



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

**EFFECTO DE LA TAMSULOSINA Y PIOGLITAZONA SOBRE LA
ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA DE LAS
CÉLULAS MESANGIALES SV40 MES 13 INDUCIDAS CON ALTA
GLUCOSA Y NORADRENALINA**

PRESENTA

Sandra Lizbeth Aguilera Martínez

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Asesora: Dra. Raquel Guerrero Alba

Aguascalientes, Ags., 6 de mayo de 2026



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como DIRECTOR designado del estudiante SANDRA LIZBETH AGUILERA MARTÍNEZ con ID 140436 quien realizó el trabajo de tesis titulado/a: EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y PIOGLITAZONA SOBRE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA DE LAS CÉLULAS MESANGIALES SV40 MES 13 INDUCIDAS CON ALTA GLUCOSA Y NORADRENALINA, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 6 de mayo de 2026.

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ
Director tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como CO-DIRECTOR designado del estudiante SANDRA LIZBETH AGUILERA MARTÍNEZ con ID 140436 quien realizó el trabajo de tesis titulado/a: EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y PIOGLITAZONA SOBRE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA DE LAS CÉLULAS MESANGIALES SV40 MES 13 INDUCIDAS CON ALTA GLUCOSA Y NORADRENALINA, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 6 de mayo de 2026.

DR. MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA
Co-director tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión Integral.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 02
Emitido: 12/02/20



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante SANDRA LIZBETH AGUILERA MARTÍNEZ con ID 140436 quien realizó el trabajo de tesis titulado/a: EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y PIOGLITAZONA SOBRE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA DE LAS CÉLULAS MESANGIALES SV40 MES 13 INDUCIDAS CON ALTA GLUCOSA Y NORADRENALINA, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 6 de mayo de 2026.

DR. RAQUEL GUERRERO ALBA
Asesora tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión Integral.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 02
Emisión: 13/02/25



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA
PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación (dd/mm/aaaa): 18/05/2026

NOMBRE: Sandra Lizbeth Aguilera Martínez ID 140436

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas LGAC (del posgrado): Estudio de Proteínas en Sistemas Biológicos

MODALIDAD DEL PROYECTO DE GRADO: Tradicional (X) *Tesis por artículos científicos () **Tesis por Patente () Trabajo Práctico ()

TÍTULO: EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y PIGLITAZONA SOBRE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA DE LAS CÉLULAS MESANGIALES SV40 MES 13 INDUCIDAS CON ALTA GLUCOSA Y NORADRENALINA

La enfermedad renal crónica (ERC) representa un problema de salud pública con alta prevalencia, mortalidad y costos económicos y sociales, especialmente en estados como Jalisco y Aguascalientes. Esta investigación amplía los conocimientos sobre los mecanismos moleculares de esta enfermedad y evalúa alternativas farmacológicas potencialmente más efectivas; los hallazgos de este estudio pueden servir como base para futuras investigaciones biomédicas y para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades renales crónicas.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SEGÚN CORRESPONDA: SÍ, NO, NA (No Aplica)

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SÍ	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SÍ	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SÍ	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SÍ	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SÍ	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SÍ	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SÍ	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SÍ	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SÍ	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Posgrados
SÍ	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SÍ	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial
NA	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario (En caso de que corresponda)
SÍ	Coincide con el título y objetivo registrado
SÍ	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SÍ	Tiene el CVU de la SECHTI actualizado
SÍ	Tiene el o los artículos aceptados o publicados y cumple con los requisitos institucionales (en caso de que proceda)
*En caso de Tesis por artículos científicos publicadas (completar solo si la tesis fue por artículos)	
	Aceptación o Publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto según el nivel del programa
	El (la) estudiante es el primer autor(a)
	El (la) autor(a) de correspondencia es el Director (a) del Núcleo Académico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
**En caso de Tesis por Patente	
	Cuenta con la evidencia de solicitud de patente en el Departamento de Investigación (anexaría al presente formato)

Con base en estos criterios, se autoriza continuar con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí X
No

FIRMAS

Elaboró:
*NOMBRE Y FIRMA DEL(LA) CONSEJERO(A) SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dr. José Luis Quintanar Stephano

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NA de la LGAC correspondiente distinto al director o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.
NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE POSGRADO:
Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

Revisó:
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez

Autorizó:
NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: Mtro. Guillermo Domínguez Aguilár



Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
En cumplimiento con el Art. 24 fracción V del Reglamento General de Posgrado, que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Proponer criterios y mecanismos de selección, permanencia, egreso y titulación de estudiantes para asegurar la eficiencia terminal y la titulación y el Art. 28 fracción IX, atender, asesorar y dar el seguimiento del estudiantado desde su ingreso hasta su titulación.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 02
Emisión: 12/09/25

Article

Modulation of Mesangial Cells by Tamsulosin and Pioglitazone Under Hyperglycemic Conditions: An In Vitro and In Vivo Study

Sandra Lizbeth Aguilera-Martínez ¹, Martín Humberto Muñoz-Ortega ² , Sandra Luz Martínez-Hernández ³ , Jorge Christopher Morones-Gamboa ¹ and Javier Ventura-Juárez ^{1,*} 

- ¹ Department of Morphology, Basic Sciences Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico; all40436@edu.uaa.mx (S.L.A.-M.); al239857@edu.uaa.mx (J.C.M.-G.)
² Department of Chemistry, Basic Sciences Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico; humberto.munoz@edu.uaa.mx
³ Department of Microbiology, Basic Sciences Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico; luz.martinez@edu.uaa.mx
 * Correspondence: jventur@correo.uaa.mx

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is a consequence of diabetes mellitus (DM), in which hyperglycemia triggers osmotic and oxidative stress and activates inflammatory pathways. These processes damage kidney cells, with mesangial cells (MCs) undergoing mesangial expansion. Antihyperglycemic drugs prevent the progression of renal disease. Although tamsulosin is not conventionally used for the treatment of DN, its previously reported anti-fibrotic and anti-inflammatory effects in liver and lung injury models suggest that it may exert renoprotective actions like those of pioglitazone, which has also been shown to improve cellular carbohydrate and lipid metabolism. MCs were exposed to 20 mM glucose medium and treated with either 50 nM tamsulosin or 100 nM pioglitazone. Subsequently, cell proliferation, inflammatory markers (NF- κ B, IL-1 β , IL-17), fibrogenic markers (TGF- β , collagen I), oxidative stress parameters (NRF2, superoxide), and indicators of mesangial activation (α -SMA, rhodamine-phalloidin) were assessed in vitro. Both treatments reduced cellular proliferation and hypertrophy, attenuated the release of reactive oxygen species (ROS), decreased IL-17 and α -SMA expression, and reduced mesangial activation and hypertrophy. In an in vivo model of DN in Wistar rats, both treatments decreased mesangial cell activation and expansion. In conclusion, tamsulosin and pioglitazone exert anti-fibrogenic and anti-inflammatory effects in MCs exposed to HG, thereby limiting mesangial activation and expansion.

Keywords: fibrosis; high glucose; inflammation; mesangial cell; tamsulosin; pioglitazone; mesangial expansion

1. Introduction

DN is a complication of DM which affects approximately 40% of patients with type 2 DM (T2DM) and 30% of those with type 1 DM (T1DM). DN is associated with increased morbidity and mortality, primarily due to microvascular events [1–3]. It is one of the leading causes of chronic kidney disease (CKD) and, in advanced stages, may progress to end-stage renal disease (ESRD) [4,5].

Hyperglycemia is the primary sign presented in DM, which causes complications by disrupting metabolic and hemodynamic homeostasis. It has been estimated that between 25% and 40% of patients with DM develop DN after 10 to 35 years of disease progression [6].



Academic Editor: Marijn Speeckaert

Received: 14 August 2025

Revised: 16 September 2025

Accepted: 19 September 2025

Published: 23 September 2025

Citation: Aguilera-Martínez, S.L.; Muñoz-Ortega, M.H.; Martínez-Hernández, S.L.; Morones-Gamboa, J.C.; Ventura-Juárez, J. Modulation of Mesangial Cells by Tamsulosin and Pioglitazone Under Hyperglycemic Conditions: An In Vitro and In Vivo Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 9277. <https://doi.org/10.3390/ijms26199277>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo doctoral.

En primer lugar, agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado, así como a la institución que me brindó esta oportunidad, la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Ambas instituciones financiaron esta investigación y me brindaron un invaluable respaldo económico y académico.

Agradezco a mi tutor de tesis, el Dr. Javier Ventura Juárez, por su guía constante, su paciencia y sus valiosas enseñanzas a lo largo de este proceso. Su apoyo incondicional, tanto en lo académico como en lo personal, fue fundamental para el desarrollo de esta investigación y para mi crecimiento profesional.

A los miembros de mi comité tutorial, en especial a mi co-tutor, el Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega, agradezco todo su apoyo y enseñanzas a lo largo de estos años, así como sus observaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo. Asimismo, agradezco a la Dra. Raquel Guerrero Alba y a la Dra. Sandra Luz Martínez Hernández por sus valiosas aportaciones, las cuales contribuyeron a fortalecer este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, gracias por su apoyo, por compartir conocimientos y experiencias, y por los momentos que hicieron este camino más llevadero y enriquecedor. Agradezco especialmente los consejos, las risas y los buenos momentos que ayudaron a sobrellevar las dificultades durante este tiempo.

A mis padres y esposo, por su amor y apoyo incondicional, su comprensión y paciencia, y a mi suegra, por su apoyo constante, quienes han sido fundamentales para que pudiera llegar hasta este momento. Sin ellos, no habría sido posible alcanzar esta meta.

Pero, sobre todo, agradezco a mi hijo Gael, quien ha sido mi mayor motivación y la razón que me impulsa a seguir adelante. Su presencia ha sido mi fortaleza en los momentos más difíciles y el motor que me ha permitido no rendirme a lo largo de este proceso, que sin duda ha representado uno de los mayores retos de mi vida.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de este trabajo y que han sido parte importante de este logro.

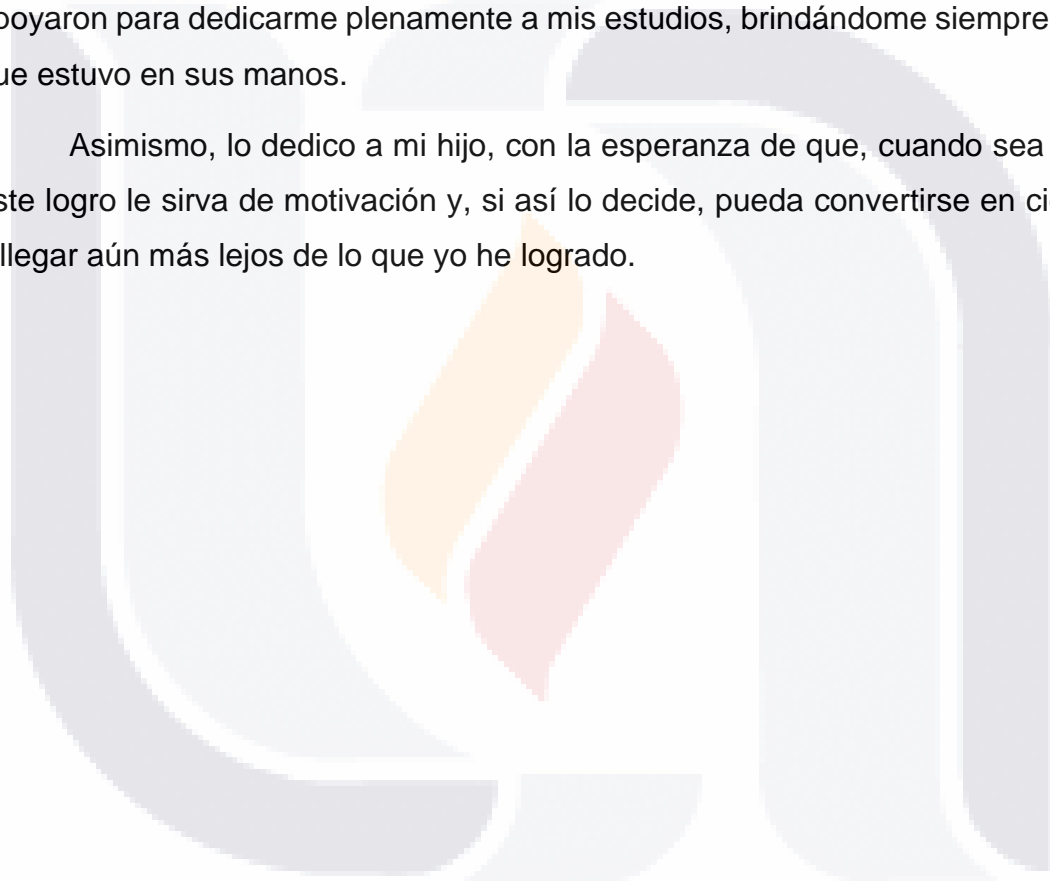


Dedicatorias

En primer lugar, dedico este trabajo a mi tutor que es mi ejemplo de dedicación y vocación a la investigación, el Dr. Javier Ventura Juárez. Es para mí un honor haber trabajado con él y aprender de sus enseñanzas.

Este trabajo también lo dedico a mis padres, quienes desde mi infancia me apoyaron para dedicarme plenamente a mis estudios, brindándome siempre todo lo que estuvo en sus manos.

Asimismo, lo dedico a mi hijo, con la esperanza de que, cuando sea mayor, este logro le sirva de motivación y, si así lo decide, pueda convertirse en científico y llegar aún más lejos de lo que yo he logrado.



