el análisis por inmunofluorescencia en túbulos colectores aislados, se encontró que en la condición control hay células principales que expresan Gas1<sup>+</sup> (rojo) y células intercaladas que expresan V-ATPase<sup>+</sup> (verde). En la condición diabética de 7, 14 y 21 días, se siguen observando células principales Gas1<sup>+</sup>, células intercalas V-ATPase<sup>+</sup>, pero en una menor proporción se encontraron células que co-expresan a Gas1<sup>+</sup> y V-ATPase<sup>+</sup> (amarillo), denominándolas células intermedias. (B) Cuantificación de células principales Gas1<sup>+</sup>, (C) células intercaladas V-ATPase<sup>+</sup> y (D) células intermedias Gas1<sup>+</sup>/V-ATPase<sup>+</sup> en túbulos colectores aislados de ratas control y ratas diabéticas. Se muestra la media ± desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunett. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*< 0.001 y \*\*\*\**p*<0.0001. Se muestra un experimento representativo (n=3).

## 12. Las células principales del túbulo colector expresan marcadores de célula progenitora CD24 y CD133

Se ha descrito la presencia de células progenitoras mesénquimales (células-*MSC*) en el túbulo colector *in vitro* y se ha propuesto que el origen de las células-*MSC* son las células principales  $AQP2^+$  (160). Hasta el momento se desconoce si las células del túbulo colector, expresan marcadores de célula progenitora en riñón maduro *in vivo*. Anteriormente, en las células parietales de la cápsula de Bowman y en las células del túbulo distal se ha observado una relación entre la expresión de Gas1 y la de marcadores de las células progenitoras renales. Con el objetivo de investigar si las células principales  $AQP2^+$  (que también expresan Gas1) muestran algún componente de célula progenitora, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de AQP2 y CD24 (marcador de célula progenitora renal) en ratas control y en ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días (**Figura 43**). Se encontró que las células principales del túbulo colector  $AQP2^+$  expresan CD24 tanto en condiciones normales como en la diabetes. En los acercamientos se aprecia a detalle la co-localización de AQP2 y CD24 (zonas amarillas). También se analizó la expresión de AQP2 y CD133 (**Figura 44A**). En la inmunofluorescencia se observó la co-localización de ambas proteínas. De importancia es que en los acercamientos se observa con más precisión como las células  $AQP2^+$  co-expresan CD133 y las células que no expresan AQP2 (células intercaladas) no tienen ninguna expresión de CD133 (**Figura 44B**), demostrando que las únicas células que expresan CD133 son las células principales  $AQP2^+$  y no las células intercaladas ( $AQP2^-$ ). Estos hallazgos confirman que las células principales expresan marcadores de célula progenitoras renales (CD24 y CD133). También sugieren que las células principales pueden tener un papel bifuncional en el túbulo colector: uno, como célula epitelial encargada del balance hídrico y del transporte de sodio y otro, como célula progenitora de células intercaladas.



**Figura 43. Las células principales expresan marcadores de célula progenitora.** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de AQP2 y CD24 (marcador de célula progenitora renal). AQP2 y CD24 co-localizan en las ratas control y en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. En los acercamientos se observa a detalle la expresión de CD24 en las células principales AQP2<sup>+</sup> (zonas amarillas). En la inmunofluorescencia CD24 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos indican acercamientos. Línea blanca punteada delimitan a los túbulos colectores. DBT, diabetes. Escala = 50 μm. Se muestra un experimento representativo (n=3).

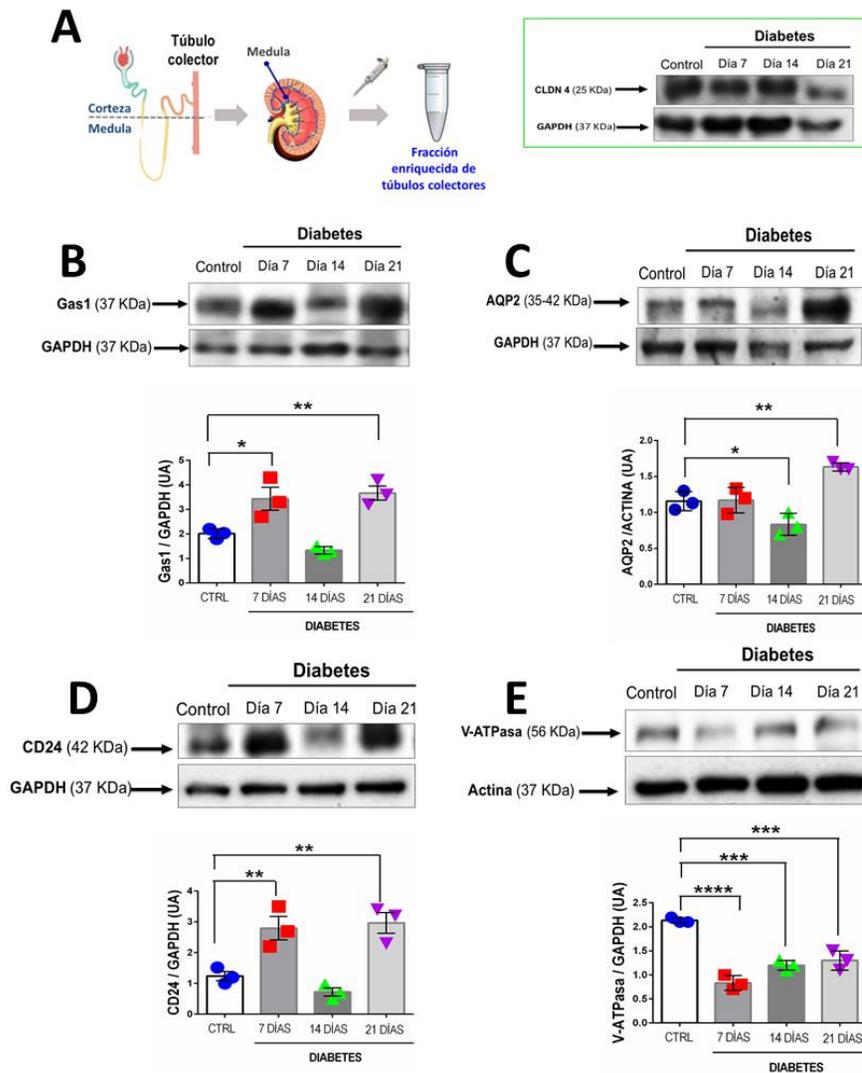


**Figura 44. Las células principales AQP2<sup>+</sup> expresan CD133 en condiciones normales y durante las etapas tempranas de la diabetes. (A)** inmunofluorescencia de AQP2 y CD133 (marcador de células principales). Se encontró que AQP2 y CD133 co-localizan en las ratas control y en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. **(B)** Se observa a detalle como las células principales AQP2<sup>+</sup> expresan específicamente a CD133, mientras que las células adjuntas que no expresan AQP2 y que se intuye son células intercaladas no expresan CD133 (flechas blancas). Estos resultados demuestran que las células principales expresan marcadores de célula progenitora renal. En la inmunofluorescencia CD133 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos indican acercamientos. Línea blanca punteada delimitan a los túbulos colectores. Asterisco señala la luz tubular. Flechas blancas indican células intercaladas AQP2<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup>. DBT, diabetes. Escala = 50µm. Se muestra un experimento representativo (n=3).

### 13. Expresión de Gas1, AQP2, CD24 y V-ATPase en fracciones enriquecidas de túbulos colectores de ratas control y diabéticas

Para realizar un estudio completo de la expresión de Gas1 en los túbulos colectores, se analizó mediante western blot a la proteína Gas1 en fracciones enriquecidas de túbulos colectores obtenidas de ratas adultas sanas y diabéticas de 7, 14 y 21 días (**Figura 45A**). Tanto en la condición normal como en la diabetes, se encontró expresión de Gas1, confirmando los resultados previos obtenidos por inmunofluorescencia (**Figura 45B**). También se evaluó la expresión de AQP2 y CD24 por western blot (**Figura 45 C-D**). Se encontró la expresión de ambas proteínas en las fracciones de túbulos colectores de las ratas control. En contraste, en las fracciones tubulares de las ratas diabéticas de 14 días, se observó una tendencia a disminuir la expresión de ambas proteínas acompañada de una sobreexpresión de AQP2 y CD24 en las ratas diabéticas de 21 días, respectivamente. Se encontró un patrón de expresión similar entre AQP2, CD24 y Gas1 en el análisis por western blot, que puede estar indicando que estas proteínas se encuentran localizadas en un mismo tipo celular. Esto apoya los resultados anteriores por inmunofluorescencia, las células principales AQP2<sup>+</sup> expresan específicamente a Gas1 y a los marcadores de célula progenitoras CD24 y CD133.

De igual manera, se evaluó por western blot la expresión de V-ATPasa (**Figura 45E**). Se observó una disminución significativa de V-ATPasa en las fracciones tubulares de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días en comparación con las ratas control. Previamente, se cuantificó a las células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> en condiciones control y en diabetes (**Figura 42C**). Se encontró que el número de células V-ATPasa<sup>+</sup> disminuyó significativamente en las ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días en comparación con las ratas control (ratas control,  $22 \pm 1$  células; ratas diabéticas de 7 días,  $15.6 \pm 0.57$  células; ratas diabéticas de 14 días,  $11 \pm 1$  células; ratas diabéticas de 21 días,  $12.6 \pm 1.15$  células). Estos resultados sugieren que existe una pérdida severa o daño de células intercaladas en las etapas tempranas de la diabetes.



**Figura 45. Expresión de Gas1 en un enriquecido medular de túbulos colectores.** (A) Esquema representativo de la obtención del enriquecido de túbulos colectores. Los túbulos colectores abundan en la zona medular del riñón, por lo que se disecó la médula de riñones maduros de ratas control y de ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días. Para confirmar que la fracción medular está enriquecida con túbulos colectores, se realizó un western blot para detectar claudina-4 (CLDN4) en las fracciones obtenidas de ratas control y diabéticas. CLDN4 es una proteína de la unión estrecha abundante y específica del túbulo colector. Se encontró en todas las fracciones medulares expresión de CLDN4, indicando que las fracciones medulares están enriquecidas con túbulos colectores. En las fracciones enriquecidas con túbulos colectores, se analizó por western blot la expresión de (B) Gas1, (C) AQP2, (D) CD24, (E) V-ATPasa. El análisis densitométrico se muestra como la densidad relativa en unidades arbitrarias (UA) con actina y GAPDH, como control de carga. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Prueba *pos hoc* de Dunnett. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestra un experimento representativo ( $n=3$ ).

#### 14. El papel de Gas1 en la diferenciación de células principales a células intercaladas: vía de Notch

Previamente se describió la expresión de Gas1 en las células principales del túbulo colector, con un notable aumento en la condición diabética (específicamente en las ratas diabéticas de 7 y 21 días). Considerando que estos hallazgos son recientes y que actualmente se ha estudiado solo la expresión de Gas1 en el riñón embrionario, la función de Gas1 en este segmento de la nefrona es aún desconocido.