Índice General

Índice de Tablas.....3

Índice de Figuras.....3

Resumen.....5

Abstract.....6

Introducción.....7

Antecedentes9

 Mesangio 9

 Matriz mesangial 12

 Células mesangiales 13

Enfermedad renal crónica..... 23

 Inflamación 24

 Fibrosis 27

 NRF2 29

Tratamientos comúnmente utilizados 30

Tratamientos propuestos 31

 Pioglitazona 31

 Tamsulosina 34

Justificación.....35

Hipótesis37

Objetivos37

 Objetivo general 37

 Objetivos específicos..... 37

Metodología38

 Cultivo primario de CMs 38

 Ensayo MTT 40

SYTOX™ green.....	40
Detección de la formación de superóxido mitocondrial	41
Medición de Ca ²⁺ intracitoplasmático	41
Ensayo de detección de F-actina	42
Inmunofluorescencia	42
RT-qPCR.....	43
Extracción de proteínas.....	44
Western blot	45
Consideraciones éticas de estudio.....	46
Resultados	47
Obtención y caracterización de CMs	47
Modelo experimental en línea celular SV40 MES 13.....	49
Pruebas de Viabilidad/Citotoxicidad	51
Actividad de F-actina	59
Superóxido mitocondrial	62
Calcio intracitoplasmático	64
Expresión de marcadores.....	65
Marcadores inflamatorios	65
Marcador antioxidante	82
Marcadores fibrogénicos	86
Discusión de resultados	103
Conclusiones.....	113
Referencias bibliográficas	114
Anexos	137

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos 44

Índice de Figuras

Fig. 1. Anatomía del riñón..... 8

Fig. 2. Fisiología del mesangio 10

Fig. 3. Esquema del lóbulo glomerular a través de una sección transversal, propuesto por Sakai y Kris 11

Fig. 4. CMs in vitro..... 14

Fig. 5. Vía de señalización clásica del receptor α -adrenérgico..... 20

Fig. 6. Vía de señalización de PPAR- γ 22

Fig. 7. Daño renal y fibrosis 24

Fig. 8. Estructura química pioglitazona..... 32

Fig. 9 Estructura química de la tamsulosina 34

Fig. 10. Efecto de la tamsulosina a nivel celular 35

Fig. 11 Cultivo primario de CMs..... 47

Fig. 12. Morfología de CMs de cultivo primario..... 48

Fig. 13. Caracterización de CMs..... 49

Fig. 14. Línea celular SV40 MES13..... 49

Fig. 15. Expresión de receptores adrenérgicos en línea celular SV40 MES13..... 50

Fig. 16. Expresión génica de los ADRA1A ADRA2B 51

Fig. 17. Prueba de viabilidad para NAd y glucosa 52

Fig. 18. Prueba de permeabilidad celular para NAd y glucosa. 53

Fig. 19. Prueba de citotoxicidad de Tamsulosina 54

Fig. 20. Prueba de citotoxicidad de Pioglitazona 55

Fig. 21 Prueba de proliferación celular en los retos de tamsulosina y pioglitazona 57

Fig. 22. Viabilidad celular mediante la prueba de permeabilidad membranal con SYTOX™ green..... 59

Fig. 23 Actividad de la F-actina..... 61

Fig. 24 Superóxido mitocondrial 63
Fig. 25 Calcio intracitoplasmático 65
Fig. 26. Expresión de NF-κB..... 71
Fig. 27. Expresión de IL-1β..... 76
Fig. 28. Expresión de IL-17..... 81
Fig. 29. Expresión de NRF2..... 85
Fig. 30. Expresión de TGF-β 91
Fig. 31. Expresión de α-SMA..... 97



Resumen

La nefropatía diabética (ND) es una complicación de la *diabetes mellitus* (DM) caracterizada por hiperglucemia sostenida, la cual induce estrés oxidativo, osmótico e inflamación, provocando daño en las células renales, particularmente en las células mesangiales (CMs), y favoreciendo la expansión mesangial. Asimismo, la hipertensión arterial contribuye al desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC), en parte mediante la elevación de noradrenalina (NAd), cuyo efecto puede manifestarse de manera independiente o en conjunto con la ND, exacerbando el daño renal.

En este estudio, las CMs fueron expuestas a alta glucosa (20 mM) y/o NAd (10 nM), y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM). Posteriormente, se evaluaron *in vitro* la proliferación celular, los marcadores inflamatorios (NF- κ B, IL-1 β , IL-17), los marcadores fibrogénicos (TGF- β , colágeno I), los parámetros de estrés oxidativo (NRF2, superóxido) y los indicadores de activación mesangial (α -SMA, rodamina-falodina).

Ambos tratamientos atenuaron la activación de las CMs inducida por alta glucosa y NAd, al reducir el estrés oxidativo, la proliferación y la hipertrofia celular. No obstante, la pioglitazona mostró mayor eficacia al disminuir significativamente la expresión de marcadores inflamatorios y fibrogénicos (TGF- β , α -SMA y colágeno I). En conjunto, estos hallazgos sugieren que ambos fármacos ejercen un efecto renoprotector al limitar la activación mesangial y el remodelamiento glomerular asociados a la hiperglucemia y la hiperactividad del sistema nervioso simpático. Asimismo, la combinación de los inductores sugiere la existencia de un posible mecanismo regulador no descrito, probablemente mediado por receptores β -adrenérgicos (β -AR), lo cual requiere estudios adicionales para su elucidación.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is a complication of diabetes mellitus (DM) characterized by sustained hyperglycemia, which induces oxidative and osmotic stress as well as inflammation, causing damage to renal cells—particularly mesangial cells (MCs)—and promoting mesangial expansion. Furthermore, hypertension contributes to the development of chronic kidney disease (CKD), in part through elevated norepinephrine (NE), whose effect may manifest independently or in conjunction with DN, exacerbating renal damage.

In this study, MCs were exposed to high glucose (20 mM) and/or NAd (10 nM), and treated with tamsulosin (50 nM) or pioglitazone (100 nM). Subsequently, cell proliferation, inflammatory markers (NF- κ B, IL-1 β , IL-17), fibrogenic markers (TGF- β , collagen I), oxidative stress parameters (NRF2, superoxide), and indicators of mesangial activation (α -SMA, rhodamine-phalloidin) were evaluated *in vitro*.

Both treatments attenuated high-glucose- and NAd-induced MCs activation by reducing oxidative stress, proliferation, and cellular hypertrophy. However, pioglitazone demonstrated greater efficacy by significantly reducing the expression of inflammatory and fibrogenic markers (TGF- β , α -SMA, and collagen I). Taken together, these findings suggest that both drugs exert a renoprotective effect by limiting mesangial activation and glomerular remodeling associated with hyperglycemia and sympathetic nervous system hyperactivity. Furthermore, the combination of these inducers suggests the existence of a possible, previously undescribed regulatory mechanism, likely mediated by β -adrenergic receptors (β -AR), which requires further studies for elucidation.

Introducción

Los riñones son órganos de color rojizo, ubicados en la zona retroperitoneal, entre las vértebras T11 y L3 (Tortora & Derrickson, 2018), siendo el riñón izquierdo localizado ligeramente hacia arriba respecto al derecho, debido a la presencia del hígado (Wineski & Snell, 2019).

Los riñones humanos tienen un tamaño aproximado de 11 a 12 cm de largo, 5 a 7.5 cm de ancho y un grosor de 2.5 a 3 cm y un peso estimado de 125 a 170 g en hombres y de 115 a 155 g en mujeres (Skorecki et al., 2016).

Las funciones de los riñones son la excreción de productos metabólicos de desecho, el control hidroelectrolítico del cuerpo, el mantenimiento del equilibrio ácido-base en sangre, la regulación del volumen sanguíneo, tensión arterial y nivel de glucosa en sangre, así como el mantenimiento de la osmolaridad sanguínea y la producción de hormonas, como eritropoyetina, renina y calcitriol. Como desecho, se obtiene la orina, que es transportada por los uréteres a la vejiga urinaria en la pelvis (Moore et al., 2018; Wineski & Snell, 2019).

Las principales partes de los riñones son la cápsula, la corteza, la médula la pelvis renal y el hilio (**Fig. 1**). La corteza contiene los corpúsculos renales, que son la parte inicial de la nefrona, poseen forma esférica y contienen gran cantidad de glomérulos; además de túbulos contorneados que forman los laberintos corticales y los túbulos rectos, conectores y colectores, que forman una serie de estriaciones verticales que forman la médula, llamados rayos medulares o de Ferrein. Por otro lado, los túbulos conectores y sus nefronas forman los túbulos urinarios (Ross & Pawlina, 2020).

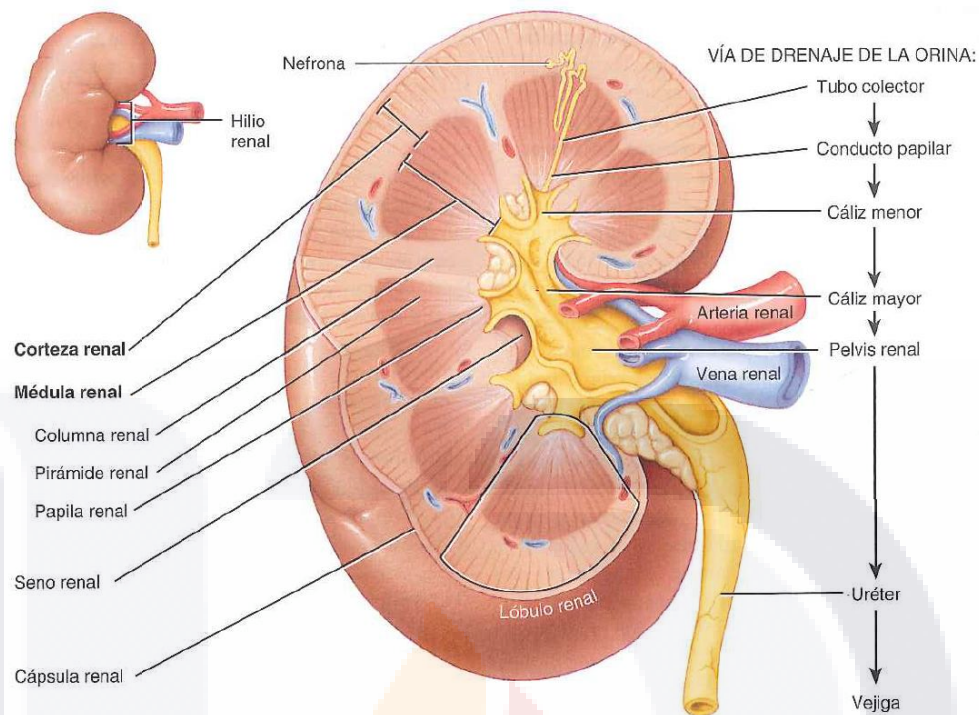


Fig. 1. Anatomía del riñón. Imagen tomada del libro Principios de anatomía y fisiología (Tortora & Derrickson, 2018).

La nefrona inicia en la cápsula de Bowman, donde se encuentran los capilares, podocitos y el mesangio, este último constituido por matriz extracelular y las CMs. Las CMs son derivadas de las células del músculo liso (Stockand & Sansom, 1998) y, junto con su matriz mesangial (MM), que está constituida principalmente por Col IV (Col IV) y V, laminina tipo A, B1 y B2, fibronectina, proteoglicanos (heparán sulfato y condroitín sulfato), proveen de soporte al glomérulo y forman una estructura llamada mesangio (Kurihara & Sakai, 2017; Schlöndorff & Banas, 2009); que en condiciones fisiológicas, esta matriz es altamente regulada por la plasmina, metaloproteasas de matriz (MMPs) y el inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMPs) (Kurihara & Sakai, 2017).

Cuando hay un daño tisular, se libera gran cantidad de citocinas inflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Si esta fase se extiende junto con el daño celular, provoca la liberación de compuestos profibróticos como TGF- β , que a su vez genera una sobreexpresión de Col I y fibronectina (J.-H. Zhao, 2019). Esto

provoca el desarrollo de la ERC, caracterizada por la presencia de fibrosis y una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) (Taherkhani et al., 2019), que generalmente está asociada a hipertensión o DM tipo 2 (DMT2) (Romagnani et al., 2017).

Aunado a esto, las CMs juegan un papel clave en la secreción de citocinas proinflamatorias; tales como IL-1, IL-6 y TNF- α , además de la MM, originando glomeruloesclerosis, que posteriormente se convierte en fibrosis renal. Esto se debe a la respuesta de las CMs ante diferentes estímulos, liberando citocinas que provocan su propia hipertrofia y proliferación (Guijarro et al., 1997).

Actualmente, no existe un tratamiento específico para la ERC, ya que puede ser de origen multifactorial. Regularmente, para su tratamiento, se utilizan medicamentos antihipertensivos, como los bloqueadores del receptor de angiotensina II (ANG II) (Ruiz-Ortega et al., 2020); sin embargo, no hay un medicamento eficaz para la resolución de la fibrosis en la ERC (J.-H. Zhao, 2019).

Por tanto, la propuesta de este trabajo es el uso de tratamientos que han demostrado tener un efecto antifibrótico en otros órganos, como el hígado y el corazón (Alrasheed et al., 2023; Medina Pizaño et al., 2023), como la tamsulosina, un bloqueador de los receptores α -adrenérgicos (Sun et al., 2021), y la pioglitazona, un agonista de los receptores PPAR- γ , que al activarse forma un complejo que actúa como un transreprimador del NF- κ B, evitando la expresión de citocinas proinflamatorias (Ko et al., 2008; Maeda et al., 2005). En ambos tratamientos, se provoca una disminución de TGF- β 1 (Ko et al., 2008; Maeda et al., 2005; Sun et al., 2021; W. Wang et al., 2020).

Antecedentes

Mesangio

En 1933, Zimmerman acuñó el término “*mesangio*” para describir una estructura de soporte para los capilares del glomérulo; confirmando su presencia mediante microscopía electrónica 30 años después (Avraham et al., 2021; Kurihara

& Sakai, 2017; Sakai & Kriz, 1987; Zimmerman, 1933). La palabra “*mesangio*” proviene del griego “*meso*”, que significa “en medio” y del sufijo en latín “*angium*” que significa “vasos”; es decir, “en medio de vasos” (Avraham et al., 2021). Se localiza entre los capilares y la membrana basal glomerular (MBG) e integra a las CMs, que constituyen aproximadamente un tercio de todas las células del glomérulo, así como la MM (Sakai & Kriz, 1987; J.-H. Zhao, 2019) (**Fig. 2**).

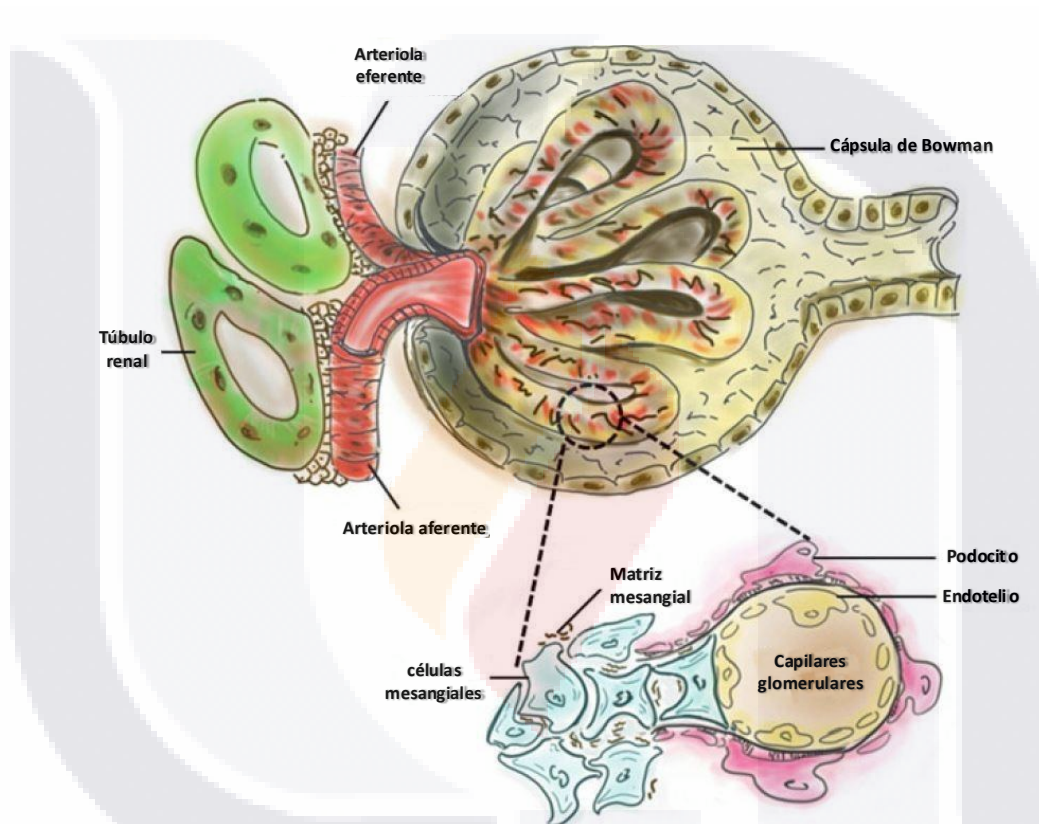


Fig. 2. Fisiología del mesangio. Constituido por las CMs y su matriz extracelular, secretada por las mismas CMs. Imagen modifica de (J.-H. Zhao, 2019).

En 1942, Goormaghtigh sugirió que las CMs son células modificadas del músculo liso y poseen propiedades contráctiles (Becker, 1972; Goormaghtigh, 1942). No fue hasta 1987 que Sakai y Kriz descubrieron que su propiedad contráctil modula la presión en los capilares del glomérulo, debido a que están mecánicamente conectadas a la MBG y directamente a la lámina densa o rara

interna (Sakai & Kriz, 1987), afectando la hemodinamia mediante la resistencia vascular (Kurihara & Sakai, 2017).

Por otro lado, las células endoteliales no están totalmente envueltas por MBG y los podocitos, ya que entre ellas existe un espacio ocupado por las CMs que facilita la comunicación con el endotelio capilar, conocido como área yuxtaglomerular. Adicionalmente, cuando las CMs no están en contacto directo con los capilares, se les denomina mesangio extraglomerular (J.-H. Zhao, 2019).

Estas células desempeñan diversas funciones, como generar tracción mecánica sobre la MBG, el revestimiento capilar endotelial y la membrana basal intermedia, lo que garantiza la presión hidrostática capilar y el equilibrio de los vasos capilares; cualquier alteración en este sistema puede afectar el filtrado y la TFG (J.-H. Zhao, 2019) (**Fig. 3**).

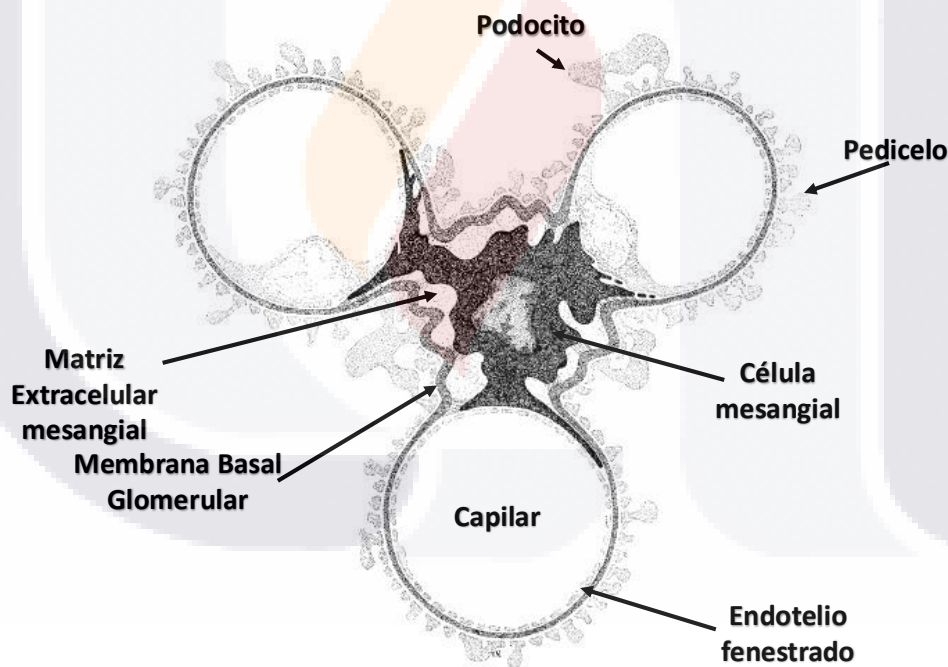


Fig. 3. Esquema del lóbulo glomerular a través de una sección transversal, propuesto por Sakai y Kris. Los capilares están formados por células endoteliales que poseen fenestraciones de $0.07\mu\text{m}$, las cuales obstaculizan el paso de células sanguíneas. Los podocitos, células epiteliales que envuelven los capilares mediante sus pedicelos, forman hendiduras que impiden el paso de moléculas de diámetro menor a $0.007\mu\text{m}$, evitando así la pérdida de proteínas como la albúmina. Por último, las CMs tienen como función principal regular la filtración glomerular, proporcionar soporte al glomérulo y eliminar residuos. Imagen modificada de Sakai y Kriz (Sakai & Kriz, 1987; Tortora & Derrickson, 2018).

La salida de macromoléculas filtradas a través del mesangio se realiza por tres vías: atravesando la MBG y los pedicelos hacia el espacio urinario, fluyendo a través de los canales y la red fibrilar de la matriz en los capilares eferentes, o concentrándose en el hilio glomerular junto con el aparato yuxtaglomerular (J.-H. Zhao, 2019).

Matriz mesangial

La MM proporciona soporte estructural y facilita el flujo de macromoléculas a través del mesangio (Gómez-Guerrero et al., 2005; J.-H. Zhao, 2019). La fibronectina es el componente principal del mesangio, cápsula de Bowman y del espacio túbulo-intersticio (Bülow & Boor, 2019; Stockand & Sansom, 1998); actuando como un nexo entre la MBG y la MM, junto con la maquinaria contráctil de la CM (Stockand & Sansom, 1998). Además, está compuesta por Col IV y V, laminina (tipo A, B1 y B2), proteoglicanos (heparán sulfato y condroitín sulfato), así como pequeñas cantidades de decorina y biglucano (Herrera, 2006; Kurihara & Sakai, 2017; Schlöndorff & Banas, 2009). Otras proteínas extracelulares incluyen proteínas microfibrilares como fibrina, glicoproteína asociada a microfibrillas (MAGP), proteína de matriz (MP78) y 340 y Col III y VI (Herrera, 2006).

En condiciones fisiológicas, la liberación proteica de la MM está regulada por un equilibrio entre la producción de matriz extracelular, mediada por TGF- β , y su degradación, facilitada mediante un mecanismo de degradación que posee un papel destacable en el desarrollo de distintas patologías; dado por la plasmina y las MMPs antifibróticas (Herrera, 2006; Kurihara & Sakai, 2017).

Las MMPs contribuyen desde el comienzo del daño hasta la reparación del tejido, colaborando a la activación o desactivación de los miofibroblastos, dependiendo si existe o no una resolución total de la inflamación y del tipo de MMPs, ya que existen MMPs tanto pro y anti fibróticas (Giannandrea & Parks, 2014).

Los inhibidores tisulares de metaloproteasas regulan las MMPs; en el riñón, TIMP-3 ha demostrado un efecto protector al suprimir TNF- α , regulando la expresión de MMPs profibróticas, mediando la fibrosis renal (Giannandrea & Parks, 2014).

Células mesangiales

Aproximadamente el 85-95% de las células en el mesangio son CMs (Veis, 1993); que pertenecen a la clase de células estromales mesenquimales y expresan *Foxd1*⁺ (Avraham et al., 2021). Estas células, derivadas del músculo liso (Gómez-Guerrero et al., 2005), son metabólicamente activas y sintetizan citocinas que promueven la proliferación celular y el reclutamiento de células del sistema inmunológico (incluyendo monocitos y macrófagos) (Herrera, 2006).

Morfológicamente, las CMs poseen forma estrellada, con prolongaciones citoplasmáticas ramificadas de gran tamaño y longitudes variadas (Herrera, 2006; Sakai & Kriz, 1987). En su citoplasma se observan escasos organelos, entre ellos mitocondrias, un prominente aparato de Golgi, un retículo endoplasmático variable (dependiendo si está activa o no), pequeñas vesículas del tipo pinocítico, uno o más cuerpos multivesiculares, así como una gran cantidad de microtúbulos y filamentos dispuestos perpendicularmente a la largo del eje de la célula. Estos filamentos cruzan el cuerpo celular intermedio, orientándose en todas direcciones, lo que les proporciona su propiedad contráctil. Son células mononucleadas, y su núcleo es de mayor proporción respecto a su citoplasma (**Fig. 4**) (Farquhar & Palade, 1962; Sakai & Kriz, 1987).

Las CMs pueden tras o desdiferenciarse en respuesta a la clase de daño. Si expresa el fenotipo miofibroblástico, adquieren un retículo endoplasmático rugoso prominente, ribosomas y polisomas, lo cual les permite sintetizar numerosas proteínas. El segundo subtipo celular (fagocítico/tipo macrófago) expresa receptores Fc y C3, que anteriormente se creía que eran exclusivos de células generadas en la médula ósea, y posee actividad endocítica y procesamiento lisosomal (Herrera, 2006).

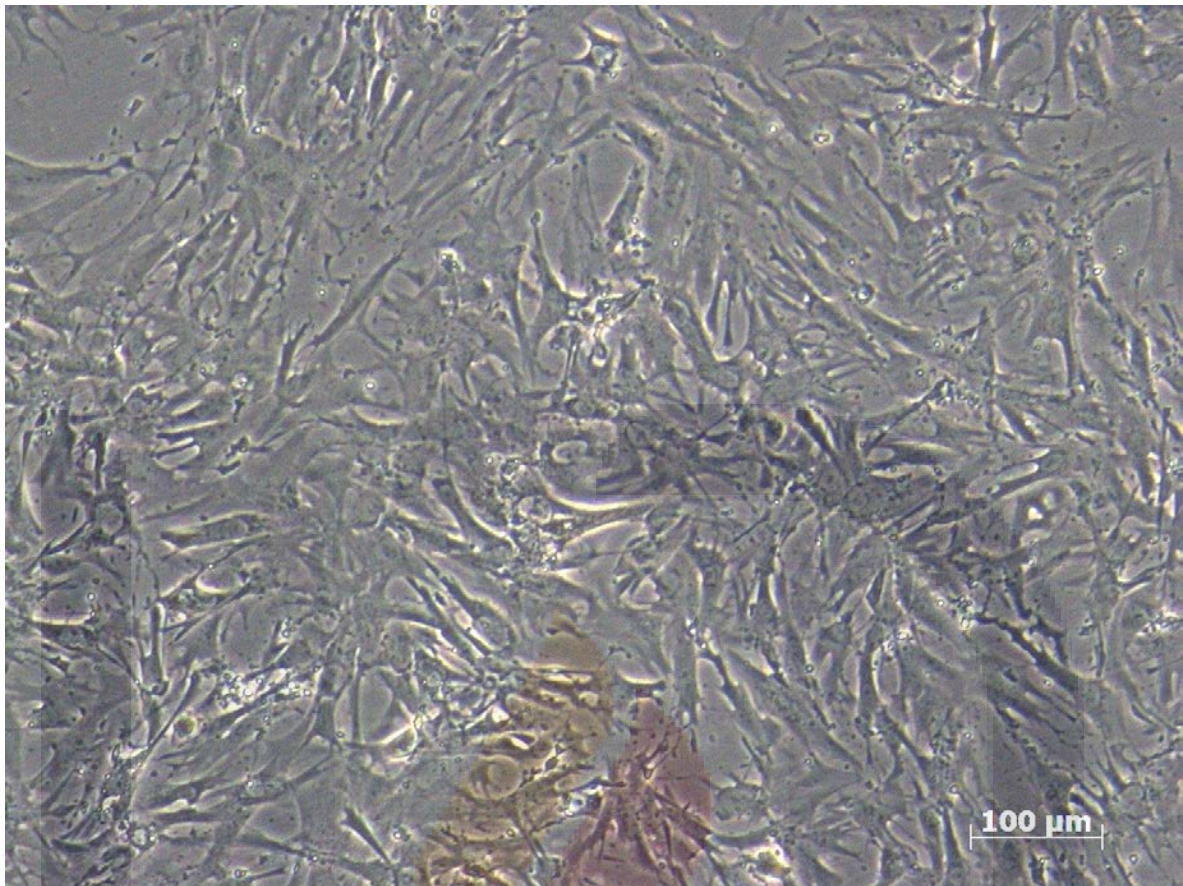


Fig. 4. CMs in vitro. Cultivo primario purificado de CMs, presentan una morfología estrellada y crecimiento en multicapas. La imagen fue obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 100x utilizando la cámara digital AxioCam MRc acoplada al microscopio ZEISS Axiovert 40 CFL.