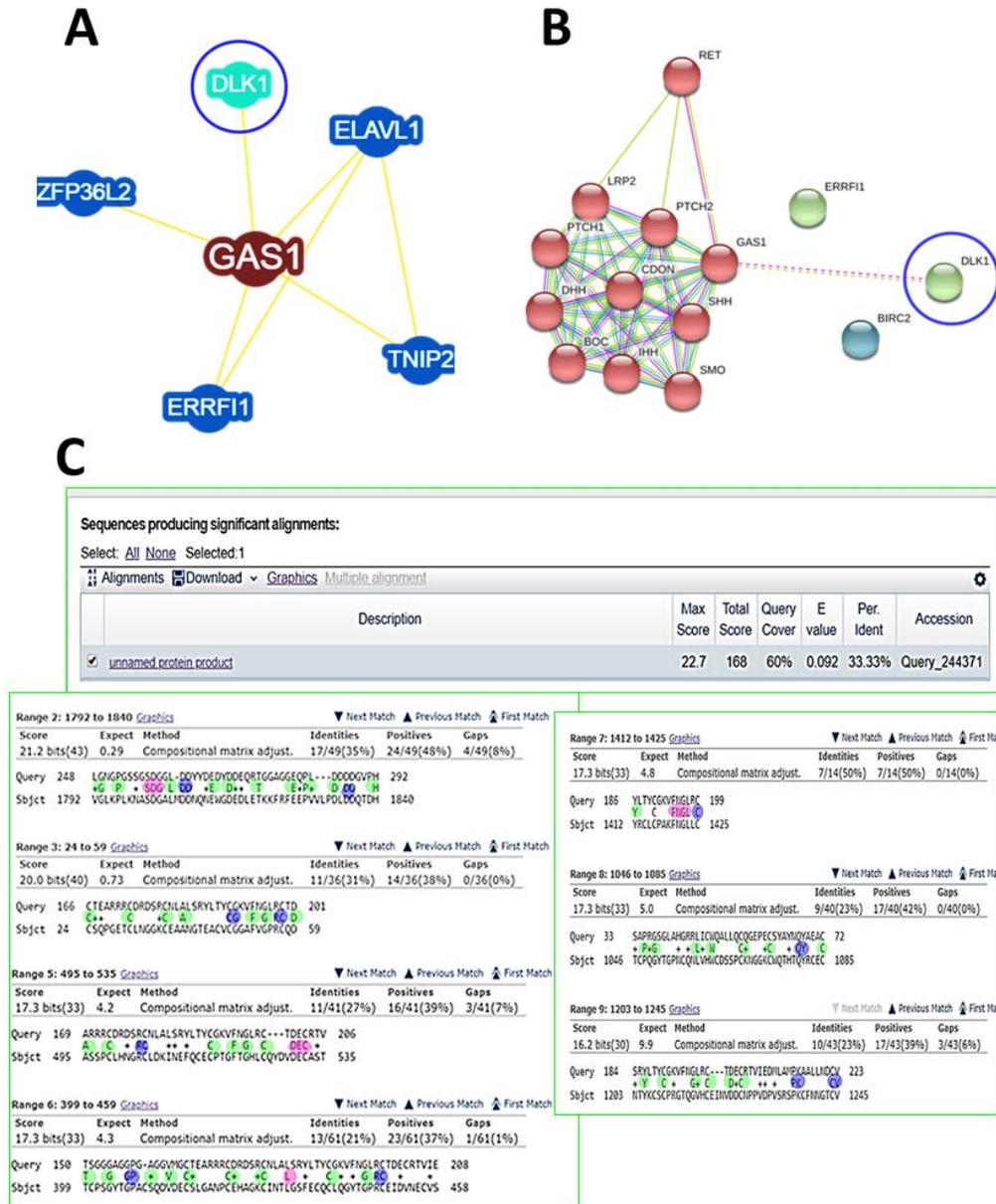
Estudios previos demostraron que la inhibición de la vía de Notch en las células principales del túbulo colector promueve su diferenciación a células intercaladas (144). Es posible que Gas1 tenga un papel importante directo o indirecto sobre la vía de Notch en las células principales y en el proceso de diferenciación celular.

Con el objetivo de investigar si Gas1 tiene alguna relación con la vía de Notch, se examinó por diferentes bases de datos de interacción proteína-proteína (como STRING y BioGRID) las interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) de Gas1 con otras proteínas a partir de la predicción de modelos computacionales, investigaciones publicadas y asociación con otras bases de datos. En STRING y BioGRID se encontró que Gas1 tiene una fuerte interacción con la proteína homóloga delta 1, DLK1 (**Figura 46 A-B**). DLK1, también conocida como el factor de preadipocitos 1, es un ligando de la vía no canónica de Notch1. DLK1 es una proteína de membrana celular de la familia del factor de crecimiento epidermal (por sus siglas en inglés, EGF), posee una región TACE, un dominio transmembranal y una pequeña región intracelular. Debido a su región TACE, DLK1 se encuentra también en forma soluble (161–163). Se ha descrito principalmente que el ligando DLK1 inhibe a la vía de Notch *in vitro* (164–166). Algo interesante es que el ligando DLK1 se expresa abundantemente durante la embriogénesis, pero en tejidos maduros, su expresión se limita a tejidos endocrinos como las glándulas pituitarias y adrenales, el páncreas y los ovarios. (163). Sin embargo, se ha observado la reexpresión de DLK1 en diferentes tejidos como en daño renal (tumor de Wilms), en carcinoma de mama, colon y próstata (167–169). También se encontró que DLK1 es importante para la diferenciación de las

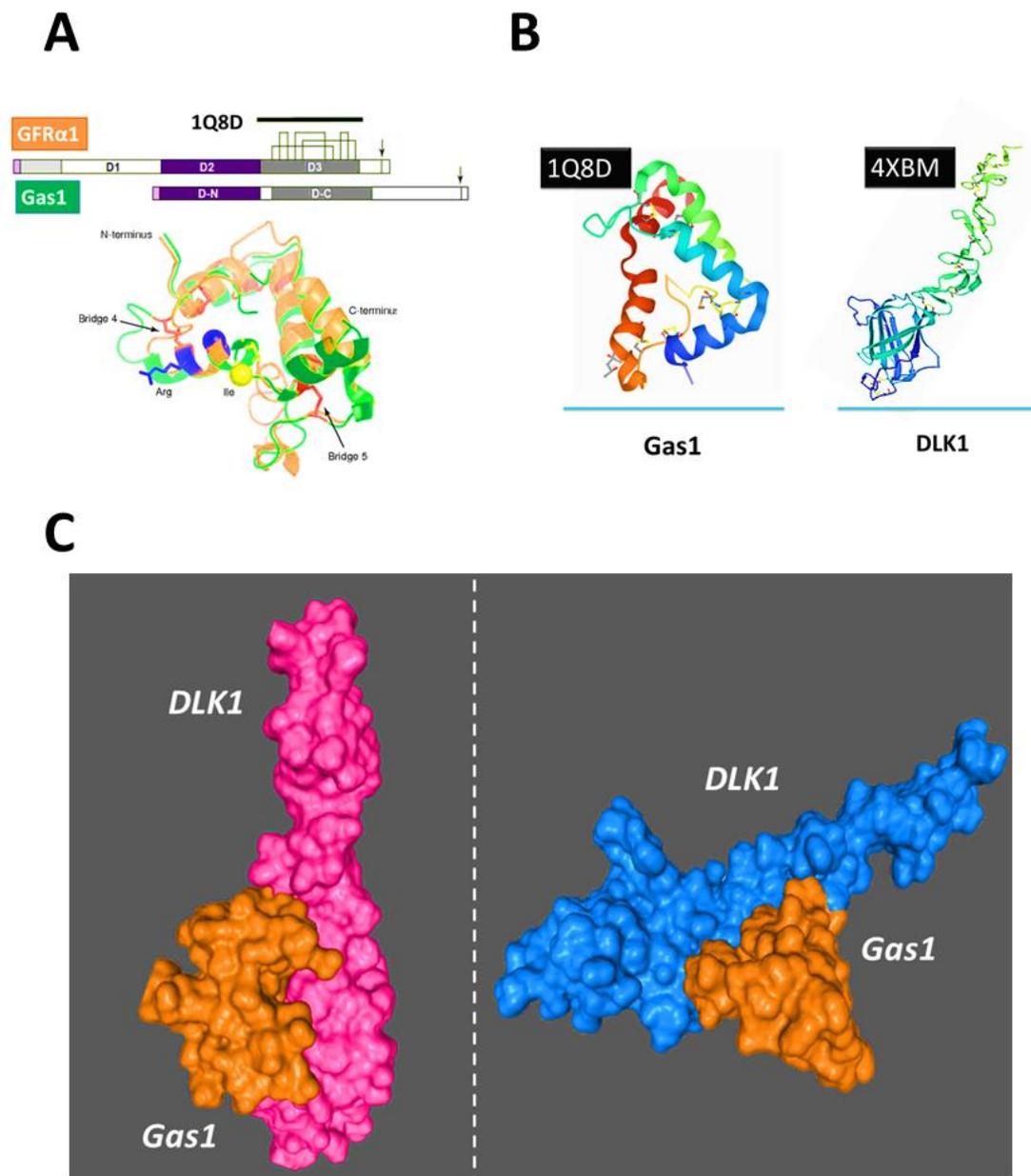
células alveolares mediante la regulación negativa de la vía de Notch en daño pulmonar (170).

Con base en los resultados anteriores, se determinó analizar si la secuencia proteica de Gas1 presenta homología o identidad similar con el receptor de Notch1, que pudiera sugerir a Gas1 como receptor o una proteína de interacción del ligando DLK1 y su potencial intervención en la vía de Notch. Se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas de Gas1 y el receptor de Notch por el programa Blast (basic local alignment search tool) (**Figura 46C**). Los resultados mostraron que se obtuvo un alineamiento de las secuencias de un 60%, obteniendo un valor de  $e$  de 0.092 (óptimo  $<1$ ) que indica la puntuación máxima de alineaciones esperadas al azar; y un porcentaje de identidad del 33.33%. Estos resultados muestran que la proteína Gas1 posee una similitud en su secuencia con respecto al receptor Notch1. Esto confirma que Gas1 podría tener una interacción con el ligando DLK1.

Para esclarecer los resultados de la interacción Gas1-DLK1, se realizó un docking proteína-ligando mediante el programa bioinformático de modelos computacionales proteína-proteína, HADDOCK (171–174) (**Figura 47**). El programa HADDOCK arrojó diez modelos de interacción de Gas1 con DLK1 con un docking score  $-235.89 \pm 8.7$  y una desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (RMSD) de  $57 \pm 7.7$  Å. Estos resultados indican que los modelos de interacción de Gas1-DLK1 representan un sistema energético estable (al poseer baja energía) y una distancia o sobreposición de los átomos de las estructuras proteicas admisible. Esto sugiere que la interacción de Gas1 y DLK1 es posible.



**Figura 46. Interacción de Gas1 y la vía de Notch.** Análisis de interacción proteína-proteínas por las bases de datos (A) BioGRID y (B) STRING, ambos programas indicaron que Gas1 tiene una interacción directa o física con el ligando de la vía de Notch, DLK1 (señalado en ambos esquemas con un círculo azul). (C) Alineamiento de secuencias proteicas de Gas1 y el receptor Notch1 con el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Para el alineamiento se utilizaron las secuencias proteicas de la base de datos UniProt con ID P46531 (NOCHT1) y P54826 (Gas1). El alineamiento mostró el puntaje máximo de alineación (Max score=22.7), la suma de las puntuaciones de alineación de toda la secuencia (Total score = 168), el porcentaje total de la secuencias alineadas (Query cover=60%), el número de alineaciones esperadas (e-value=0.092%) y el grado en que las secuencias alineadas presentan los mismo residuos en las mismas posiciones (Per. Ident = 33.33%). En los recuadros inferiores se muestran la alienación de las secuencias. Los círculos verdes, azules y rosas indican uno, dos o tres aminoácidos iguales en la misma posición entre ambas secuencias.