Existen dos principales fenotipos de CMs, las predominantes son del fenotipo de células del músculo liso, con miofilamentos y propiedades contráctiles; la segunda comprende de 3-10% de todas las CMs, que son del tipo fagocítico (Herrera, 2006).

En un principio se creía que las CMs eran semejantes a los fibroblastos; sin embargo, Farquhar y Palade realizaron varios experimentos que lo refutaron, mediante la descripción de sus propiedades morfológicas ultraestructurales, gracias a la microscopía electrónica y su alta actividad fagocítica, descubriendo la eliminación de residuos de ferritina, Thorotrast (ThO_2) y oro coloidal de la matriz

mesangial, sugiriendo que presentan una elevada actividad fagocítica (Avraham et al., 2021).

En el trabajo realizado por Ikeda et al. (1997), indujeron la activación de las CMs con citocinas inflamatorias (INF- γ , TNF- α e IL-1 β) y óxido nítrico (NO), aumentando la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MCH I) (Ikeda et al., 1997). Por otra parte, se indujo una activación de las CMs *in vitro* e *in vivo* con INF- γ , expresando MCH I; posteriormente, se trataron con IL-10, lo que aumentó la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MCH II) (Chadban et al., 1998).

Yu H *et al.* (2021) descubrieron que al activar las CMs con IFN- γ , se expresó el MHC II, ICAM-1, CD40 y CD80, sugiriendo que se comportan como una célula presentadora de antígeno (APC) no profesional, mostrando péptidos e iniciando la polarización de las células nativas CD4+ al fenotipo Th1 (Y. Zhao et al., 2021). Con lo anterior, algunos autores sugieren que las CMs muestran propiedades parecidas a macrófagos, ya que secretan citocinas proinflamatorias (Gómez-Guerrero et al., 2005; Menè & Stoppacciaro, 2009).

Responden como células del músculo liso a hormonas consideradas como vasoactivas, como la ANG II, vasopresina y NAd, teniendo como efecto su contracción o relajación (Hadad et al., 1997; Nakai et al., 1995; Okuda et al., 1986; Stockand & Sansom, 1998).

Las CMs se adhieren a las células epiteliales mediante la afadina, una proteína de unión a actina F, la cual forma microfilamentos localizados en el sitio de contacto de la célula mesangial-endotelial, que es regulada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Además, esta misma proteína es localizada con la β -catenina en el sitio de unión intercelular entre las CMs vecinas (Kurihara & Sakai, 2017). Asimismo, posee gran variedad de receptores en su membrana, respondiendo a señales hormonales, del sistema nervioso simpático, inmunológicas, entre otros.

Receptores

Receptores Hormonales

Angiotensina y vasopresina

En un estudio realizado en 1980 por Ausiello *et al.*, se demostró que las CMs *in vitro* responden al estímulo de la ANG II y vasopresina contrayéndose; sin embargo, no hubo respuesta celular al recibir los tratamientos con prostaglandina E₁ (PGE₁) y la hormona paratiroidea (PTH), lo que sugiere la ausencia de los receptores para estas hormonas (Ausiello *et al.*, 1980).

La función de la ANG II es la excreción de sodio y agua, lo que ocasiona una reducción en la superficie capilar del glomérulo y disminución de la TFG (Tortora & Derrickson, 2018). En cambio, la función de la vasopresina es la retención de agua y sodio (Tortora & Derrickson, 2018).

El mecanismo contráctil se activa mediante la unión de ANG II a su receptor AT_{1A}, a través de Ca⁺² dependientes de voltaje y la activación dependiente de calmodulina de la cadena ligera de quinasa. Esto implica la liberación dependiente de Ca⁺² y la disociación de la troponina en la actina, lo que da como resultado la contracción celular (Forrester *et al.*, 2018; Stockand & Sansom, 1998). Además, existe evidencia *in vivo* e *in vitro* de que, al estar unida la ANG II a su receptor AT₁, se activa el complejo NF-κB, lo que produce efectos proinflamatorios, proliferativos y provoca la hipertrofia celular (Rangan *et al.*, 2009).

Por otro lado, la vasopresina se une a su receptor V_{1A}, que está acoplado mediante una proteína G insensible a la toxina pertussis a la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol. Esta enzima media la hidrólisis de polifosfoinosítidos, generando dos segundos mensajeros; el primero, 1,4,5 trifosfato inositol, que induce la liberación intracelular de iones Ca⁺² desde el retículo endoplasmático, y el segundo, diacilglicerol, que activa la proteína C quinasa, causando la contracción de la CM (Okuda *et al.*, 1986; Tahara, Tsukada, Tomura, Suzuki, *et al.*, 2008).

Endotelina-1

La endotelina-1 (ET-1) es un poderoso vasoconstrictor liberado por las células endoteliales glomerulares. Su mecanismo de acción se basa en la elevación de la concentración de los iones Ca^{+2} a través de la vía fosfolipasa C (PLC) y el sistema de transducción inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) (Stockand & Sansom, 1998). Existen dos receptores para ET-1 (ET_A y ET_B), expresando las CMs únicamente el receptor ET_B (Hu et al., 1993; Stockand & Sansom, 1998).

Péptido natriurético auricular

Al incrementarse el volumen sanguíneo, se produce un estiramiento auricular que provoca la liberación del péptido natriurético auricular (ANP) por los miocitos auriculares. Esta hormona regula el volumen de los fluidos extracelulares y, en el riñón, tiene una acción de relajación sobre las CMs, aumentando la superficie de los capilares del glomérulo. Además, inhibe la reabsorción de sodio y agua en el túbulo contorneado proximal y en el colector, lo que a su vez suprime la secreción de aldosterona y vasopresina (Ballermann *et al.*, 1985; Tortora & Derrickson, 2018).

El ANP pertenece a la familia de péptidos natriuréticos (NP), que son sintetizados como prehormonas y se unen a 3 tipos de receptores: NP tipo A, B y C (NPRA, NPRB Y NPRC). En las CMs, el ANP se une al receptor NPRA, que posee un dominio catalítico de guanilil ciclase (GC) y produce como segundo mensajero el guanosín monofosfato cíclico (cGMP). Sin embargo, también puede unirse de forma arbitraria al NPRC que carece de actividad de GC (Mani et al., 2016).

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) mantiene el tono vascular mediante la vasodilatación, y ejerce efectos de inhibición y relajación de las CMs (Chadban et al., 1998). Si bien la liberación constitutiva del NO tiene efectos protectores, en situaciones patológicas puede presentar efectos adversos (Gómez-Guerrero et al., 2005). En estudios *in vitro*, se ha observado que en las CMs actúa como antiproliferativo,

reduciendo la producción de la matriz mesangial y su adhesión, funcionando como un modulador autocrino y apoptótico (Gómez-Guerrero et al., 2005).

Shultz *et al.* demostraron que las CMs, al ser activadas por lipopolisacáridos (LPS), producen NO inducible (iNO), lo que incrementa la concentración de cGMP intracelular (Shultz et al., 1994). Asimismo, las CM son capaces de secretar NO al ser expuestas a IL-1 β y TNF- α , expresando el fenotipo de macrófagos (Pfeilschifter, 2002).

Receptores inmunológicos

Receptores tipo Toll (TLR)

Los receptores tipo Toll (TLR) son glicoproteínas expresadas en la superficie de macrófagos, células dendríticas (CD) y células epiteliales. Tienen la capacidad de reconocimiento de múltiples tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Al activarse, generan la expresión y secreción de citocinas inflamatorias, promoviendo la vía de señalización de NF- κ B y activando el sistema inmunológico (Y. Zhao et al., 2021).

Lo anterior puede provocar una serie de respuestas que puede ocasionar enfermedades renales y procesos inflamatorios que causan fibrosis (Y. Zhao et al., 2021).

Receptores a quimiocinas

Las CMs activadas expresan receptores; tales como CXCR3, CCR1 y CCR7, en respuesta a citocinas inflamatorias; lo que significa que tienen la capacidad de secretar y expresar receptores para estas citocinas durante el daño (J.-H. Zhao, 2019).

Los ligandos para el receptor CXCR3 incluyen la proteína inducible a interferón (IP-10), que se sobreexpresa en procesos patológicos (Gao et al., 2020),

estimulando la activación de la vía de señalización de ERK y resultando en la proliferación celular (Bonacchi et al., 2001). Otros ligandos son Mig/CXCL9 e I-TAC/CXCL11, que al unirse inducen la activación de células Th1 y la proliferación de las CMs (Lazzeri et al., 2002; Wörnle et al., 2004). Por otra parte, el receptor CCR7, al unirse a su ligando SLC/CCL21, tiene un efecto antiapoptótico y proliferativo.

En un estudio realizado por Wörnle et al. en 2004, se demostró que el receptor CCR1, al unirse con su ligando de regulación por activación, expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES/CCL5), tiene un efecto en la modulación de la inflamación glomerular (Wörnle et al., 2004).

Los receptores para IL-17 se encuentran en membrana celular y desencadenan la liberación de quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, los cuales reclutan neutrófilos, monocitos, células Th1 y Th17. Al activarse de forma crónica, estas células producen daño renal (Turner et al., 2010).

Además, las CMs poseen receptores de fragmentos de la vía del complemento para C3a y C5a (C3aR y C5aR), que están acoplados a proteínas G e inducen la liberación de citocinas y quimiocinas, generando una respuesta quimiotáctica en neutrófilos y macrófagos, así como la activación de estos últimos (Zhang et al., 2017).

Receptores adrenérgicos

Existen dos tipos de receptores adrenérgicos (AR), α y β , que están acoplados a proteínas G. Los receptores α se dividen en dos subtipos: AR- α_1 y AR- α_2 , mientras que los receptores β se dividen en tres subtipos: AR- β_1 , AR- β_2 y AR- β_3) (Ren et al., 2020).

α -adrenérgicos

Se han detectado tres subtipos de receptores α -adrenérgicos en corteza renal (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}). En CMs, se ha descubierto que los antagonistas α -

adrenérgicos, como doxazosina, prazosina y dicentrina, causan una inhibición del crecimiento de forma dosis-dependiente inducida por PDGF (Kong et al., 2015; Tsai et al., 1995). Además, la doxazosina reduce la producción de matriz extracelular (Kong et al., 2015; Pawluczyk et al., 2006).

La unión del receptor con su ligando activa la proteína G acoplada a la fosfolipasa C β (PLC β), que cataliza la formación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). Esto libera Ca $^{2+}$ en el citoplasma mediante la activación del canal TRPC6, lo que a su vez activa la vía de señalización ERK1/2, causando proliferación y contracción en las CMs (Fig. 5) (Forrester et al., 2018; Hadad et al., 1997; Kong et al., 2015).

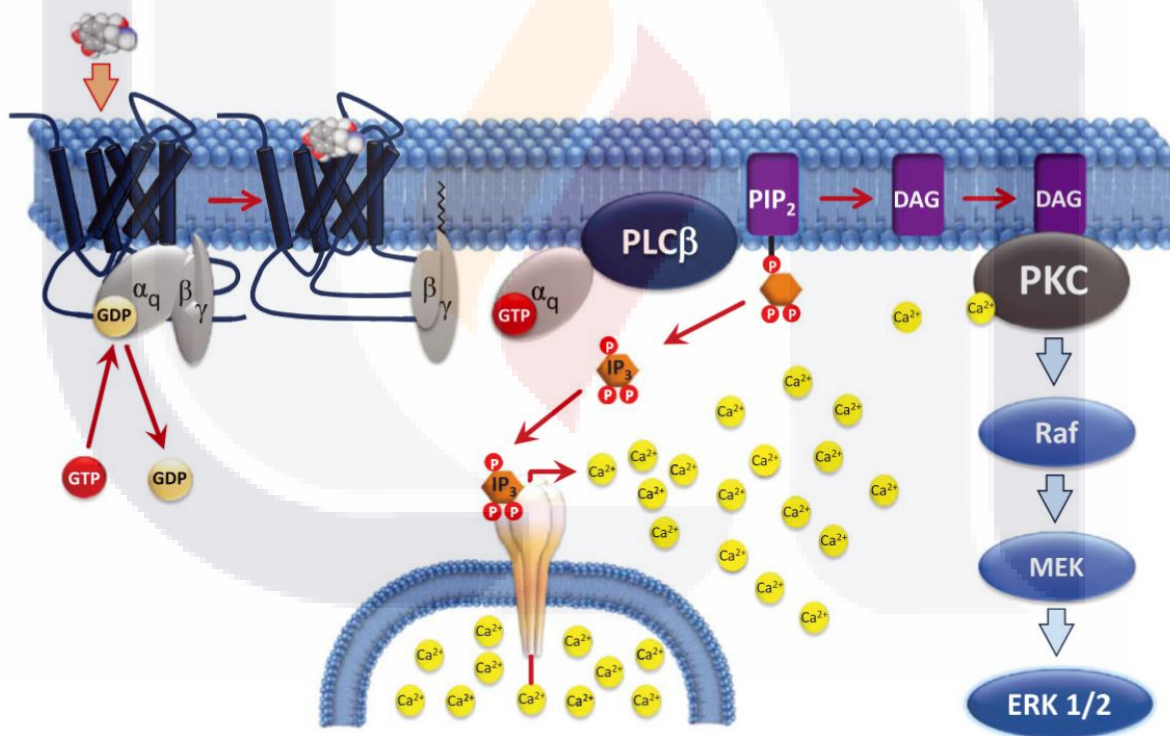


Fig. 5. Vía de señalización clásica del receptor α -adrenérgico. Su activación provoca la liberación de iones Ca $^{2+}$ al citosol, generando una respuesta contráctil en las CMs. Imagen tomada de (Akinaga et al., 2019).

En un estudio realizado por Pawluczyk *et al.* (2006), se descubrió que el bloqueo de este receptor produce una disminución en la expresión de fibronectina

en humanos. Además, la respuesta está relacionada con el sexo, siendo más efectiva en mujeres que en hombres, posiblemente debido a una mayor expresión de receptores α_{1B} en las mujeres (Pawluczyk et al., 2006).

β -adrenérgicos

La presencia de receptores β -adrenérgicos (β -AR) en las CMs se corrobora con el estudio de Boivin *et al.* (2001), quienes localizaron los receptores AR- β_1 y AR- β_2 en riñón mediante inmunofluorescencia; encontrando que en el glomérulo, las CMs son las únicas que expresan estos receptores (Boivin et al., 2001).

En otro estudio, Nakamura *et al.* (2003) indujeron la activación de las CMs mediante LPS, lo que activó las vías de señalización de Erk1/2 y p38MAPK, resultando en la liberación de TNF- α . Sin embargo, al agregar un agonista β -adrenérgico, se observó una reducción de esta respuesta (Nakamura et al., 2003).

Se ha demostrado que los β -AR participan activamente en la biogénesis mitocondrial, así como en la modulación del metabolismo de la glucosa, la respuesta inflamatoria y los mecanismos de apoptosis a nivel renal. La activación de las vías β -AR no solo influye en la homeostasis energética celular, sino que también contribuye a la adaptación frente a condiciones de estrés metabólico (Kamiar et al., 2021).

PPAR- γ

En riñón, estas moléculas son expresadas por las células intersticiales de la médula, el aparato yuxtaglomerular, los segmentos tubulares renales, los podocitos, las CMs y el endotelio microvascular (Kökény et al., 2021). Se localizan en el núcleo y existen tres tipos de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), α , δ y γ , siendo este último el más estudiado (Leibovitz & Schiffrin, 2007; Maeda et al., 2005; Rodríguez Pérez et al., 2007).

Su nombre proviene de su capacidad para estimular el crecimiento y la proliferación de los peroxisomas, que desempeñan un papel crucial en la β -

oxidación de los ácidos grasos (Leibovitz & Schiffrin, 2007; Maeda et al., 2005; Rodríguez Pérez et al., 2007). Además, los PPAR modulan genes que regulan el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Kökény et al., 2021; Mao & Ong, 2009).

Al unirse a su ligando, los PPAR forman un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR) y se une a elementos de respuesta (PPRE) en la región promotora de sus genes diana, activando o reprimiendo la expresión principalmente de adiponectina, leptina en adipocitos que ayudan al metabolismo de la glucosa y de lípidos. (Leibovitz & Schiffrin, 2007). Funcionan también como un transrepositor de genes proinflamatorios como NF-κB, suprimiendo la expresión de IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α, NO y ciclooxigenasa-2, lo que les confiere un efecto antihipertensivo y nefroprotector (**Fig. 6**) (Leibovitz & Schiffrin, 2007; Maeda et al., 2005; Mao & Ong, 2009).

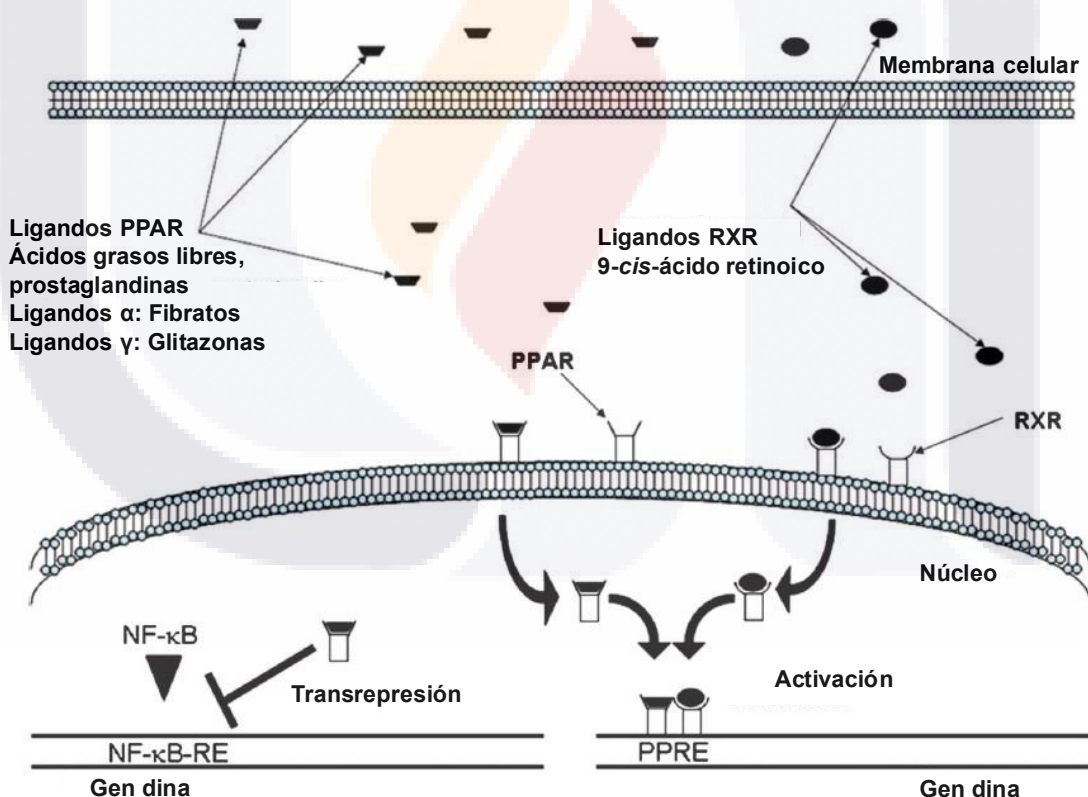


Fig. 6. Vía de señalización de PPAR-γ. La activación de esta vía tiene un efecto antiinflamatorio al producir una transrepresión de NF-κB. Imagen modificada de (Leibovitz & Schiffrin, 2007).

Enfermedad renal crónica

La presión intraglomerular en una persona sana puede variar entre 30 a 50 mm de Hg. Las CMs censan esta presión y responden a las variaciones mediante su contracción, reduciendo el área capilar y controlando así la presión sanguínea intraglomerular. Sin embargo, esta presión puede llegar a aumentar a más de 70 mm de Hg en patologías (Stockand & Sansom, 1998).

La ERC se define como la reducción de la función renal, con una TFG menor a 60 mL/min por 1.73m², y presentar mínimo dos marcadores de daño por un periodo de al menos 3 meses. Los marcadores de daño incluyen albuminuria, sedimentos anormales en orina, anormalidades debido a trastornos tubulares (por ejemplo, electrolíticos), y hallazgos histológicos y estructurales detectados mediante imagenología. También se considera un marcador tener historial de trasplante de riñón (Webster et al., 2017). En etapas tempranas de la ERC, no suelen aparecer síntomas previos al diagnóstico, hasta que se alcanza una etapa irreversible (Taherkhani et al., 2019).

Cuando la TFG se presenta a menos de 15 mL/min por 1.73m², se considera que se ha llegado a la etapa final de la ERC, que requiere intervención mediante diálisis o trasplante renal. Comúnmente se presenta fibrosis renal, un proceso de cicatrización insatisfactorio tras un daño crónico, caracterizado por glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis intersticial (Webster et al., 2017).

Entre los factores de riesgos más comunes se encuentran ser mayor de 65 años, ser mujer y tener un diagnóstico de DM y/o hipertensión. Particularmente existe una mayor prevalencia en países de ingresos altos o medios (Romagnani et al., 2017).

Se ha encontrado evidencia que la hiperactividad del sistema nervioso simpático provoca hipertensión; sin embargo, en las CMs no se ha esclarecido el mecanismo de acción (Kong et al., 2015). Por otro lado, en la DM se mantienen concentraciones elevadas de glucosa, lo que facilita su entrada en las CMs a través de transportadores de glucosa. El GLUT-4 se expresa en pequeñas proporciones, mientras que el GLUT-1 es la isoforma predominante, siendo este el responsable

de la expresión de TGF- β (Haneda et al., 2003). En ambas patologías, el desarrollo de ERC es una consecuencia común, influenciado en gran medida por citocinas proinflamatorias que generan la producción de citocinas profibróticas (**Fig. 7**) (Haneda et al., 2003; Kong et al., 2015; J.-H. Zhao, 2019).

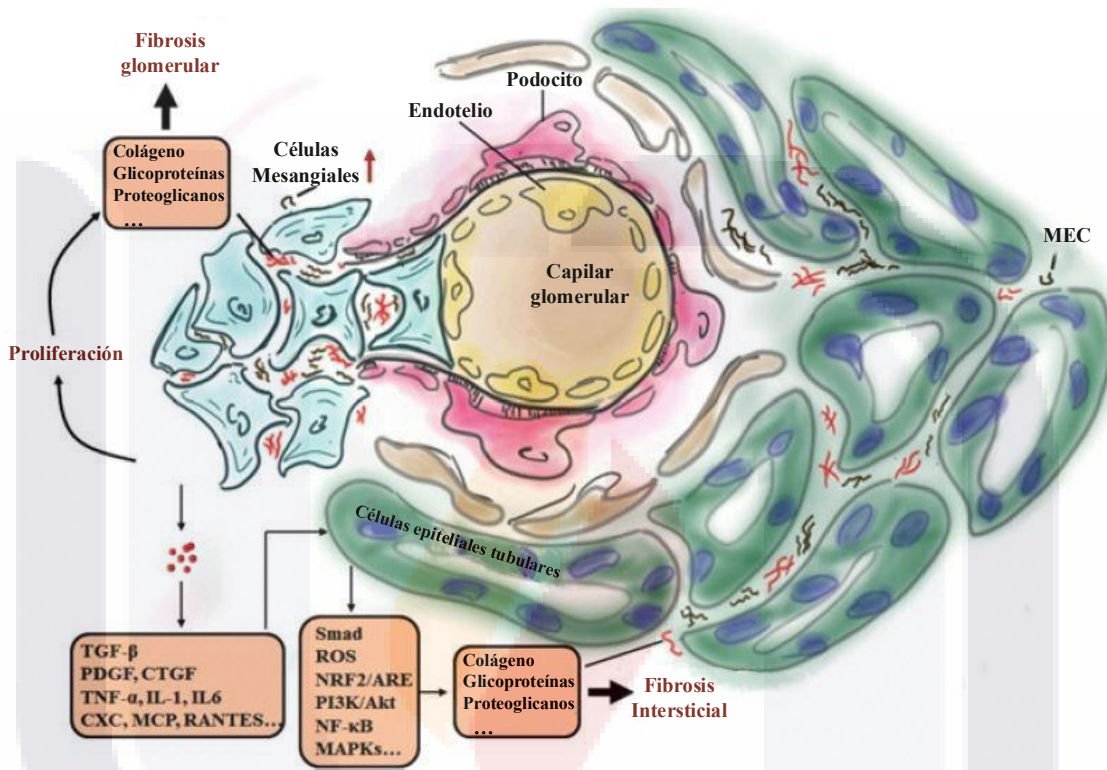


Fig. 7. Daño renal y fibrosis. Durante un daño glomerular, existe la sobreexpresión de citocinas, que, si no se corrige, puede progresar a ERC. Imagen modificada de (J.-H. Zhao, 2019).

Inflamación

La inflamación es un proceso tisular que incluye fenómenos moleculares, celulares y vasculares, con la finalidad de defenderse contra el ataque de patógenos o agresiones tisulares (Salanova Villanueva et al., 2018).

Entre los factores de daño mecánicos se encuentran la hiperfusión glomerular e hipertensión intracapilar, que son resultado de anomalías metabólicas en enfermedades sistémicas como la DM e hiperlipidemia (Gómez-Guerrero et al., 2005). De hecho, en estudios *in vitro* se ha observado que un medio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con alta concentración de glucosa induce la proliferación mesangial y la expresión de factores proinflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , CCL2/3 y CXCL8. Además, promueve la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mitocondrias (Sun et al., 2021; J.-H. Zhao, 2019).

La primera fase de daño glomerular es la fase aguda, que puede no tener consecuencias funcionales o puede presentar algún tipo de alteración funcional intrínseca en las CMs, endoteliales o epiteliales, así como la persistencia de infiltrado inflamatorio. Esto resulta en la liberación de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios que están involucrados en la proliferación celular y el depósito de la MM (Gómez-Guerrero et al., 2005).