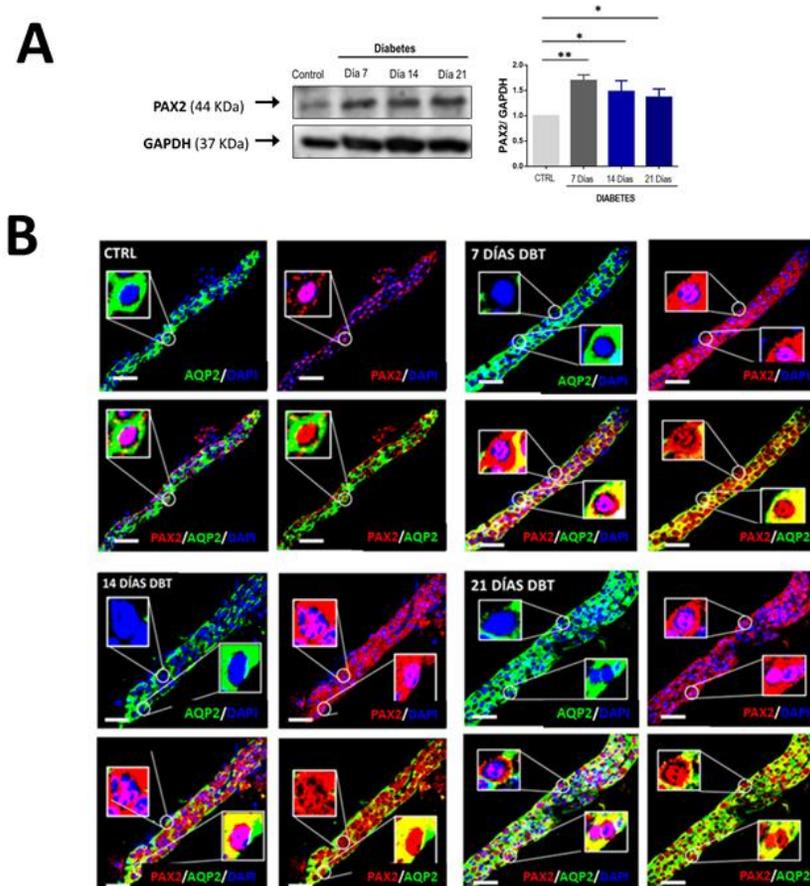
**Figura 47. Modelos computacionales de interacción de Gas1 y DLK1.** (A) Previamente se describió la homología entre el dominio 3 del receptor de la familia GDNF alfa-1 ( $GFR\alpha 1$ ) y el dominio 2 (carboxilo terminal) de Gas1, ambos dominios ricos en cisteínas (175). (B) Para el docking entre Gas1 y DLK1 fue necesario obtener en Protein Data Bank (PDB) el código de la estructura cristalina de Gas1 y DLK1. Debido a que no existe el registro de la estructura cristalina de Gas1, se utilizó como templado el dominio 3 del  $GFR\alpha 1$ . Estructuras cristalinas utilizadas para el modelo de interacción proteico y registradas en el PDB, con código 1Q8D (dominio 3 del  $GFR\alpha 1$ ) y 4XBM (DLK1). (C) Modelos de interacción (docking) de las proteínas GAS1 y DLK1 en el programa libre HADDOCK.

Hasta el momento, se conoce que las células principales AQP2<sup>+</sup> expresan a Gas1 y al receptor Notch1; y que las células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup> producen al ligando DLL1 de la vía canónica de Notch. En condiciones normales, el ligando DLL1 se une con el receptor Notch1 en las células principales y activa la vía de señalización intracelular, induciendo la expresión del factor de transcripción HES1 y favoreciendo el mantenimiento del fenotipo de las células principales. Se encontró que durante los primeros 21 días de diabetes, hay una sobreexpresión de Gas1 en las células principales y una disminución significativa de células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup>. Los resultados previos también mostraron que Gas1 puede tener una interacción directa con el ligando de la vía no canónica de Notch, DLK1, el cual inhibe a la vía de Notch directamente. La inhibición o bloqueo de la vía de Notch, es esencial para la diferenciación de las células principales a células intercaladas en el túbulo colector. Todos estos resultados sugieren que Gas1 podría participar directamente en la vía de Notch y modular positivamente la diferenciación de células principales a células intercaladas en daño renal inducido por la diabetes.

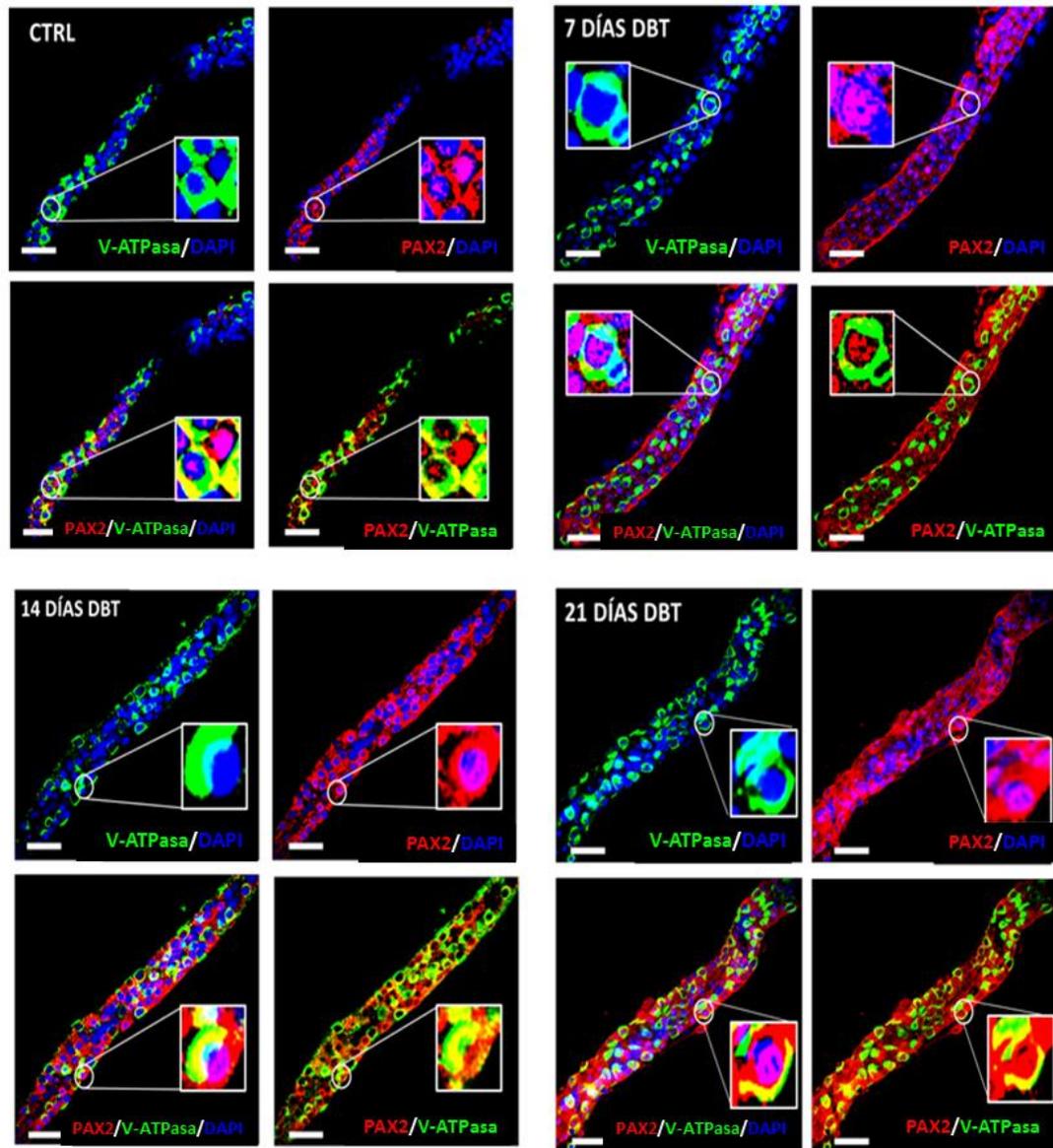
### **15. Expresión de la proteína PAX2 el túbulo colector durante las etapas primarias de la diabetes**

Hasta el momento no se ha estudiado ampliamente los mecanismos de protección, reparación y regeneración en el túbulo colector en daño renal por diabetes. Se ha descrito que la expresión del factor de transcripción PAX2 aumenta en las células del túbulo colector en daño inducido por hiperosmolaridad *in vitro* y protege a las células de la apoptosis. Con la finalidad de conocer si existe una sobreexpresión de PAX2 en el túbulo colector en las primeras etapas de la diabetes, se analizó por western blot la expresión de PAX2 en una fracción medular enriquecida de túbulos colectores de ratas control y ratas diabéticas de 7, 14 y 21 días (**Figura 48A**). Se encontró que la expresión de PAX2 aumentó significativamente en los grupos de ratas diabéticas en comparación con las ratas control. Posteriormente, para explorar si la expresión de PAX2 es selectiva o específica en las células principales o células intercaladas, se analizó la expresión de PAX2, AQP2 (marcador de células principales) y V-ATPasa (marcador de células intercaladas) por inmunofluorescencia en túbulos colectores

aislados (**Figura 48B y 49**). Se observó que la expresión de PAX2 aumenta considerablemente en los grupos de ratas diabéticas. La expresión de PAX2 no es específica de algún tipo celular, es decir, tanto las células principales como las intercaladas expresan a PAX2 en condiciones normales y en diabetes. Estos resultados sugieren que en las primeras etapas de la diabetes existe una sobreexpresión de PAX2, que pudiera estar asociada con algún mecanismo de protección frente al daño renal inducido por la diabetes. Son necesarios estudios más detallados.



**Figura 48. Sobre expresión de PAX2 en las células principales del túbulo colector en las etapas tempranas de la diabetes.** (A) Western blot de PAX2 en enriquecido de túbulo colectores. (B) Inmunofluorescencia de AQP2 y PAX2 en túbulo colector aislado manualmente. En las ratas control hay células principales que expresan PAX2 en el núcleo. En contraste, en las primeras etapas de la diabetes, la expresión de PAX2 aumenta significativamente. Se observa también la expresión perinuclear y citoplasmática. En la inmunofluorescencia PAX2 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos indican acercamientos. Línea blanca punteada delimita a los túbulo colectores. DBT, diabetes. Escala = 20µm. Se muestra un experimento representativo (n=3).



**Figura 49. Sobre expresión de PAX2 en las células intercaladas del túbulo colector en las etapas tempranas de la diabetes.** Inmunofluorescencia de V-ATPasa y PAX2 en túbulos colectores aislados manualmente. En las ratas control hay células principales que expresan PAX2 en el núcleo. En contraste en las primeras etapas de la diabetes, la expresión de PAX2 aumenta significativamente. Se observa también la expresión perinuclear y citoplasmática. En la inmunofluorescencia PAX2 (rojo), AQP2 (verde), DAPI (azul). Los círculos blancos indican acercamientos. Línea blanca punteada delimitan a los túbulos colectores. DBT, diabetes. Escala = 20 $\mu$ m. Se muestra un experimento representativo (n=3).

## VIII. Discusión

En este estudio se exploró la expresión de la proteína Gas1 en las células de la cápsula de Bowman. Los hallazgos principales son: 1) Las células parietales de la cápsula de Bowman expresan a Gas1; 2) La diabetes induce la disminución de la expresión de Gas1 y el aumento de marcadores de células progenitoras, NCAM, CD24, SIX2 en la cápsula de Bowman; 3) Las células de la nefrona distal expresan a Gas1 en condiciones normales y en etapas tempranas de la diabetes. Este es el primer trabajo en el que se analiza la expresión de Gas1 en las células parietales del glomérulo, en el túbulo distal y en el túbulo colector de la nefrona distal en un modelo de diabetes experimental en rata.

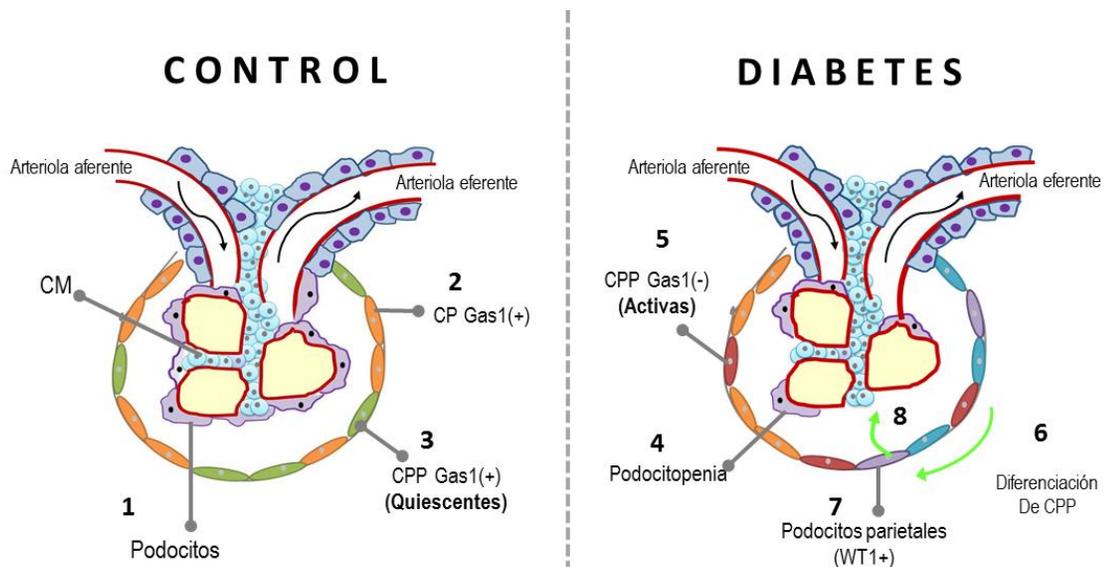
La diabetes es una enfermedad metabólica y crónica, fuertemente asociada a complicaciones renales severas, y que a largo plazo induce la insuficiencia renal. En este estudio se analizó la depuración de creatinina y la proteinuria como indicadores de alteraciones funcionales inducidas por la diabetes experimental. Se encontró un aumento gradual de los niveles de proteinuria y depuración de creatinina en las ratas diabéticas, desde el día 7 y hasta el día 21, respectivamente. Se observaron las alteraciones funcionales más elevadas en las ratas diabéticas de 21 días en ambos parámetros. Estos resultados se relacionan con estudios previos en donde se describe que la nefropatía diabética se caracteriza por el aumento de la excreción urinaria de proteínas y el desarrollo de hiperfiltración, ambos factores importantes en las primeras etapas de daño renal (176,177); demostrando que el modelo experimental de diabetes por administración de STZ utilizado induce un daño renal (178,179).