Las CMs secretan mediadores inmunes e inflamatorios, como IL-1 e IL-6, que favorecen la inflamación crónica (Gómez-Guerrero et al., 2005). Estos factores intraglomerulares coordinan actividades dirigidas a ciertas células diana; además de promover la infiltración de macrófagos, la secreción de gran cantidad de matriz extracelular y la disminución de la TFG (Stockand & Sansom, 1998).

Por otro lado, las citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, IFN- γ y los LPS de las bacterias inducen la expresión y secreción de IL-8, IP-10 y el oncogén relacionado con el crecimiento (GRO), lo que indica que las CMs están involucradas en el daño glomerular (Guijarro et al., 1997).

Entre los factores mitogénicos se encuentran el PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), TNF- α , IL-1, IL-6, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y los tromboxanos (TX) (Gómez-Guerrero et al., 2005).

Las hormonas ANG II, vasopresina y ET-1 están asociadas a la regulación del crecimiento mesangial, actuando como potentes mitógenos que regulan la función celular. La vasopresina, además, está involucrada en la inducción, proliferación e hipertrofia de las CMs (Gómez-Guerrero et al., 2005; Tahara, Tsukada, Tomura, Yatsu, et al., 2008).

NF-κB

El factor de transcripción kappa de células B (NF-κB) es una vía de señalización intracelular importante que se induce en respuesta a varios estímulos extracelulares (Rangan et al., 2009). Este dímero está constituido por dos subunidades, p50 y p65 (también llamado RelA). En células sin estímulo, estas dos subunidades se localizan en citoplasma unidas a una proteína inhibitoria (IκB). Sin embargo, al recibir un estímulo, IκB se degrada en el proteosoma y se libera el dímero, que es trasladado al núcleo, donde regula la transcripción de genes (Guijarro et al., 1997) involucrados en inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación y diferenciación celular (Rangan et al., 2009).

Su activación puede ocurrir en respuesta a la unión de ligandos a receptores; por ejemplo, TLR/IL-1, la familia de los receptores TNF unido a sus ligandos TNF, linfotóxina-1β, BAFF-R y CD40; receptores de células B, el receptor de ANG II (AT₁) e integrinas, éste último respondiendo a cambios en la composición de la matriz extracelular; así como, estresores intracelulares como, daño en DNA y producción de ROS por la mitocondria (Rangan et al., 2009).

Este factor es activado constitutivamente en las CMs, aunque un incremento en su actividad tiene como efecto su proliferación, la expresión de genes proinflamatorios y depósito de la matriz extracelular, lo que ocasiona ERC y nefropatía (Haneda et al., 2003; Rangan et al., 2009).

IL-17

La familia de la IL-17 incluye IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F y cinco receptores: IL-17RA, IL-17B, IL-17RC, IL-17RD y IL-17RE (Rodriguez-Diez et al., 2021; Turner et al., 2010). Estas interleucinas se expresan en podocitos, células epiteliales, CMs y endoteliales (Paquissi & Abensur, 2021) y son producidas por los linfocitos CD4⁺T (Th17) y CD8⁺T (Turner et al., 2010).

La IL-17A es liberada como respuesta inflamatoria, y su efecto puede variar dependiendo del tipo de célula y las condiciones patológicas. Uno de los efectos de

la IL-17A a nivel renal es la reabsorción de sodio a través de canales Na^+ - H^+ tipo 3 en el túbulo proximal y el cotransportador Na^+ - Cl^- en el túbulo contorneado distal, lo que a su vez, favorece la hipertensión (Rodrigues-Diez et al., 2021).

Además, está involucrada en la disrupción de la morfología y función de los elementos de la nefrona, la activación de vías profibróticas que resultan en fibrosis, pérdida de arquitectura y, en consecuencia, la disminución de la función renal (Paquissi & Abensur, 2021). En las CMs, la IL-17A o IL-17F estimula la liberación de las proteínas quimioatrayentes de monocitos 1 y 2 (MCP-1, MCP-2) mediante la vía MAPK (Iyoda et al., 2010).

Fibrosis

La glomeruloesclerosis es la cicatrización del glomérulo posterior a una lesión renal, que puede ser causada por daño endotelial, destrucción de podocitos, proliferación de células del músculo liso y CMs (Trachtman, 2020; Webster et al., 2017). En algunos modelos de glomeruloesclerosis, se observa un incremento significativo del mesangio, atribuido a la producción de la MM, proliferación e hipertrofia de las CMs (Y. Zhao et al., 2021). Entre los factores de riesgo se incluyen la dislipidemia, hipertensión y el tabaquismo (Webster et al., 2017).

La fibrosis renal es la consecuencia final de la progresión del daño crónico, y se caracteriza por la pérdida de las redes capilares y el aumento de depósitos de fibras de Col, ya sea en el intersticio o en los compartimentos glomerulares (J.-H. Zhao, 2019). La MM está constituida por Col IV (heterodímero $\alpha3.\alpha4.\alpha5.$) esencial para la función glomerular. Además, se ha identificado la presencia de Col III, VI, XII y XV (Bülow & Boor, 2019).

Las CMs al activarse, expresan el fenotipo miofibroblasto, lo que conlleva la expresión de proteínas que normalmente están ausentes en la MM y son difíciles de eliminar, incluyendo la sobreexpresión de Col I y III (intersticial / fibrilar); siendo el Col I (Bülow & Boor, 2019; Herrera, 2006) y la fibronectina los mayores componentes del tejido fibrótico. Además, hay modificaciones en la expresión de

MMPs, debido a alteraciones génicas o mecanismos que incluyen la activación de zimógenos y la compartimentalización de procesos de proteínas activas (Bülow & Boor, 2019; Giannandrea & Parks, 2014; Stockand & Sansom, 1998). Entre las MMPs profibróticas renales se encuentran la MMP-2, MMP-12 y MMP-9; ésta última es un potente activador de TGF- β 1 (Giannandrea & Parks, 2014).

El silenciamiento de las MMPs puede ocurrir a través de las TIMPs, como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, entre otros mecanismos, como la endocitosis y modificadores oxidativos. Un desbalance en este sistema provocará una sobreactividad de las MMPs (Giannandrea & Parks, 2014).

Entre los factores que inducen la acumulación de la MM se incluyen TGF- β , PDGF, IL-1 β , TNF- α , bFGF, ANG II, factor de crecimiento tisular conectivo (CTGF), IGF-1, eicosanoides y leptina (Gómez-Guerrero et al., 2005). Por otro lado, en estudios *in vitro* con CMs, los medios altos en glucosa inducen la expresión de factores profibróticos como TGF- β y fibronectina (Haneda et al., 2003; J.-H. Zhao, 2019).

TGF- β

Los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) son citocinas pleiotrópicas. Algunas de sus funciones incluyen la disminución de la división celular, la supresión de la respuesta inmune, la inducción de la diferenciación en ciertos tipos de células y, en condiciones patológicas, son uno de los principales inductores de la fibrosis (Schnaper et al., 2003; Song et al., 2019).

Algunos factores que influyen en su liberación incluyen calor, cambios de pH extremos, la proteólisis y la disrupción celular; por lo tanto, su modulación local es crítica para determinar sus efectos, que en condiciones patológicas se relaciona con hiperplasia, hipertrofia y proliferación de las CMs (Fu et al., 2013; Schnaper et al., 2003).

Los receptores de la familia del TGF- β corresponden a siete receptores tipo I (T β R-I) y cinco del tipo II (T β R-II), que están formados por heterodímeros ya descritos en las células renales (Schnaper et al., 2003). La vía de señalización TGF- β /Smads se activa cuando Smad2/3 es fosforilada y se une a Smad4. Este complejo es traslocado a citoplasma hacia el núcleo, regulando otros factores de transcripción (Xin et al., 2013). En las CMs *in vitro*, la activación de la vía de señalización del TGF- β 1, induce la producción de Col I, IV y fibronectina (MacKay et al., 1989). Además, la presencia de esta citocina impide la producción del activador de plasminógeno y de inhibidores de MMP, provocando la transformación de estas células al fenotipo de miofibroblastos (Fu et al., 2013; Tomooka et al., 1992).

α -SMA

En condiciones patológicas, la activación de la vía de señalización de TGF- β forma el complejo Smad, que posteriormente es translocado al núcleo para inducir la expresión de α -actina de musculo liso (α -SMA) (Song et al., 2019). Esto ocasiona hipertrofia e hiperplasia, por lo que se utiliza como marcador de fibrosis, activación y contractilidad en las CMs (Fu et al., 2013; Stephenson et al., 1998a).

En un estudio realizado en 1993 por Sterzel *et al.*, se observó que las CMs que sobreexpresan α -SMA adquieren una notable capacidad de contractilidad, lo que provoca la remodelación de la estructura renal y una esclerosis glomerular isquémica (Fu et al., 2013; Sterzel et al., 1993).

NRF2

El factor nuclear eritroide 2 (NRF2) pertenece a la familia de las proteínas cap-n-collar (Romano-Lozano et al., 2022). En condiciones fisiológicas, se encuentra secuestrado constitutivamente en citosol por proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1), que facilita la ubiquitinación de NRF2 y su degradación por el proteasoma 26S. Por el contrario, en presencia de oxidantes o electrófilos, se disocia el complejo Keap1-NRF2, permitiendo la translocación del NRF2 activado

del citosol al núcleo (Fainstein, 2007; Yao et al., 2022). Aunque se considera un marcador antioxidante, también posee efectos antifibróticos, ya que interfiere negativamente en la vía de señalización de TGF- β 1, evitando la fosforilación de Smad3, lo que lo propone como un blanco terapéutico para el tratamiento de la fibrosis (W. Wang et al., 2020).

En el mesangio, la producción excesiva de ROS es inducida por una alta concentración de glucosa, ya sea *in vivo* debido a la DM o *in vitro* al agregar concentraciones de glucosa de 20-30 mM en el medio de cultivo (Ko et al., 2008; Qiao et al., 2019; S. Wang et al., 2014). Esto ocasiona un estado continuo de estrés oxidativo, lo que lleva a las CMs a expresar enzimas antioxidantes. La activación del NRF2 previene la apoptosis y regula el estrés oxidativo mediante la liberación de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo, también liberan una gran cantidad de citocinas proinflamatorias y profibróticas, lo que contribuye al desarrollo de la ND, la causa más común de la etapa terminal de la insuficiencia renal, caracterizada por proteinuria, hipertrofia glomerular, disminución de la TFG y fibrosis renal, lo que provoca una pérdida de la función renal (Nie et al., 2021; Qiao et al., 2019; S. Wang et al., 2014).

En personas diabéticas, Nie *et al.* propone que el NRF2 se activa mediante la vía de señalización de PI3K/Akt (Nie et al., 2021).

Tratamientos comúnmente utilizados

Debido a las múltiples etiologías de la ERC, no existe una única estrategia terapéutica, y los tratamientos actuales no son eficaces contra la fibrosis (Cobo et al., 2018).

Entre los tratamientos más utilizados en personas hipertensas que padecen ERC se encuentran los bloqueadores del sistema renina-angiotensina (RAS), que son recomendados en pacientes con proteinuria o nefropatías hipertensivas. Sin embargo, estos tratamientos solo logran retrasar la progresión de la enfermedad. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y/o los

bloqueadores de AR- α son ejemplos de esta categoría, pero únicamente ralentizan la progresión de la proteinuria (Ruiz-Ortega et al., 2020).

Los antagonistas de los mineralocorticoides han demostrado ser efectivos en la reducción de la proteinuria; pero aún no existe un tratamiento que prevenga la progresión de la enfermedad renal aguda (AKI) a ERC (Ruiz-Ortega et al., 2020).

En pacientes diabéticos, se utilizan tratamientos antihipertensivos en combinación con un control glucémico. Además, se han explorado inhibidores de TGF- β , como la pirfenidona; sin embargo, su mecanismo de acción sigue siendo desconocido. Por último, los inhibidores de fosfodiesterasa, como la pentoxifilina, tiene efectos antiinflamatorios, antifibróticos y antiproteinúricos (Doshi & Friedman, 2017).

Dado que los medicamentos actuales no detienen la progresión de ERC, es crucial realizar nuevos estudios para proponer tratamientos más efectivos contra esta patología.

Tratamientos propuestos

Pioglitazona

Algunos de los agonistas del PPAR- γ son fármacos de la clase de las tiazolidinedionas (TZD), como la pioglitazona, troglitazona y rosiglitazona (Kökény et al., 2021). La pioglitazona es un polvo cristalino de coloración blanquecino con un peso molecular de 356.4 g/mol y su fórmula química es $C_{19}H_{20}N_2O_3S$ (Kim et al., 2021) (**Fig. 8**).

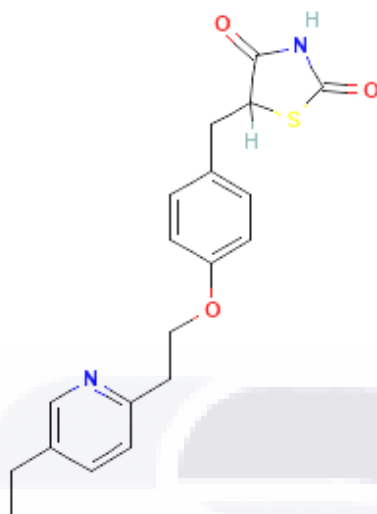


Fig. 8. Estructura química pioglitazona. Imagen tomada de PubChem (Kim et al., 2021).

Se ha observado que algunas variables alélicas y mutaciones en el gen PPAR- γ en humanos están asociadas con la obesidad y la hipertensión, lo que ha generado un creciente interés en la activación farmacológica de estos receptores mediante agonistas, prostaglandinas, TZD y agonistas de receptores de ANG II. Se espera que esto produzca efectos benéficos adicionales a los ya estudiados (Rodríguez Pérez et al., 2007). Además, se ha demostrado que en pacientes con DMT2 tratados con TZD, se presenta una reducción en la albuminuria y la nefropatía (Kökény et al., 2021; Pistrosch et al., 2012).

La pioglitazona actúa como un sensibilizante de la insulina y ayuda a controlar la hiperinsulinemia. Se administra a pacientes diagnosticados con DMT2 como un medicamento de segunda o tercera línea, ya sea como monoterapia o en combinación con metformina o sulfonilureas (Broeders & Abramowicz, 2002; Kim et al., 2021).

A pesar de que se han realizado pocos estudios sobre el uso de la pioglitazona como antifibrótico; se ha descubierto que la activación de los receptores PPAR- γ reduce la proliferación y apoptosis en las CMs activadas con ANG II

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Benkirane et al., 2006; Efrati et al., 2007; Weissgarten et al., 2006). En un estudio realizado por Efrati *et al.* en 2007, se demostró *in vivo* que en ratas hipertensas tratadas con rosiglitazona hubo una disminución en la apoptosis y proliferación de las CMs, probablemente debido a la inhibición del NF- κ B. Además, se observó una disminución de la expresión de ANG II, lo que sugiere un efecto renoprotector (Efrati et al., 2007).

En otro estudio de Ko *et al.* en 2008, se encontró que la administración de pioglitazona en ratas con DMT2 tuvo un efecto renoprotector al inhibir la activación de NF- κ B y disminuir la expresión de TGF- β y la síntesis de Col, lo que aminoró la ND (Ko et al., 2008). Estos resultados coinciden con los de Maeda *et al.* en 2005, quienes realizaron un estudio similar *in vitro* en CMs activadas con TGF- β 1 (Maeda et al., 2005).

Por otro lado, Wang *et al.* en 2014 activaron CMs *in vitro* en un medio con alta concentración en glucosa (25 mM), observando un aumento en los niveles de producción de ROS mediante la expresión de p22^{phox} y p47^{phox} (marcadores de estrés oxidativo). No obstante, al tratar estas células con pioglitazona, se observó una disminución en la expresión de estos marcadores de forma dependiente de la dosis, lo que sugiere que podría actuar como un modulador del estrés oxidativo, aunque su mecanismo de acción sigue siendo desconocido (S. Wang et al., 2014).

Además de sus efectos antiinflamatorios, se han comenzado a investigar sus efectos antihipertensivos, que indirectamente contribuyen a la disminución del daño renal. Esto se debe a la gran cantidad de receptores PPAR- γ expresados en el mesangio. De hecho, se ha observado que la presencia de agonistas de PPAR- γ produce mejores resultados que la supresión de la actividad del RAS mediante inhibidores de la enzima convertidora de la ANG II (Efrati et al., 2007).

Tamsulosina

La tamsulosina es una sulfonamida que actúa como antagonista de los AR- α_{1A} y AR- α_{1D} . Tiene un peso molecular de 408.5 g/mol y su fórmula química es $C_{20}H_{28}N_2O_5S$ (**Fig. 9**) (Kim et al., 2021).

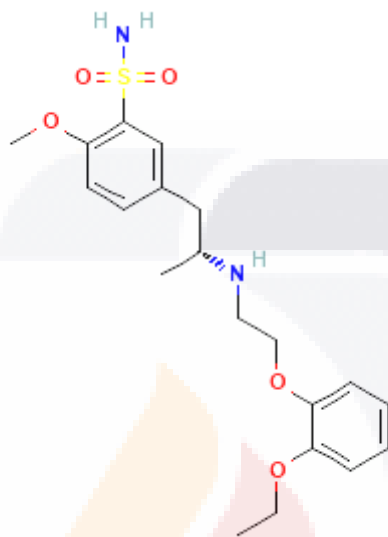


Fig. 9 Estructura química de la tamsulosina. Imagen tomada de Pubchem (Kim et al., 2021).

Este tratamiento se utiliza principalmente para aliviar los síntomas de hiperplasia prostática benigna; además, se aplica en el tratamiento de cálculos renales, uretrales, prostatitis y disfunción de la micción femenina (Kim et al., 2021).

Sin embargo, en la patología de la ERC, la actividad simpática renal desempeña un papel importante en las condiciones fisiológicas y patológicas, interactuando con el sistema vascular renal mediante la liberación de NAd, lo que regula el tono vascular y la reabsorción de sodio y agua (Ren et al., 2020).

Por otro lado, se ha observado que la tamsulosina disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y IL-8, lo que contribuye a la reducción en la liberación de TGF- β y Col I, lo que reduce la fibrosis en células HK-2 y en modelos de rata (**Fig. 10**). Sin embargo, se desconoce su mecanismo de

acción (Sun et al., 2021), y no se han realizado estudios *in vitro* sobre su efecto en las CMs activadas.

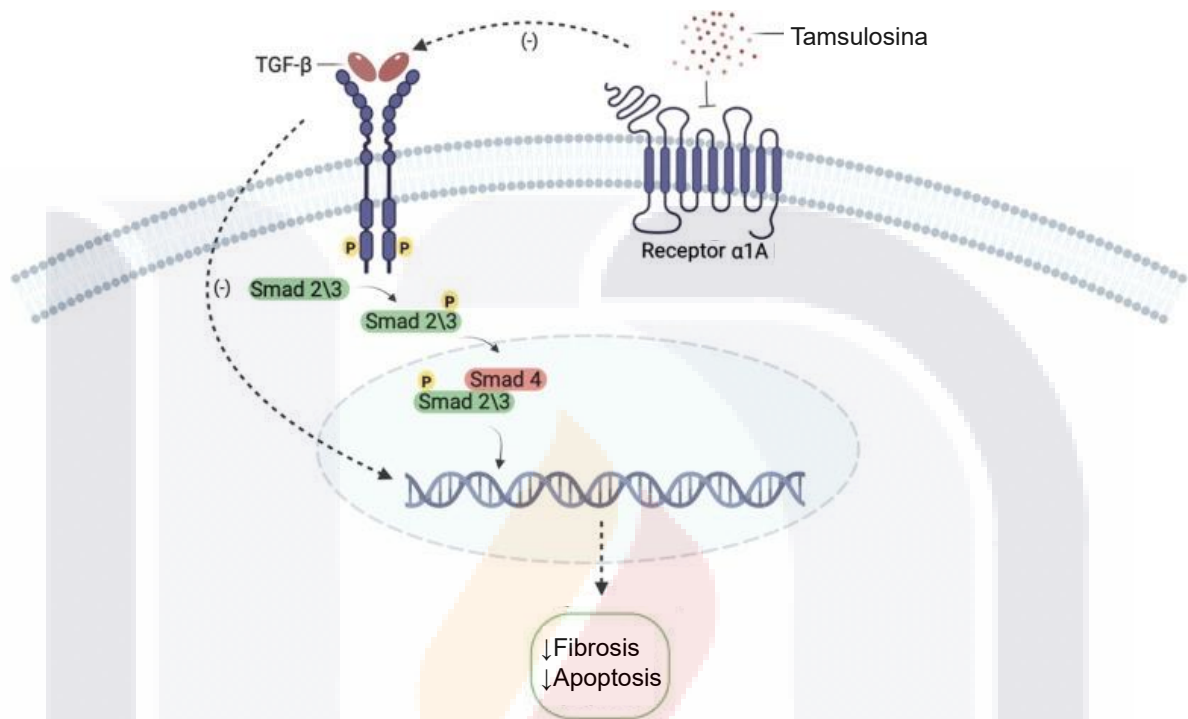


Fig. 10. Efecto de la tamsulosina a nivel celular. Al unirse la tamsulosina a su AR- α_1 , provoca la disminución de TGF- β , evitando así la fibrosis y apoptosis celular. Imagen modificada de (Alrasheed et al., 2023).

Justificación

En el 2022, la incidencia a nivel mundial de la ERC superó el 10% de la población en general, afectando a más de 800 millones de personas. Esta condición se encuentra entre las principales causas de muerte y su prevalencia ha ido en aumento, especialmente en personas mayores y mujeres, así como aquellos con DM e hipertensión (Kovesdy, 2022; Ruiz-Ortega et al., 2020). En 2021, el estado de Jalisco ocupó el primer lugar a nivel mundial en la tasa de desarrollo de la etapa terminal la ERC por millón de habitantes, mientras que Aguascalientes ocupó el sexto lugar (National Institutes of Health, 2023).

En México, según datos del INEGI, en 2021 la insuficiencia renal crónica fue la novena causa de muerte en personas mayores de 50 años (INEGI, 2022). En Aguascalientes, en 2022, se reportó una prevalencia de 2,183 pacientes por millón de habitantes (ISSEA, 2022).

La ERC es un síndrome secundario que resulta de alteraciones en la función y/o estructura renal (Ammirati, 2020; Charles & Ferris, 2020). Se define por una TFG $<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ o por la presencia de albuminuria patológica durante un período mayor o igual a 3 años. Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de nefronas, una reducción de la capacidad regenerativa, daño microvascular, cambios metabólicos, estrés oxidativo e inflamación, lo que lleva a la fibrosis (Martínez Ginarte. et al., 2020; Ruiz-Ortega et al., 2020).

La fibrosis es parte del proceso de reparación tisular, que busca preservar la arquitectura e integridad del tejido. Sin embargo, cuando hay desregulación en este proceso y existe una sobreexpresión de proteínas de la MM, especialmente el Col, que puede desencadenar complicaciones (Ruiz-Ortega et al., 2020).

Uno de los principales desafíos en el manejo de esta patología es la falta de terapias efectivas, así como la diversidad de mecanismos moleculares e inflamatorios involucrados en la ERC, lo que complica aún más su tratamiento. A menudo, se requieren altas dosis de medicamentos para lograr efectos terapéuticos, lo que puede aumentar el riesgo de eventos adversos (Nastase et al., 2018; J.-H. Zhao, 2019).

Se proponen dos tratamientos: primero, la tamsulosina, que actúa bloqueando los receptores α_1 -adrenérgicos, disminuyendo la liberación de citocinas proinflamatorias y, en consecuencia, reduciendo la expresión de TGF- β y Col I (Sun et al., 2021). Por otro lado, la pioglitazona, un agonista de los receptores de PPAR- γ , ha demostrado ser un transreprimidor del NF- κ B, disminuyendo también la expresión de TGF- β y por ende, la fibrosis (Ko et al., 2008; Maeda et al., 2005). Sin embargo, no se han realizado estudios *in vitro* que evalúen el efecto antifibrótico y

antiinflamatorio de ambos medicamentos en las CMs (Ko et al., 2008; Maeda et al., 2005; S. Wang et al., 2014).

Esto da origen a la siguiente pregunta de investigación:

¿El tratamiento con tamsulosina y pioglitazona tiene efecto *in vitro* sobre la actividad proinflamatoria y profibrótica de las células SV40 MES 13 inducidas por alta glucosa y NAd?

Hipótesis

El tratamiento de tamsulosina y pioglitazona tiene efecto inhibitorio sobre la actividad proinflamatoria y profibrótica en las células mesangiales SV40 MES 13 inducidas con alta glucosa y noradrenalina.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de la tamsulosina y pioglitazona sobre la actividad proinflamatoria y profibrótica de las células mesangiales SV40 MES 13 inducidas con alta glucosa y noradrenalina.

Objetivos específicos

- Evaluar citotoxicidad/viabilidad del cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de pioglitazona y tamsulosina en presencia y ausencia de sus estimulantes.
- Evaluar marcadores en células mesangiales relacionados con procesos inflamatorios (IL-1 β , NF- κ B e IL-17), antiinflamatorios (moduladores del NRF2) y fibrogénicos (Col I, α -SMA y TGF- β) estimuladas con noradrenalina o medio alto en glucosa en presencia o ausencia de los fármacos de pioglitazona y tamsulosina.

Metodología

Cultivo primario de CMs

Se utilizaron tres ratas Wistar macho de 100 a 150 g, proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las ratas fueron resguardadas en el bioterio bajo condiciones controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. La dieta consistió en alimento para roedores y agua filtrada *ad libitum*.

La metodología para la obtención del cultivo primario de CMs se basó en el trabajo de Menè y Stoppacciaro con modificaciones en su procedimiento (Menè & Stoppacciaro, 2009). Se administró una dosis de 5 mg de cefalexina por vía intragástrica durante 4 días para disminuir la carga microbiana en vías urinarias. Posteriormente, en el día 5, las ratas fueron sometidas a eutanasia mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital ($>100\text{mg/kg}$).

Se realizó una nefrectomía bilateral mediante un corte en el hilio en condiciones asépticas, obteniendo ambos riñones a través de una incisión toracoabdominal y desinfectando la superficie de la piel con alcohol al 70%. Los riñones se colocaron en una solución fría de buffer EBSS (**Anexo A**) con ceftriaxona ($10\ \mu\text{g/mL}$) durante 10 min. A continuación, se retiró la cápsula renal mediante un raspado con pinzas de punta fina, realizando un corte longitudinal.

El tejido cortical se extrajo con un bisturí, cortándolo en pequeños trozos hasta formar una pasta, que se dejó reposar en EBSS frío con ceftriaxona durante 5 minutos para disminuir la carga bacteriana. Luego, el tejido se pasó a una malla de acero inoxidable de 80 mesh ($180\ \mu\text{m}$), presionando delicadamente con una espátula y recolectando la pasta sobre la malla, realizando lavados con buffer EBSS con ceftriaxona.