Hasta ahora se ha descrito la expresión de Gas1 en el riñón a nivel glomerular, específicamente en las células mesangiales en un modelo murino de glomerulonefritis mesangial proliferativa y en cultivos de células mesangiales humanas. El objetivo primordial de este estudio fue analizar si las células parietales de la cápsula de Bowman expresan a Gas1. Los resultados muestran que las células parietales de la cápsula de Bowman expresan a Gas1 en condiciones normales, pero en las etapas tempranas de la diabetes la expresión de Gas1 disminuye gradualmente en la cápsula de Bowman. La

disminución de Gas1 puede estar fuertemente asociada a la expresión del microRNA-34a (miR-34a) y al Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (por sus siglas en inglés, PDGF). Se ha demostrado que en condiciones de hiperglucemia, las células mesangiales sobreexpresan al miR-34a, el cual interacciona directamente con la región 3'-UTR del ARN mensajero de Gas1, alterando su expresión postranscripcional y suprimiendo la traducción genética de Gas1 (131). Por otro lado, también se ha demostrado que el PDGF inhibe la expresión de Gas1 en las células mesangiales (130). Se ha encontrado que hay una sobreexpresión de PDGF en las células glomerulares en el daño renal inducido por diabetes (180–182). También se conoce que las células parietales de la cápsula de Bowman expresan al receptor beta del PDGF (PDGFR- $\beta$ ) en el daño renal (183,184). Posiblemente, en las etapas tempranas de la diabetes, hay un aumento de la expresión de PDGF y su unión con el receptor PDGFR- $\beta$  en las células parietales, que favorezcan la disminución de Gas1 en la cápsula de Bowman.

Estudios recientes encontraron una subpoblación de células progenitoras parietales NCAM<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman, con un alto potencial de diferenciación a podocitos. En este estudio se observó que durante las primeras etapas de la diabetes, la expresión de NCAM aumentó gradualmente en las células de la cápsula de Bowman. Estos resultados sugieren que en la cápsula de Bowman existen células progenitoras renales. También se analizó la expresión de otros marcadores de células progenitoras como SIX1/2 y CD24 (185), que al igual que NCAM, mostraron una expresión elevada durante las primeras etapas de la diabetes. Estos resultados se relacionan con estudios previos donde se describe que NCAM se expresa en las células progenitoras renales y que modula positivamente la expresión de otros marcadores mesenquimales como SALL1 y SIX1/2 (152,186,187). También hay indicios de que SIX1/2 modula la expresión de CD24 (188). Por lo que al existir un aumento en la expresión de NCAM en las células parietales, es de esperarse que también se observe un aumento de SIX1/2 y de CD24 como sistema de retroalimentación positivo para el mantenimiento de las células progenitoras.

También se observó que las células NCAM<sup>+</sup> de la cápsula de Bowman expresan a Gas1 en las ratas control. No obstante, en las ratas diabéticas la expresión de Gas1 disminuye en la cápsula de Bowman y NCAM aumenta considerablemente en esta estructura. Previamente, se describió que la expresión de Gas1 promueve un estado quiescente en las células NIH/3T3, al inhibirse la transición del ciclo celular (189). En este trabajo, también se encontró una correlación negativa entre la expresión de Gas1 y Ki67 (marcador de proliferación celular) en las células progenitoras NCAM<sup>+</sup>, sugiriendo que Gas1 modula negativamente la proliferación. Es posible que la expresión de Gas1 en las células progenitoras de la cápsula de Bowman favorezca un estado quiescente o inactivo, y la disminución de Gas1 en la diabetes, induzca que las células progenitoras se activen estimulando su capacidad de auto-renovación y diferenciación y con ellos el aumento de marcadores específicos como NCAM, CD24, SIX1/2 y de marcadores de proliferación como Ki67 y PCNA, por lo que se propone que Gas1 tiene un papel importante en la activación y/o proliferación de las células progenitoras en la cápsula de Bowman en etapas tempranas de la diabetes (**Figura 50**).



**Figura 50. Posible papel de las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman y la proteína Gas1 en la diabetes.** 1 En condiciones normales, el glomérulo posee podocitos en la zona visceral, que son de suma importancia en el proceso de filtración renal. 2 En la zona parietal o cápsula de Bowman, se localizan las células parietales (CLDN2+) y las células progenitoras parietales (NCAM+), que expresan Gas1. 3 Las células progenitoras parietales (NCAM+/Gas1+), pueden estar en un estado inactivo o quiescente. 4 En la diabetes o en las condiciones de hiperglucemia, existe una pérdida importante de podocitos (podocitopenia). 5 Ante esta pérdida, es posible que las células progenitoras parietales se activen, tomando como señal de instrucción la disminución de la expresión de Gas1. 6 Una vez que las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman, se activan, inician un proceso de reprogramación embrionaria (adquiriendo marcadores mesénquimales como PAX2), para después iniciar su proceso de diferenciación celular (células azules). 7 Una vez que las células progenitoras parietales han adquirido los marcadores específicos de podocito (WT1), se denominan como podocitos parietales. 8 Posteriormente, los podocitos parietales inician su migración desde la zona parietal a la zona visceral para compensar a los podocitos que se han perdido. Sugiriendo que las células progenitoras parietales de la cápsula de Bowman son células precursoras de podocitos y que la expresión Gas1, puede favorecer el switch quiescente-activo de las células progenitoras, proponiendo un mecanismo de regeneración de podocitos en las etapas tempranas de la nefropatía diabética. Células mesangiales (CM), células parietales (CEP) y células progenitoras parietales (CPP).

Durante la nefropatía diabética existe una pérdida importante de podocitos, que es un punto clave en la evolución del daño renal (90). En condiciones normales, los podocitos tienen una capacidad muy limitada para dividirse *in situ* (86). Una interrogante que ha surgido es ¿Cómo se pueden renovar los podocitos si muestran una nula proliferación celular? Hasta el momento se ha considerado como un mecanismo potencial de regeneración de podocitos, la migración de células progenitoras de la médula ósea a través del torrente sanguíneo al riñón (190). En este estudio identificamos una población de células progenitoras parietales NCAM<sup>+</sup>/Gas1<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman en condiciones normales y un aumento de células NCAM<sup>+</sup> en daño renal inducido por diabetes, aunque con una considerable disminución de Gas1. Para explorar si estas células progenitoras NCAM<sup>+</sup> pueden diferenciarse a podocitos, se analizó la expresión del marcador específico de podocitos WT1 en la cápsula de Bowman. Se encontró que en las ratas control existen escasas células NCAM<sup>+</sup>/WT1<sup>+</sup>, pero en las ratas diabéticas donde se observó una disminución gradual de Gas1, el número de células NCAM<sup>+</sup>/WT1<sup>+</sup> aumentó significativamente. Esto sugiere que la diabetes favorece la disminución de la expresión de Gas1, promoviendo así la diferenciación de las células progenitoras a podocitos en la cápsula de Bowman. Todos estos resultados se relacionan con estudios previos, donde se muestra que las células parietales expresan marcadores de podocito (sinaptopodina, podocalixina, podocina, WT1) en daño renal (191,192). Un estudio reciente muestra que en biopsias de tejido renal humano, existe una disminución progresiva de podocitos en las primeras etapas de diabetes, acompañado de un aumento de marcadores de podocitos en las células de la cápsula de Bowman. Sugiriendo que las células parietales de la cápsula de Bowman podrían, hasta cierto punto, regenerar a los podocitos (193).

La nefrina y la dendrina son proteínas específicas de los podocitos, son parte del diafragma en hendidura, que es una estructura crucial en el proceso de filtración renal (194). Con el fin de explorar la condición de los podocitos en las primeras etapas de daño renal inducido por diabetes, se analizó la expresión de la dendrina y la nefrina por inmunofluorescencia y western blot. Se encontró que la expresión de ambas proteínas disminuyó durante los primeros 7 y 14 días de diabetes, mientras que a los

21 días la expresión de nefrina y dendrina se restableció. Estos resultados concuerdan con la estimación de la densidad de podocitos, donde se encontró una disminución significativa de podocitos en la condición diabética de 7 días. Sin embargo, a los 14 días de diabetes, se observó un aumento de la densidad de podocitos en comparación con el día 7, pero a los 21 días de diabetes la densidad de podocitos se restauró completamente. Estos resultados sugieren que durante los primeros 7 días de diabetes existe una pérdida de podocitos inducida por la hiperglucemia, es posible que en el día 14 y 21 de diabetes, las células progenitoras que se han diferenciado a podocitos, migren de la cápsula de Bowman a la parte visceral del glomérulo, para compensar la pérdida de podocitos y por esto se observe la recuperación de la expresión de nefrina y dendrina, así como de la densidad de podocitos. Todo esto como un mecanismo de regeneración de podocitos inducido en las primeras etapas de la diabetes.

Por otro lado, aunque los resultados de la estimación de podocitos y el análisis de la expresión de nefrina y dendrina, sugieren que en la condición diabética de 21 días existe una recuperación de podocitos, esto no se ve reflejado en las pruebas de función renal (depuración de creatinina y proteinuria). Es importante mencionar que aunque el diafragma en hendidura que forman los podocitos es fundamental en la filtración renal, no es la única estructura implicada en este proceso. En la filtración renal también intervienen las células endoteliales de los capilares intraglomerulares y la matriz extracelular de las células mesangiales. Estudios previos revelan que en condiciones de hiperglucemia, las células endoteliales presentan una alta actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y como resultado un aumento de especies reactivas de oxígeno que activan cascadas de respuestas inflamatorias y profibróticas que dañan la morfología y función endotelial (137,140,195,196). También durante las etapas tempranas de la diabetes existe un aumento en la expansión de la matriz extracelular mesangial (colágeno tipo I, IV y fibrinectina) por aumento de la vía JAK/STAT que a su vez induce estrés oxidante, fibrosis y apoptosis (197,198). Con todos estos antecedentes, es posible que en las etapas tempranas de la diabetes exista un daño endotelial y mesangial que impidan el restablecimiento de la función renal total o parcial, aun existiendo un mecanismo de regeneración de podocitos activo.

En este trabajo también se analizó la expresión de Gas1 en los podocitos, en el túbulo proximal y en la nefrona distal. Se encontró que las células del túbulo proximal no expresan Gas1 ni en condiciones normales ni en la diabetes. Estos hallazgos son interesantes porque se ha descubierto que Gas1 es una proteína que arresta la proliferación celular. Las células del túbulo proximal tienen una alta tasa de proliferación en condiciones basales (199) y que aumenta en el daño renal por diabetes experimental e isquemia (200,201), es posible que la expresión de Gas1 no sea imprescindible en el túbulo proximal, sí se considera a Gas1 como inhibidor endógeno de la proliferación. Por otra parte, es importante mencionar que las células del túbulo proximal poseen una subpoblación de células dispersas que expresan CD24, encargadas de la repoblación celular después del daño renal (p. ej. necrosis tubular aguda y obstrucción ureteral unilateral) y aunque poseen marcadores de células progenitoras, se consideran células tubulares transitoriamente desdiferenciadas involucradas en la regeneración (202). Previamente en este trabajo, se encontró co-expresión de Gas1 y de marcadores de células progenitora (NCAM y CD24) en las células parietales de la cápsula de Bowman, en las células del túbulo distal y en las células principales del túbulo colector. Esto podría significar que quizás las células transitorias del túbulo proximal pueden expresar a Gas1 en otros modelos de daño renal que comprometan fuertemente la fisiología del túbulo proximal o en etapas más avanzadas de la diabetes.

Van Roeyen *et al.* (2013) describieron la expresión de Gas1 en cultivos celulares de podocitos inmortalizados. Para confirmar estos hallazgos, se analizó mediante microscopía confocal, la expresión de Gas1 y de nefrina en el tejido renal de ratas sanas y ratas diabéticas. No se observó co-localización de Gas1 y nefrina en las ratas sanas y diabéticas, sugiriendo que los podocitos no expresan Gas1 (126). La nefrina es una proteína específica del diafragma de hendidura de los podocitos (203), por lo que al no co-localizar con Gas1, podría indicar que los pedicelos (cuerpos secundarios) de los podocitos que forman el diafragma en hendidura no expresan a Gas1 y que posiblemente, la expresión de Gas1 esté localizada en el cuerpo principal

de los podocitos, concordando con el resultado de Van Roeyen. Sin embargo, existe una gran controversia sobre los estudios en cultivos de podocitos, ya que se ha descrito que no mantienen su morfología característica, hay una falta de expresión de marcadores específicos y una alta similaridad a las células precursoras de podocitos, definiendo a los podocitos en cultivo como podocitos inmaduros (desdiferenciados) (204). Por lo que los hallazgos previos, pueden ser contradictorios con los descritos en este trabajo por la naturaleza de los estudios realizados.

Posteriormente, se decidió analizar la expresión de Gas1 en la nefrona distal, principalmente en las células del túbulo distal y en el túbulo colector. Se encontró que las células principales del túbulo colector expresan Gas1 en condiciones normales y en la diabetes. En estas células, la expresión de Gas1 no solo se encontró en la membrana celular, sino también en el citoplasma en las ratas sanas y diabéticas. Estos resultados son interesantes ya que Gas1 es una proteína de membrana extracelular con un ancla-GPI (116,205). La expresión citoplasmática de Gas1 podría estar asociada a las modificaciones co-traduccionales que sufre Gas1 antes de alcanzar su forma madura en el citoplasma (118) o con la forma soluble que se ha descrito previamente (130,206,207).

Hasta ahora, la expresión de Gas1 se ha descrito en el glomérulo, específicamente en las células mesangiales y en las células parietales de la cápsula de Bowman. La expresión de Gas1 en el túbulo colector es un resultado interesante, ya que los túbulos colectores y las células glomerulares poseen linajes celulares diferentes, es decir, provienen de distintos precursores embrionarios. Las células glomerulares derivan de las células progenitoras de la mesénquima metanéfrica y los túbulos colectores de la yema ureteral (5,208,209). Se ha descrito que Gas1 se expresa durante la nefrogénesis en la mesénquima metanéfrica pero no en la yema ureteral (129). Considerando esto, se tenía la hipótesis de que sólo las células glomerulares expresarían Gas1. Desde otra perspectiva, las células principales maduras aparecen en los túbulos colectores en días postnatales y posiblemente también la expresión de Gas1. Un estudio reciente demostró que el factor de transcripción Elf5 es un marcador

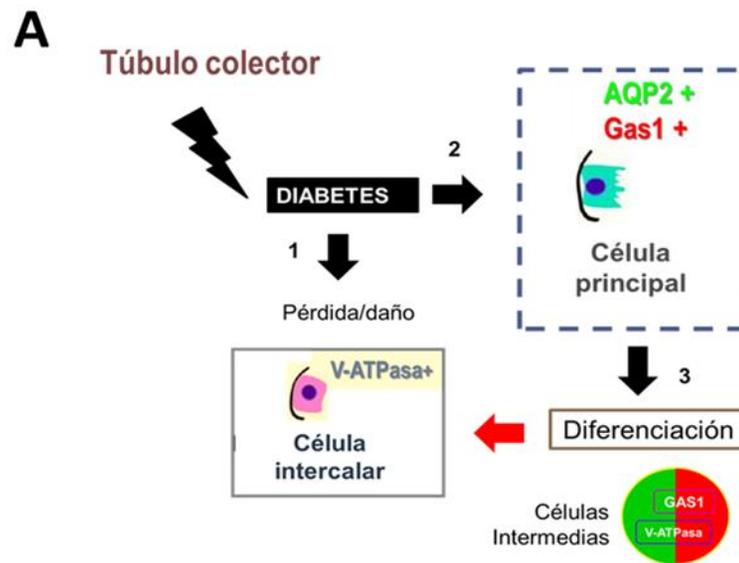
temprano de células principales que contribuye a la expresión de los genes específicos del linaje celular, por lo tanto, es posible que este factor de transcripción tenga un papel importante en la expresión específica de Gas1 en las células principales en los túbulos colectores maduros (210,211).

Actualmente, se desconoce la función de Gas1 en el túbulo colector. Estudios previos en riñón asocian la expresión de Gas1 con la inhibición endógena de la proliferación en células glomerulares (130). Los resultados indican que las células principales expresan tanto Gas1 como marcadores de células progenitoras (CD24<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>). Es probable que Gas1 tenga un papel en la diferenciación y el mantenimiento de las células principales progenitoras del túbulo colector como se describió anteriormente en las primeras etapas de la nefrogénesis, o en las células parietales progenitoras de la cápsula de Bowman y como se ha propuesto durante el desarrollo de la corteza y el giro dentado del cerebro. (143,146). También se describió el papel de Gas1 en la viabilidad celular, a través de la regulación positiva de la proteína cinasa 1B de doble especificidad regulada por la fosforilación de tirosina (por sus siglas en inglés Dyrk1B) en fibroblastos de embriones de ratón (212). Hallazgos recientes han encontrado expresión de fosfopeptidos de Dyrk1B en fracciones nucleares, demostrando la expresión de Dyrk1B en el túbulo colector, pero su función sigue siendo desconocida (213). Estos hallazgos podrían sugerir que la expresión de Gas1 en las células principales podría estar asociada con un mecanismo de protección en la diabetes

Recientemente, se encontró una subpoblación de células progenitoras mesenquimales (Hoxb7<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>) en el túbulo colector de ratón adulto, que muestran un fenotipo de células principales AQP2<sup>+</sup> (160). También se sabe que las células principales se diferencian a células intercaladas cuando se elimina a la metiltransferasa DOT1L o después de la depleción de K<sup>+</sup>, lo que sugiere un papel potencial de las células principales como células progenitoras (160,214,215). En este trabajo se describió que las células principales AQP2<sup>+</sup> aparte de expresar específicamente a Gas1, también expresan marcadores de células progenitoras como CD24<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> *in vivo* en

condiciones normales y en diabetes. Interesantemente, se observó una población de células intermedias en la condición diabética, estas células expresan a Gas1 y al marcador de células intercalares V-ATPasa. Esto sugiere que en las primeras etapas de la diabetes, donde existe una depleción de células intercaladas, las células intermedias que se observan quizás sean un paso intermedio en el proceso de diferenciación de las células principales a células intercaladas, como un mecanismo de regeneración (**Figura 51**).

Estudios previos apoyan la hipótesis de que las células principales e intercaladas se diferencian de un precursor epitelial común que posee una alta tasa de potencialidad celular y que expresa marcadores de célula principal y células intercalares (Foxi1<sup>-</sup>/AQP2<sup>+</sup>/CAII<sup>+</sup>) (215). Probablemente, las células principales AQP2<sup>+</sup> tengan un papel bifuncional en el túbulo colector: uno como células epiteliales encargadas del balance hídrico y del transporte de Na<sup>+</sup> y otra como células progenitoras de las células intercaladas con un grado de potencialidad intermedio que las puede definir como células precursoras unidireccionales. Por otro lado, es posible que la diabetes pueda inducir la pérdida o daño de células intercaladas a través del proceso de transición epitelio-mesenquima (TEM) (216–218) y las células intermedias (Gas1<sup>+</sup>/V-ATPasa<sup>+</sup>) que se observaron sean el resultado de un paso intermedio en la TEM.

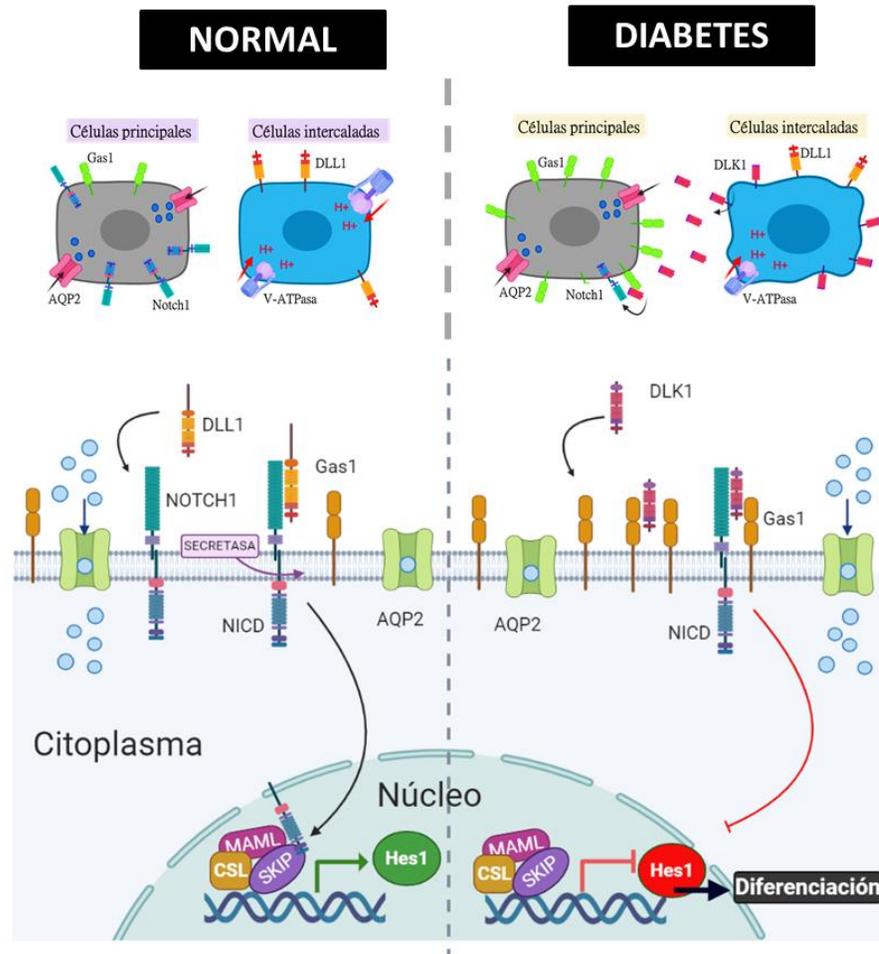


**Figura 51. Posible mecanismo de regeneración de células intercalares V-ATPasa<sup>+</sup> en el túbulo colector.** Esquema representativo. Recientemente se ha descrito el alto grado de plasticidad y potencialidad de las células principales AQP2<sup>+</sup> del túbulo colector para diferenciarse a células intercaladas en diversos modelos de daño renal. **1.** En las primeras etapas de la diabetes, se observó una disminución de células V-ATPasa<sup>+</sup>, sugiriendo que existe una pérdida de células intercaladas en el túbulo colector. **2.** Es posible que frente a esta pérdida, las células principales AQP2<sup>+</sup> que también expresan específicamente a Gas1, comiencen un proceso de diferenciación a células intercaladas. **3.** Probablemente las células con expresión de marcadores de célula Gas1<sup>+</sup>/V-ATPasa<sup>+</sup>, son células principales Gas1<sup>+</sup> en un paso intermedio en su proceso de diferenciación a células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup>.

Recientemente, se encontró que la activación de la vía de Notch es necesaria para el mantenimiento del fenotipo de células principales AQP2<sup>+</sup> en los túbulos colectores en riñones maduros. Se encontró que el receptor Notch1 se expresa específicamente en las células principales y que las células intercaladas producen al ligando específico tipo-Delta 1 (DLL1). Al producirse la interacción ligando-receptor se libera el dominio intracelular del receptor Notch1 (NICD), que se trasloca al núcleo donde forma un complejo de transcripción al unirse con otras proteínas como MAML, CBF1/RBP y SKIP. Esto favorece la expresión del factor HES1, el cual inhibe la expresión del factor transcripcional Foxi1 y la activación de ELF5 en el núcleo, induciendo que las células adquieran el fenotipo de célula principal mediante la expresión de marcadores específicos como AQP2, AQP4, Myh10. Al bloquear la vía

de Notch por inactivación de su blanco genético HES1 en las células principales, se activa el factor de transcripción Foxl1 favoreciendo que las células principales adquieran marcadores específicos de células intercaladas como V-ATPasa y ACII (anhidrasa carbónica II), y pierdan su fenotipo de célula principal. Estos resultados demuestran que la inactivación o bloqueo de la vía de Notch induce la diferenciación de células principales a células intercaladas en riñones maduros (148).

En este trabajo se encontró que Gas1 puede tener una interacción directa con el ligando de la vía no canónica de Notch, DLK1. Con todos estos resultados y antecedentes, se propone que ante la pérdida potencial de células intercaladas en la diabetes, se desarrolle un mecanismo de regeneración/reparación, donde las células intercaladas puedan expresar al ligando DLK1 en su forma soluble para que se una al receptor Notch1 en las células principales e inhibir así a la vía de Notch en estas células, favoreciendo su diferenciación a células intercaladas. Algo interesante es que el ligando de la vía canónica DLL1 se une y activa al receptor Notch1 a través de su dominio extracelular DSL; debido a que el ligando de la vía no canónica DLK1 carece de dominios DSL, es posible que la interacción DLK1-Gas1 sea necesaria para poder favorecer la unión del ligando DLK1 con el receptor Notch1 a través de sus dominios EGF. Por tanto, se propone a Gas1 como una proteína presentadora de ligando DLK1 o un correceptor de Notch1, teniendo un papel importante en la inactivación de la vía de Notch y la diferenciación celular. Gas1 podría ser un nuevo componente de modulación negativa de la cascada de señalización de Notch (**Figura 52**).



**Figura 52. Participación de Gas1 en la vía de Notch y la diferenciación de células principales a células intercaladas.** En condiciones normales, las células principales AQP2<sup>+</sup> expresan a Gas1 y al receptor Notch1 y las células intercaladas expresan al ligando DLL1. El ligando DLK1 se une al receptor Notch1 y activa su vía intracelular, que consiste en el liberación del dominio intracelular del receptor Notch1 (NICD) por un complejo de  $\alpha$ -secretasas. El NICD ya en el citoplasma, se trasloca al núcleo celular. En el núcleo celular, el NICD se une a las proteínas mastermid-1 (MAML), CBF1/RBP-J (CSL) y SKIP, formando un complejo de transcripción y activando la expresión del factor HES1 que reprime la expresión de FOXIL1 y favorece la expresión de Elf5 y consecuentemente la expresión de marcadores específicos de la célula principal como AQP2, manteniendo así el fenotipo de célula principal. En la condición diabética, se encontró un aumento significativo de Gas1 en las células principales y se observó una pérdida y/o daño de células intercaladas V-ATPasa<sup>+</sup>. Se propone que, como mecanismo de regeneración/reparración, potencialmente las células intercaladas expresen al ligando DLK1 en su forma soluble, para que pueda interactuar con el receptor Notch1 en las células principales. Es posible que para que exista la unión del DLK1 con el receptor Notch1 sea necesaria la interacción de DLK1-Gas1, proponiendo a Gas1 como una proteína presentadoras de ligando o un posible correceptor de Notch1. Al unirse el ligando DLK1 con Notch1 se inactiva la cascada de señalización intracelular, bloqueando la expresión del factor de transcripción HES1 e induciendo que las células principales inicien su proceso de diferenciación a células intercaladas.

Finalmente también se describió la expresión de Gas1 en las células del túbulo distal. Específicamente, los túbulos distales derivan de las células progenitoras SIX2<sup>+</sup> en el mesénquima metanéfrico (187). Estudios anteriores han demostrado el papel de Gas1 en el mantenimiento de las células progenitoras SIX2<sup>+</sup> durante la nefrogénesis. Es posible que las células del túbulo colector derivadas de los precursores Gas1<sup>+</sup>/SIX2<sup>+</sup> puedan mantener ciertos marcadores como Gas1 en su estado diferenciado o maduro. También se observó la co-expresión de Gas1 con el marcador de células progenitoras CD24, este resultado es interesante, ya que en los túbulos colectores, las células principales Gas1<sup>+</sup> también expresan marcadores de células progenitoras (CD24/CD133) y esto se relaciona con los resultados anteriores en la cápsula de Bowman, donde se observó la expresión de Gas1 en células parietales progenitoras NCAM<sup>+</sup>. Esto proporciona una fuerte evidencia de que Gas1 podría tener una nueva función, involucrada en el mantenimiento de células progenitoras en riñones maduros, y cuya expresión cambia de forma evidente como respuesta renal inicial a la diabetes.

Hasta ahora, la expresión de Gas1 en las células de la cápsula de Bowman, en el túbulo distal y en los túbulos colectores ha sido diferente en condiciones de hiperglucemia, pero es importante mencionar que Gas1 es una proteína pleiotrópica y que el riñón posee cerca de 30 diferentes tipos de células con un microambiente fisiológico variable a lo largo de la nefrona (2), por lo que es de esperar que en los diferentes segmentos de la nefrona las células renales muestren una expresión y función distinta de Gas1.

## IX. Conclusión

En este estudio se describió por primera vez la expresión de Gas1 en las células de la cápsula de Bowman y en la nefrona distal durante la diabetes. La disminución de la expresión de Gas1 en daño renal durante las etapas tempranas de la diabetes favorece la activación y/o proliferación de las células parietales progenitoras de la cápsula de Bowman, así como su diferenciación a podocitos. De aquí se infiere que en etapas tempranas de la nefropatía diabética existen mecanismos de regeneración de podocitos que pueden retardar la evolución de la patología renal y en donde la proteína Gas1 tiene un papel importante.

Este es el primer trabajo hasta donde se conoce que describe la expresión de Gas1 en el túbulo colector y en el que se identificó a Gas1 como un nuevo marcador de células principales. Los resultados obtenidos apoyan la evidencia de la capacidad de las células principales para diferenciarse a células intercaladas y actuar como células progenitoras renales, sugiriendo que en las etapas tempranas de la diabetes existe una pérdida importante de células intercaladas y la presencia de un mecanismo de regeneración/reparación por parte de las células principales donde posiblemente Gas1 tenga un papel significativo en el proceso de diferenciación al intervenir en la vía de Notch. Los resultados de este trabajo proporcionan información importante para futuras investigaciones que aborden la función de Gas1 en las células principales y su papel en la respuesta renal a la diabetes.

Este estudio descriptivo de la expresión de Gas1 en los diferentes segmentos de la nefrona, muestra un panorama amplio sobre la presencia de Gas1 en el riñón antes desconocido y brinda un enfoque diverso en la funcionalidad de Gas1, que ahora no sólo involucra el arresto de la proliferación celular, sino su posible participación en procesos más complejos como el mantenimiento y diferenciación celular y la respuesta al daño. Este estudio representa un avance representativo en el conocimiento de la proteína Gas1.

## X. Perspectivas

1. Realizar estudios de retención de bromodesoxiuridina (BrdU) para confirmar la subpoblación de células progenitoras Gas1<sup>+</sup> en la cápsula de Bowman.
2. Describir el mecanismo molecular que favorece la disminución de Gas1 en las células de la cápsula de Bowman en la diabetes.
3. Describir los mecanismos moleculares que intervienen en la activación y diferenciación de células de la cápsula de Bowman a podocitos y la relación con Gas1.
4. Analizar la expresión de Gas1 en el túbulo proximal en etapas avanzadas de la nefropatía diabética y su relación con los mecanismos de reparación asociados a células “scattered”.
5. Estudiar el curso temporal de la expresión específica de Gas1 en las células principales del túbulo colector.
6. Estudiar la función de Gas1 en el mantenimiento de células principales del túbulo colector. Analizar si Gas1 tiene un efecto positivo en la viabilidad de células principales por la expresión positiva de Dyrk1B.
7. Describir el papel de Gas1 en la diferenciación de células principales a células intercaladas a través de su intervención en la vía no canónica de Notch.
8. Analizar si existe la expresión de Gas1 en su forma soluble y su posible efecto paracrino y/o autocrino en el túbulo colector.
9. Analizar los mecanismos de protección y reparación vía PAX2 en las células del túbulo colector durante las primeras etapas de la diabetes.
10. Analizar la expresión de Gas1 en el asa de Henle y en las células endoteliales renales.

**XI. Bibliografía**

1. Matthew A. Mulvey, David J. Klumpp AES. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. 2017; 92: 337-340.
2. Nielsen S, Kwon T-H, Fenton RA, Prætorious J. Anatomy of the kidney. In: Brenner and Rector's the kidney. 2012. 31–93.
3. Short KM, Combes AN, Lefevre J, Ju AL, Georgas KM, Lamberton T, et al. Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney. *Dev Cell*. 2014;29(2):188–202.
4. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: Implications for health and disease. *Pediatric Nephrology*. 2011. 1529–33.
5. McMahon AP. Development of the mammalian kidney. *Current topics in developmental biology*. Elsevier. 2016, 117(1) 31-64.
6. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209(2):199–210.
7. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1461–9.
8. Murray I, Paolini MA. Histology, kidney and glomerulus. *StatPearls*. 2020.
9. Jefferson J, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*. 2008;74(1):22–36.
10. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(12):3005–15.
11. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol*. 2018;47(suppl 1):3–13.
12. Holthöfer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: Lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(8):2124–8.
13. Grahame F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm - From a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(10):587–98.
14. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, et al. Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *PNAS*. 1999;96(14):7962–7.
15. Welsh GI, Saleem MA. Nephlin - Signature molecule of the glomerular podocyte? *Journal of Pathology*. 2010; 220: 328–337.
16. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura KI, et al. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci Rep*. 2015;5:1-7.
17. Ohse T, Pippin JW, Chang AM, Krofft RD, Miner JH, Vaughan MR, et al. The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney International*. 2009; 76: 1225–38.
18. Gadre A, Briner W, O'leary M. A scanning electron microscope study of the human cervical lymph node. *Acta Otolaryngol*. 1994;114(1):87–90.
19. Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(4):875–86.
20. Ohse T, Pippin JW, Vaughan MR, Brinkkoetter PT, Krofft RD, Shankland SJ. Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal

- epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(10):1879–90.
21. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1255–63.
  22. Cho EA, Patterson LT, Brookhiser WT, Mah S, Kintner C, Dressler GR. Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development*. 1998;125(5):803–12.
  23. Igarashi P. Following the expression of a kidney-specific gene from early development to adulthood. *Nephron. Experimental nephrology*. 2003;94:1-6.
  24. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res*. 1992;270(1):37–45.
  25. Webber WA, Blackbourn J. The permeability of the parietal layer of Bowman's capsule. *Lab Investig*. 1971;25(5):367–73.
  26. Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, Alpers CE, et al. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(6):F1566–74.
  27. Yoshida S, Nagase M, Shibata S, Fujita T. Podocyte injury induced by albumin overload in vivo and in vitro: Involvement of TGF-beta and p38 MAPK. *Nephron - Exp Nephrol*. 2008;108(3).
  28. Webber WA, Wong WT. The function of the basal filaments in the parietal layer of Bowman's capsule. *Can J Physiol Pharmacol*. 1973;51(2):53–60.
  29. Yoder BK. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1381-8.
  30. Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(2):333–43.
  31. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(9):2443–56.
  32. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(2):322–32.
  33. Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, Alpers CE, et al. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;297(6).
  34. WHO. Definition , Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of. *World Health*. 1999;15(7):539–53.
  35. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. *Endotext*. 2000.
  36. Liu M, Wright J, Guo H, Xiong Y, Arvan P. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam Horm*. 2014;95:35-62.
  37. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8152–61.
  38. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(SUPPL. 1).

39. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137–88.
40. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(8): 444–52.
41. Papadopoulou-Marketou N, Paschou SA, Marketos N, Adamidi S, Adamidis S, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Minerva Med.* 2018;109(3):218–28.
42. Mogensen CE. Stages of diabetic nephropathy. In: *Diabetic Renal-Retinal Syndrome.* 1998;13–8.
43. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: The tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(1):F8-15.
44. Drummond K, Mauer M. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(5):1580–7.
45. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813–20.
46. Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:395–423.
47. Quest AFG, Ghosh S, Xie WQ, Bell RM. DAG second messengers: Molecular switches and growth control. *Adv Exp Med Biol.* 1997;400(A):297–303.
48. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S13-8.
49. Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:S233-6
50. Ho ECM, Lam KSL, Yuk SC, Yip JCW, Arvindakshan M, Yamagishi SI, et al. Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes.* 2006;55(7):1946–53.
51. Schleicher ED, Bierhaus A, Häring HU, Nawroth PP, Lehmann R. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. *Contrib Nephrol.* 2001;131:1–9.
52. Jakuš V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.* 2004;53(2):131-42.
53. Thallas-Bonke V, Lindschau C, Rizkalla B, Bach LA, Boner G, Meier M, et al. Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT-711 via a protein kinase C- $\alpha$  - Dependent pathway. *Diabetes.* 2004;53(11):2921–30.
54. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(3):F905-11
55. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes and Metabolism.* 2001;27(5 Pt 1):535-42
56. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.*

- 2000;11(9):1656–66.
57. D'Agati V, Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: Roles in podocytes and endothelial cells. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(1):50–6.
  58. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998;47(6):859–66.
  59. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes.* 1994;43(9):1122–9.
  60. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC  $\beta$  inhibitor. *Science.* 1996;272(5262):728–31.
  61. Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest.* 1994;93(1):311–20.
  62. Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, et al. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC  $\beta$  inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.* 2000;14(3):439–47.
  63. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C  $\beta$  isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- $\beta$ , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest.* 1997;100(1):115–26.
  64. Kelly DJ, Zhang Y, Hepper C, Gow RM, Jaworski K, Kemp BE, et al. Protein kinase C  $\beta$  inhibition attenuates the progression of experimental diabetic nephropathy in the presence of continued hypertension. *Diabetes.* 2003;52(2):512–8.
  65. Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes.* 1997;46(9):1497–503.
  66. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Vriese AS, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2003;18(8):1427–30.
  67. Glogowski EA, Tsiani E, Zhou X, Fantus IG, Whiteside C. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int.* 1999;55(2):486–99.
  68. Pieper GM, Riaz-ul-Haq. Activation of nuclear factor- $\kappa$ b in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30(4):528–32.
  69. Yerneni KK V., Bai W, Khan B V., Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* 1999;48(4):855–64.
  70. Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes.* 1993;42(1):118–26.

71. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1994;46(2):430–42.
72. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2007;72:S49-53.
73. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-5.
74. Djordjević VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004;237:57–89.
75. Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(12):657–684.
76. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(12):2032–45.
77. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99(2):342–8.
78. Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, et al. Podocyte hypertrophy, “adaptation” and “decompensation” associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: Prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2953–66.
79. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2941–52.
80. Lin JS, Susztak K. Podocytes: The weakest link in diabetic kidney disease? *Curr Diab Rep.* 2016;16(5): 45.
81. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83(1):253-307
82. Regoli M, Bendayan M. Alterations in the expression of the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1997;40(1):15–22.
83. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci.* 2000;67(19):2345–53.
84. Kitsiou P V., Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B, et al. Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2003;284(4 53-4).
85. Han SY, Kang YS, Jee YH, Han KH, Cha DR, Kang SW, et al. High glucose and angiotensin II increase  $\beta$ 1 integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes. *Cell Tissue Res.* 2006;323(2):321–32.
86. Griffin S V, Petermann AT, Durvasula R V, Shankland SJ. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(Suppl 6):8-13.
87. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(9):1379–83.

88. Wang P, Li M, Liu Q, Chen B, Ji Z. Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases. *Exp Biol Med.* 2015;240(2):169–74.
89. Kravets I, Mallipattu SK. The role of podocytes and podocyte-associated biomarkers in diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. *J Endocr Soc.* 2020;4(4):1-11.
90. Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, Kim J-J, Yoo T-H, Ryu D-R, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2007;(106):S36–42.
91. Schiffer M, Bitzer M, Roberts ISD, Kopp JB, Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *J Clin Invest.* 2001;108(6):807–16.
92. Durvasula R V., Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int.* 2004;65(1):30–9.
93. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2006;55:225–33.
94. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006;69(12):2131–47.
95. Shankland SJ, Pippin JW, Couser WG. Complement (C5b-9) induces glomerular epithelial cell DNA synthesis but not proliferation in vitro. *Kidney Int.* 1999;56(2):538–48.
96. Shankland SJ, Floege J, Thomas SE, Nangaku M, Hugo C, Pippin J, et al. Cyclin kinase inhibitors are increased during experimental membranous nephropathy: potential role in limiting glomerular epithelial cell proliferation in vivo. *Kidney Int.* 1997;52(2):404–13.
97. Wolf G, Schanze A, Stahl RAK, Shankland SJ, Amann K. p27Kip1 knockout mice are protected from diabetic nephropathy: evidence for p27Kip1 haplotype insufficiency. *Kidney Int.* 2005;68(4):1583–9.
98. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Cell-cycle regulatory proteins in podocyte cell in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int.* 2003;63(4):1374–81.
99. Hiromura K, Haseley LA, Zhang P, Monkawa T, Durvasula R, Petermann AT, et al. Podocyte expression of the CDK-inhibitor p57 during development and disease. *Kidney Int.* 2001;60(6):2235–46.
100. Combs HL, Shankland SJ, Setzer S V., Hudkins KL, Alpers CE. Expression of the cyclin kinase inhibitor, p27(kip1), in developing and mature human kidney. *Kidney Int.* 1998;53(4):892–6.
101. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - Insights from animal models. *Kidney Int.* 2005;67(2):404–19.
102. Chen YM, Miner JH. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. *Transl Res.* 2012;160(4):291–7.
103. Liapis H, Romagnani P, Anders HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: Mitotic catastrophe. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1364–74.
104. Wanner N, Hartleben B, Herbach N, Goedel M, Stickel N, Zeiser R, et al. Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(4):707–16.
105. Macconi D, Sangalli F, Bonomelli M, Conti S, Condorelli L, Gagliardini E, et

- al. Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ace inhibition. *Am J Pathol.* 2009;174(3):797–807.
106. Pichaiwong W, Hudkins KL, Wietecha T, Nguyen TQ, Tachaudomdach C, Li W, et al. Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(7):1088–102.
107. Eng DG, Sunseri MW, Kaverina N V., Roeder SS, Pippin JW, Shankland SJ. Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2015;88(5):999–1012.
108. Benigni A, Morigi M, Rizzo P, Gagliardini E, Rota C, Abbate M, et al. Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *Am J Pathol.* 2011;179(2):628–38.
109. Lasagni L, Romagnani P. Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(10):1612–9.
110. Romagnani P, Remuzzi G. Renal progenitors in non-diabetic and diabetic nephropathies. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(1):13–20.
111. Lazzeri E, Peired AJ, Lasagni L, Romagnani P. Retinoids and glomerular regeneration. *Semin Nephrol.* 2014;34(4):429–36.
112. Zhong Y, Wu Y, Liu R, Li Z, Chen Y, Evans T, et al. Novel Retinoic Acid Receptor Alpha Agonists for Treatment of Kidney Disease. *PLoS One.* 2011;6(11):e27945.
113. Lasagni L, Angelotti ML, Ronconi E, Lombardi D, Nardi S, Peired A, et al. Podocyte regeneration driven by renal progenitors determines glomerular disease remission and can be pharmacologically enhanced. *Stem Cell Reports.* 2015;5(2):248–63.
114. Del Sal G, Collavin L, Ruaro ME, Edomi P, Saccone S, Valle GD, et al. Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine gas1 gene. *PNAS.* 1994;91(5):1848–52.
115. Rosti K, Goldman A, Kajander T. Solution structure and biophysical characterization of the multifaceted signalling effector protein growth arrest specific-1. *BMC Biochem.* 2015;16:8.
116. Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett.* 2000;481(2):152–8.
117. Domínguez-monzón G, González-ramírez R, Segovia J. Molecular mechanisms of action of Gas1 and its possible therapeutic applications. *Curr Signal Transduct Ther.* 2011;6(1):106–12.
118. Segovia J, Zarco N. Gas1 is a pleiotropic regulator of cellular functions: from embryonic development to molecular actions in cancer gene therapy. *Mini Rev Med Chem.* 2014;14(14):1139–47.
119. Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev.* 2007;21(10):1244–57.
120. Martinelli DC, Fan CM. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev.* 2007;21(10):1231–43.
121. Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M. Is Gas1 a co-receptor for the

- GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(2):72-7.
122. Dominguez-Monzon G, Gonzales-Ramirez R and Segovia J. Molecular mechanisms of action of gas1 and its possible therapeutic applications. *Curr Signal Transduct Ther.* 2011;6(1):106–12.
  123. Wang H, Zhou X, Zhang Y, Zhu H, Zhao L, Fan L, et al. Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer. *FEBS J.* 2012;279(19):3652–64.
  124. Lapouge G, Millon R, Muller D, Abecassis J, Eber M, Bergerat JP, et al. Cisplatin-induced genes as potential markers for thyroid cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2005;62(1)53–64.
  125. Rizzi F, Belloni L, Crafa P, Lazzaretti M, Remondini D, Ferretti S, et al. A novel gene signature for molecular diagnosis of human prostate cancer by RT-qPCR. *PLoS One.* 2008;3(10):e3617.
  126. Jiang Z, Xu Y, Cai S. Down-regulated GAS1 expression correlates with recurrence in stage II and III colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2011;42(3):361–8.
  127. Spagnuolo R, Corada M, Orsenigo F, Zanetta L, Deuschle U, Sandy P, et al. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood.* 2004;103(8):3005–12.
  128. Ren YA, Liu Z, Mullany LK, Fan C-M, Richards JS. Growth arrest specific-1 (Gas1) is a C/EBP target gene that functions in ovulation and corpus luteum formation in mice. *Biol Reprod.* 2016;94(2):44.
  129. Kann M, Bae E, Lenz MO, Li L, Trannguyen B, Schumacher V a, et al. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development.* 2015;142(7):1254–66.
  130. van Roeyen CRC, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayama Y, Fleckenstein S, et al. Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney Int.* 2013;83:251–63.
  131. Zhang L, He S, Guo S, Xie W, Xin R, Yu H, et al. Down-regulation of miR-34a alleviates mesangial proliferation in vitro and glomerular hypertrophy in early diabetic nephropathy mice by targeting Gas1. *J Diabetes Complications.* 2014;28(3):259–64.
  132. Conceição ALG, Da Silva CT, Badial RM, Valsechi MC, Stuqui B, Gonçalves JD, et al. Downregulation of OCLN and GAS1 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2017;37(3):1487–96.
  133. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
  134. Hervey GR. Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature.* 1953;171(4364):1125.
  135. Bautista-Garcia P, Reyes JL, Martin D, Namorado MC, Chavez-Munguia B, Soria-Castro E, et al. Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *AJP Ren Physiol.* 2012;77–87.
  136. Molina-Jijon E, Rodriguez-Muñoz R, Namorado M del C, Bautista-Garcia P, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, et al. All-trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *J Nutr Biochem.* 2015;26(5):441–54.
  137. Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Namorado MDC, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1

- diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med*. 2014;72C:162–75.
138. Reyes JL, Lamas M, Martin D, Namorado MDC, Islas S, Luna J, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int*. 2002;62(2):476–87.
  139. Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, Calderon-Salinas J V., et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol Lett*. 2009;191(2–3):279–88.
  140. Sierra-Mondragon E, Molina-Jijon E, Namorado-Tonix C, Rodríguez-Muñoz R, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL. All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B during initiation of diabetic nephropathy. *J Nutr Biochem*. 2018;60:47–60.
  141. Gonzalez-Mariscal L, Del Carmen Namorado M, Martin D, Sierra G, Reyes JL. The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2391–8.
  142. Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, et al. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int*. 2000;57(6):2386–402.
  143. Estudillo E, Zavala P, Pérez-Sánchez G, Ayala-Sarmiento AE, Segovia J. Gas1 is present in germinal niches of developing dentate gyrus and cortex. *Cell Tissue Res*. 2016;364(2):369–84.
  144. Ayala-Sarmiento AE, Estudillo E, Pérez-Sánchez G, Sierra-Sánchez A, González-Mariscal L, Martínez-Fong D, et al. GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochem Cell Biol*. 2016;146(3):325–36.
  145. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(7–8):518–529.
  146. Luna-Antonio BI, Rodríguez-Muñoz R, Namorado-Tonix C, Vergara P, Segovia J, Reyes JL. Gas1 expression in parietal cells of Bowman's capsule in experimental diabetic nephropathy. *Histochem Cell Biol*. 2017;148(1):33–47.
  147. Naito S, Pippin JW, Shankland SJ. The glomerular parietal epithelial cell's responses are influenced by SM22 alpha levels. *BMC Nephrol*. 2003;15(174):11.
  148. Mukherjee M, deRiso J, Otterpohl K, Ratnayake I, Kota D, Ahrenkiel P, et al. Endogenous notch signaling in adult kidneys maintains segment-specific epithelial cell types of the distal tubules and collecting ducts to ensure water homeostasis. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(1):110–26.
  149. Venkatarreddy M, Wang S, Yang Y, Patel S, Wickman L, Nishizono R, et al. Estimating podocyte number and density using a single histologic section. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(5):1118–29.
  150. Kaverina N V., Kadoya H, Eng DG, Rusiniak ME, Sequeira-Lopez MLS, Gomez RA, et al. Tracking the stochastic fate of cells of the renin lineage after podocyte depletion using multicolor reporters and intravital imaging. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173891.
  151. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet*.

- 2010;375(9722):1310-7.
152. Abbate M, Brown D, Bonventre J V. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol*. 1999;277(3 Pt 2):F454-63.
  153. Dressler GR, Woolf S. Pax2 in development and renal disease. *Int J Dev Biol*. 1999;43(5):463-8.
  154. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet*. 2006;15(2):196-201.
  155. Dominguez-Monzon G, Benitez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(4):305-13.
  156. Sebastian A, Hulter HN, Kurtz I, Maher T, Schambelan M. Disorders of distal nephron function. *Am J Med*. 1982;72(2):289-307.
  157. Kobayashi M, Yasuoka Y, Sato Y, Zhou M, Abe H, Kawahara K, et al. Upregulation of calbindin D28k in the late distal tubules in the potassium-loaded adrenalectomized mouse kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15(3):355-62.
  158. Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PMT, Kohan DE. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):135-46.
  159. Roy A, Al-Bataineh MM, Pastor-Soler NM. Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(2):305-24.
  160. Li J, Ariunbold U, Suhaimi N, Sunn N, Guo J, McMahon JA, et al. Collecting duct-derived cells display mesenchymal stem cell properties and retain selective in vitro and in vivo epithelial capacity. *J Am Soc Nephrol*. 2014;26(1):81-94.
  161. Huang CC, Kuo HM, Wu PC, Cheng SH, Chang TT, Chang YC, et al. Soluble delta-like 1 homolog (DLK1) stimulates angiogenesis through Notch1/Akt/eNOS signaling in endothelial cells. *Angiogenesis*. 2018;21(2):299-312.
  162. Wang Y, Sul HS. Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(14):5421-35.
  163. Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):988-95.
  164. Sánchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, Ruiz-Hidalgo MJ, Monsalve EM, Rivero S, et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(6):1153-64.
  165. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Díaz-Guerra MJM, García-Ramírez JJ, Bonvini E, et al. Dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 2005;303(2):343-59.
  166. Nueda ML, Baladrón V, Sánchez-Solana B, Ballesteros MÁ, Laborda J. The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J Mol Biol*. 2007;367(5):1281-93.
  167. Fukuzawa R, Heathcott RW, Morison IM, Reeve AE. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):145-50.
  168. Ceder JA, Jansson L, Helczynski L, Abrahamsson PA. Delta-like 1 (Dlk-1), a

- novel marker of prostate basal and candidate epithelial stem cells, is downregulated by notch signalling in intermediate/transit amplifying cells of the human prostate. *Eur Urol.* 2008;54(6):1344–53.
169. Yanai H, Nakamura K, Hijioka S, Kamei A, Ikari T, Ishikawa Y, et al. Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J Biochem.* 2010;148(1):85–92.
170. Finn J, Sottoriva K, Pajcini K V., Kitajewski JK, Chen C, Zhang W, et al. Dlk1-mediated temporal regulation of notch signaling is required for differentiation of alveolar type ii to type i cells during repair. *Cell Rep.* 2019;26(11):2942–2954.e5.
171. Zheng W, Brooks BR, Hummer G. Protein conformational transitions explored by mixed elastic network models. *Proteins.* 2007;69(1):43-57.
172. Huang SY, Zou X. An iterative knowledge-based scoring function for protein-protein recognition. *Proteins Struct Funct Genet.* 2008;72(2):557–79.
173. Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang SY. HDOCK: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W365–73.
174. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1731–7.
175. Cabrera JR, Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Mañes S, Naranjo JR, et al. Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors  $\alpha$  and regulates Ret signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14330–9.
176. Campbell RC, Ruggenti P, Remuzzi G. Proteinuria in diabetic nephropathy: treatment and evolution. *Curr Diab Rep.* 2003;3(1534–4827):497–504.
177. Meeme A, Kasozi H. Effect of glycaemic control on glomerular filtration rate in diabetes mellitus patients. *Afr Health Sci.* 2009;9(4):S23-6.
178. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016;9:279-290
179. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(1):27-45
180. Kitsunai H, Makino Y, Sakagami H, Mizumoto K, Yanagimachi T, Atageldiyeva K, et al. High glucose induces platelet-derived growth factor-C via carbohydrate response element-binding protein in glomerular mesangial cells. *Physiol Rep.* 2016;4(6):1–13.
181. Uehara G, Suzuki D, Toyoda M, Umezono T, Sakai H. Glomerular expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, -B chain and PDGF receptor- $\alpha$ , - $\beta$  in human diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2004;8(1):36–42.
182. Langham RG, Kelly DJ, Maguire J, Dowling JP, Gilbert RE, Thomson NM. Over-expression of platelet-derived growth factor in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(7):1392–6.
183. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF. PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int.* 1993;43(2):286–94.
184. Ostendorf T, Boor P, Van Roeyen CRC, Floege J. Platelet-derived growth

- factors (PDGFs) in glomerular and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 2014; 4(1):65-69
185. Challen G a, Martínez G, Davis MJ, Taylor DF, Crowe M, Teasdale RD, et al. Identifying the molecular phenotype of renal progenitor cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2344–57.
  186. Buzhor E, Omer D, Harari-Steinberg O, Dotan Z, Vax E, Pri-Chen S, et al. Reactivation of NCAM1 defines a subpopulation of human adult kidney epithelial cells with clonogenic and stem/progenitor properties. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1621–33.
  187. Kobayashi A, Valerius MT, Mugford JW, Carroll TJ, Self M, Oliver G, et al. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell.* 2008;3(2):169–81.
  188. Ivanova L, Hiatt MJ, Yoder MC, Tarantal AF, Matsell DG. Ontogeny of CD24 in the human kidney. *Kidney Int.* 2010;77(12):1123–31.
  189. Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C. The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell.* 1992;70(4):595–607.
  190. Vigneau C, Zheng F, Polgar K, Wilson PD, Striker G. Stem cells and kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15(3):238–44.
  191. Berger K, Schulte K, Boor P, Kuppe C, van Kuppevelt TH, Floege J, et al. The regenerative potential of parietal epithelial cells in adult mice. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(4):693–705.
  192. Bariety J. Parietal Podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(10):2770–80.
  193. Andeen NK, Nguyen TQ, Steegh F, Hudkins KL, Najafian B, Alpers CE. The phenotypes of podocytes and parietal epithelial cells may overlap in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2015;88(5):1099–107.
  194. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006;69(12):2131-47.
  195. Cheng H, Harris R. Renal endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Hematol Disord Targets.* 2014;14(1):22-33.
  196. Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. *J Diabetes Investig.* 2015;6(1):3-15.
  197. Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. diabetic nephropathy and extracellular matrix. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(12):976-86.
  198. Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius III F. Mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2012;100(2):130–4.
  199. Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, Walch M, Kaissling B, Le Hir M. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(1):C22–8.
  200. Humphreys BD, Czerniak S, DiRocco DP, Hasnain W, Cheema R, Bonventre J V. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(22):9226–31.
  201. Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300(5):R1009–22.
  202. Smeets B, Boor P, Dijkman H, Sharma S V., Jirak P, Mooren F, et al. Proximal

- tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *J Pathol.* 2013;229(5):645–59.
203. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med.* 2007;13(9):396–403.
  204. Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture : past, present, and future. *Kidney Int.* 2007;72(1):26–36.
  205. Ruaro ME, Stebel M, Vatta P, Marzinotto S, Schneider C. Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS Lett.* 2000;481(2):159–63.
  206. López-Ornelas A, Vergara P, Segovia J. Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy.* 2014;16(7):1011–23.
  207. Jiménez A, López-Ornelas A, Estudillo E, González-Mariscal L, González RO, Segovia J. A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Exp Cell Res.* 2014;327(2):307–17.
  208. Little MH. Renal organogenesis. *Organogenesis.* 2011;7(4):229–41.
  209. Little MH. Kidney development in the mammal. In: kidney transplantation, bioengineering, and regeneration: kidney transplantation in the regenerative medicine era. Academic Press. 2017;787–99.
  210. Grassmeyer J, Mukherjee M, deRiso J, Hettinger C, Bailey M, Sinha S, et al. Elf5 is a principal cell lineage specific transcription factor in the kidney that contributes to Aqp2 and Avpr2 gene expression. *Dev Biol.* 2017;424(1):77–89.
  211. Blomqvist SR, Vidarsson H, Fitzgerald S, Johansson BR, Ollerstam A, Brown R, et al. Distal renal tubular acidosis in mice that lack the forkhead transcription factor Foxi1. *J Clin Invest.* 2004;113(11):1560–70.
  212. Pérez-Sánchez G, Jiménez A, Quezada-Ramírez MA, Estudillo E, Ayala-Sarmiento AE, Mendoza-Hernández G, et al. Annexin A1, annexin A2, and dyrk 1B are upregulated during Gas1-induced cell cycle arrest. *J Cell Physiol.* 2018;233(5):4166–82.
  213. Bolger SJ, Hurtado PAG, Hoffert JD, Saeed F, Pisitkun T, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomics in nuclei of vasopressin-sensitive renal collecting duct cells. *Am J Physiol Physiol.* 2012;303(10):C1006–20.
  214. Kim W-Y, Nam SA, Choi A, Kim Y-M, Park SH, Kim YK, et al. Aquaporin 2-labeled cells differentiate to intercalated cells in response to potassium depletion. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(1):17–24.
  215. Wu H, Chen L, Zhou Q, Zhang X, Berger S, Bi J, et al. Aqp2-expressing cells give rise to renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(2):243–52.
  216. Loeffler I, Wolf G. epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy: fact or fiction? *Cells.* 2015;4(4):631–52.
  217. Ivanova L, Butt MJ, Matsell DG. Mesenchymal transition in kidney collecting duct epithelial cells. *Am J Physiol Physiol.* 2008;294(5):F1238–48.
  218. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, Nakatani K, Kimura K, Harada K, et al. epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(4):653–64.
  219. The renal system. Basic anatomic and physiology. Emergency medical service (EMS) education system. 2021. Disponible en: <https://medictests.com/units/the-renal-system>.

220. Partes del riñón. Área Ciencias- Biología, 2021. Disponible en: <https://www.areaciencias.com/biologia/diseccion-rinon/>.
221. Nephron, functional unit of the kidney. Russell Kightley media: Scientific Illustrator & Animator, 2020. Disponible en: <http://www.rkm3d.com/3D-images/3D-stereo-pairs/3D-stereo-Nephron.html>.
222. Vargas MA & Savedra A. Función de antioxidantes en la diabetes mellitus. Revista de divulgación científica- Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, 2020. Disponible en: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/343-numero-40/621-funcion-de-antioxidantes-en-la-diabetes-mellitus.html>.