La pasta recolectada se resuspendió en una solución estéril de colagenasa P (Roche, 11213865001) y EBSS ($2.5\ \text{mg/mL}$), agitando cuidadosamente a $37\ ^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. La suspensión glomerular se aspiró con una jeringa de 10 mL,

forzando la salida del líquido de 2 a 3 ocasiones para eliminar de la cápsula el 75% de los glomérulos. Este proceso se repitió en dos series: la primera con una aguja de 18 G y la segunda con una aguja de 21 G.

Finalmente, se centrifugó la suspensión durante 10 minutos a 2,500 rpm y se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R8758-1L) suplementado (**Anexo B**) con gentamicina (100 µg/mL, BioReagent, G1397-10ML). Este paso se repitió para realizar un lavado, antes de colocar la suspensión celular en un frasco T25, incubando a 37 °C en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂. Se realizó el primer cambio de medio a las 8 horas, utilizando RPMI 1640 suplementado con gentamicina (100 µg/mL).

La purificación del cultivo se obtuvo a través de los pases realizados, llevando a cabo los experimentos entre el pase 4 y 10, utilizando medio DMEM/F12 (10-090-CV, Corning) suplementado con insulina humana (0.67 U/mL, Farmacias del ahorro) y suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich, F4135) al 10%. Para la caracterización del cultivo de CMs, se sembraron 25,000 células/pozo y se propagaron en la placa durante 48 horas, para luego proceder a la caracterización del cultivo mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se utilizaron como anticuerpos primarios Thy 1 (rata anti-rata, R&D Systems, MAB7335) y α-SMA (ratón anti-rata, Sigma-Aldrich, A5228), ambos en una dilución 1:1000; como anticuerpo secundario, se utilizó Alexa Flúor™ 488 (cabra anti-rata para Thy 1, Life technologies, A11006) y Alexa Flúor™ 594 (cabra anti-ratón para α-SMA, Life technologies, A-11005), también en una dilución 1:1000.

Adicionalmente, se realizaron experimentos utilizando la línea celular de CMs de ratón (*Mus musculus*) SV40 MES 13, donada por el laboratorio de inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), empleando medio de cultivo DMEM/F12, suplementado con SFB al 5%, así como penicilina (1000 U/mL) y estreptomocina (1000 µg/mL) (Caisson, ABL02).

Para la propagación de ambos cultivos, una vez que las células alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia, fueron desprendidas utilizando tripsina-

EDTA al 0.25% (p/v) (Sigma-Aldrich, T4049) y posteriormente transferidas a un frasco de cultivo T-25, en el que se sembraron 15×10^3 células. El medio de cultivo se reemplazó cada 72 horas.

Para la toma de imágenes, se utilizó la cámara digital CoolSNAP-Pro acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40, y su posterior análisis con ayuda software Fiji is just ImageJ (Versión 1.53c, descargado de la página <https://imagej.net/Fiji/Downloads>) (Schindelin et al., 2012).

Ensayo MTT

El ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se realizó para evaluar la viabilidad celular. Las células SV40 MES 13 (3×10^3 células/pozo) se sembraron en placas de 96 pozos y se incubaron con D-(+)-glucosa (20 mM; Sigma-Aldrich, G7021) y/o NAd (10 nM; Sigma-Aldrich, A7257) y tratadas con tamsulosina (50 nM; Sigma-Aldrich, T1330) o pioglitazona (100 nM; Sigma-Aldrich, E6910) durante 24 h. Posteriormente, se añadieron 10 μ L de la solución de MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, M5655) a cada pozo y se incubaron durante 4 h. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich, D1435) para disolver los cristales de formazán-MTT. Finalmente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 490 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-Rad).

SYTOX™ green

Las células SV40 MES 13 (3×10^4 células/pozo) se cultivaron y se indujeron con glucosa (20 mM) y/o NAd (10 nM) y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM) durante 24 horas en placas de 24 pozos. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X (**Anexo C**), se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min y se incubaron con SYTOX Green (60 mM; Invitrogen, S7020) durante 17 min a 37 °C para la detección de ácidos nucleicos. La detección de la fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Axiovert 40 CFL (ZEISS) acoplado a una cámara

ZEISS Axiovert 40 CFL (ZEISS) con un filtro ajustado a una longitud de excitación de 450–490 nm (verde).

Detección de la formación de superóxido mitocondrial

Las células SV40 MES 13 fueron inducidas con glucosa (20 mM) y/o NAd (10 nM) y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM) durante 4 horas en placas de 24 pozos. Posteriormente, se lavaron brevemente con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con MitoSOX Green (2 µM, Invitrogen, M36006).

La detección de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Axiovert 40 CFL (ZEISS) acoplado a una cámara ZEISS Axiovert 40 CFL (ZEISS), con un filtro ajustado a una longitud de onda de excitación de 450–490 nm (verde).

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia del superóxido mitocondrial se efectuó mediante el software Fiji Is Just, versión 1.54f. Las imágenes se convirtieron inicialmente a escala de grises de 8 bits y la intensidad de fluorescencia se midió y expresó en unidades relativas de fluorescencia, estableciendo un umbral para todos los píxeles dentro del área indicada.

Medición de Ca²⁺ intracitoplasmático

Las células SV40 MES 13 (3×10^4 células/pozo) fueron inducidas con glucosa (20 mM) y/o NAd (10 nM) y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM) durante 4 horas en placas de 24 pozos. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos. A continuación, las células se incubaron con Fura-2 AM (1 µM, Invitrogen, F1201) durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron con PBS 1X.

La detección de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Axiovert 40 CFL (ZEISS) acoplado a una cámara ZEISS Axiovert 40 CFL (ZEISS) con un filtro ajustado a una longitud de excitación de 450–490 nm (verde).

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia del calcio citoplasmático se llevó a cabo con el software Fiji Is Just (v1.54f; Wayne Rasband, National Institutes of Health). Las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits, y la intensidad de fluorescencia se midió y expresó como unidades relativas de fluorescencia, definiendo como umbral todos los píxeles dentro del área señalada.

Ensayo de detección de F-actina

Las células SV40 MES 13 (3×10^4 células/pozo) fueron inducidas con glucosa (20 mM) y/o NAd (10 nM) y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM), se cultivaron e indujeron durante 24 horas en placas de 24 pozos con glucosa (20 mM) y/o tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM). Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Después de un lavado con PBS 1X, las células se incubaron con rodamina-faloidina (6.6 μ M, Invitrogen, R415) a temperatura ambiente durante 30 minutos para la detección de F-actina.

A continuación, los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33258 (1:1000, Sigma-Aldrich, 94403). La detección de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Axiovert 40 CFL (ZEISS) acoplado a una cámara ZEISS Axiovert 40 CFL (ZEISS), empleando filtros con longitudes de excitación de 546/12 nm (rojo) y 365 nm (azul).

Inmunofluorescencia

Después de 24 horas de inducir las células (3×10^3 células/pozo). La fijación se realizó con metanol frío durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Los anticuerpos policlonales utilizados conejo anti-ratón fueron NF- κ B_{p65} (Invitrogen, 44-711G), IL-17A (Abcam, ab214588), Col I (Novus Biologicals, NB600-408) y TGF- β 1 (Novus Biologicals, NBP1-03276). Por otro lado, los anticuerpos monoclonales (ratón anti-ratón) utilizados fueron α -SMA (Sigma-Aldrich, A5228) y NFR2 (Cell Signaling, D1Z9C).

El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1:1000, utilizando Alexa Fluor™ 594 (Life technologies, A-11005) para α -SMA y Alexa Fluor™ 488 (Life technologies, A11008) para los demás anticuerpos, incubándolo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó el Hoechst (1:1000, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Para realizar el montaje de las laminillas se utilizó glicergel (Dako, C0563), almacenando las laminillas en una cámara húmeda a una temperatura de 4 °C.

Para la prueba de cuantificación de células/mm², sólo se fijaron las células y se agregó Hoechst 1:1000, cuantificando núcleos por campo.

Para la toma de imágenes, se utilizó la cámara digital CoolSNAP-Proof acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. El análisis se realizó con ayuda software Fiji is just ImageJ (Versión 1.53c, descargado de la página <https://imagej.net/Fiji/Downloads>) (Schindelin et al., 2012).

RT-qPCR

Después de 24 horas de inducción, las células fueron tratadas según corresponda a cada grupo con NAd (10 nM), glucosa alta (20 mM) y tratadas con tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM).

Las células (3×10^4 células/pozo) fueron procesadas con el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep®, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue cuantificado con el Biodrop (Isogen Life Science) y almacenado a -80 °C hasta su uso.

La transcripción reversa se realizó con 1 μ g de ARN total utilizando el kit RevertAid First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, K1621). Posteriormente, se llevó a cabo la RT-qPCR utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, K0221) en el dispositivo StepOne (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 50 °C por 2 minutos, 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 45 segundos y 55 °C para el gen de IL-1 β o 58 °C para los demás marcadores por 40 segundos.

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 1**. La expresión relativa fue normalizada contra GAPDH como gen constitutivo; las diferencias fueron determinadas empleando el método relativo de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Secuencias
IL-1β	<i>F-TGCCACCTTTTGACAGTGATG R-AAGGTCCACGGGAAAGACAC</i>
IL-17A	<i>F-CCCCTTCACTTTCAGGGTCCG R-GGGGGTTTCTTAGGGGTCAG</i>
NRF2	<i>F-CTAAAGCACAGCCAGCACAT R-TGTCTTTTGTGAATGGGGCTTT</i>
NF-κB	<i>F-ACTGGAGTTGTACGGCAGTG R-TGTAAAATGCATAAACGGGGAAA</i>
α-SMA	<i>F-GTACCCAGGCATTGCTGACA R-GAGGCGCTGATCCACAAAAC</i>
Col I	<i>F-GGGGCAAGACAGTCATCGAA R-GAGGGAACCAGATTGGGGTG</i>
TGF-β1	<i>F-ACTGGAGTTGTACGGCAGTG R-GGGGCTGATCCCGTTGATTT</i>
ADRA1A	<i>F-GGTCTGCTAGAGCCATCCTG R-TGATCTTGGTGTCTGCAAGC</i>
ADRA1B	<i>F-CGCCCACCAACTACTTCATT R-AATGGAGATGGCACATAGGC</i>
ADRB1	<i>F-CGGCCTTTCGTGTGTTTAAT R-CACACCAAACCTGAGCTGAA</i>
ADRB2	<i>F-TGGTTGGGCTACGTCAACTC R-TCCGTTCTGCCGTTGCTATT</i>
ADRB3	<i>F-GACAGCCTCAAATGCATCCT R-CCCAGTCCACACACCTTTCT</i>
GAPDH	<i>F-AGTCTACTGGCGTCTTCACC R-CCACGATGCCAAAGTTGTCA</i>

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos.

Extracción de proteínas

Después de 24 horas de inducción, las células fueron tratadas, según correspondiera a cada grupo experimental, con NAd (10 nM), glucosa alta (20 mM), y/o tamsulosina (50 nM) o pioglitazona (100 nM) en flask T-25.

Posteriormente, las células se desprendieron mediante tripsina y se realizaron dos lavados con PBS estéril, centrifugando a 4 °C a 2,000 rpm. Las células se resuspendieron en frío en 30 µL de tampón RIPA (Sigma-aldrich, R0278) con inhibidores de proteasas (Sigma-aldrich, S8820), y se sometieron a cuatro agitaciones vigorosas de 10 segundos cada una, con intervalos de reposo de 5 minutos entre cada agitación. Finalmente, se agitaron suavemente en frío durante 45 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante obtenido se recuperó y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

Western blot

La concentración proteica se cuantificó mediante el método de Bradford. Se cargaron 20 µg de proteína por carril, las cuales se separaron por SDS-PAGE utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12% (**Anexo D**), mediante electroforesis (15 min a 80 V y posteriormente a 110 V hasta que las proteínas alcanzaron el final del gel) (**Anexo E**).

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante transferencia húmeda (12 mA, 24 horas, 4 °C) (**Anexo E**).

Las membranas se bloquearon con 5% de leche en TBS-T (**Anexo E**) durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-NF-κB (cabra anti-conejo, 1:1,000; Invitrogen, 44-711G) y anti-α-SMA (ratón anti-ratón, 1:1,000; Sigma-Aldrich, A5228). Después de tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP: cabra anti-conejo (1:3,000; Invitrogen, 31460) y cabra anti-ratón (1:3,000; Invitrogen, 31430). Para la normalización se utilizó GAPDH (1:1,000; Invitrogen, MA5-15738).

La detección se realizó mediante el kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, 170-5060). La cuantificación densitométrica se llevó a cabo utilizando el

software ImageJ, y los valores obtenidos se normalizaron con respecto a GAPDH. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Tras el revelado, las membranas se lavaron dos veces con TBS-T (10 minutos cada lavado) y una vez con TBS (10 minutos). Posteriormente, se dejaron secar y se almacenaron para su uso posterior.

Se realizaron varios lavados a cada membrana mediante la técnica de *stripping*. Inicialmente, la membrana se activó con metanol (por 10 minutos) y posteriormente se realizaron dos lavados con TBS durante 10 minutos. Después, se efectuaron dos incubaciones de 10 minutos con glicina ácida (**Anexo F**), seguidas de dos lavados de 10 minutos con TBST. Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de TBST con 5% de leche, y se continuó con los pasos habituales de la técnica de Western blot.

Consideraciones éticas de estudio

Se realizó de acuerdo con el reglamento de ética para el uso de animales en la docencia e investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA), así como las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Resultados

Obtención y caracterización de CMs

Al día 12 del cultivo primario (**Fig. 11-A**), se observó una heterogeneidad celular, identificándose dos morfologías distintas. La primera, de forma poligonal y formando una monocapa, correspondiente a células epiteliales; por otro lado, estrellada y en multicapa, propia de las CMs (**Fig. 12**). Comparativamente, en el día 23, se obtuvo un cultivo purificado de CMs, observándose una morfología homogénea (**Fig. 11-B**).

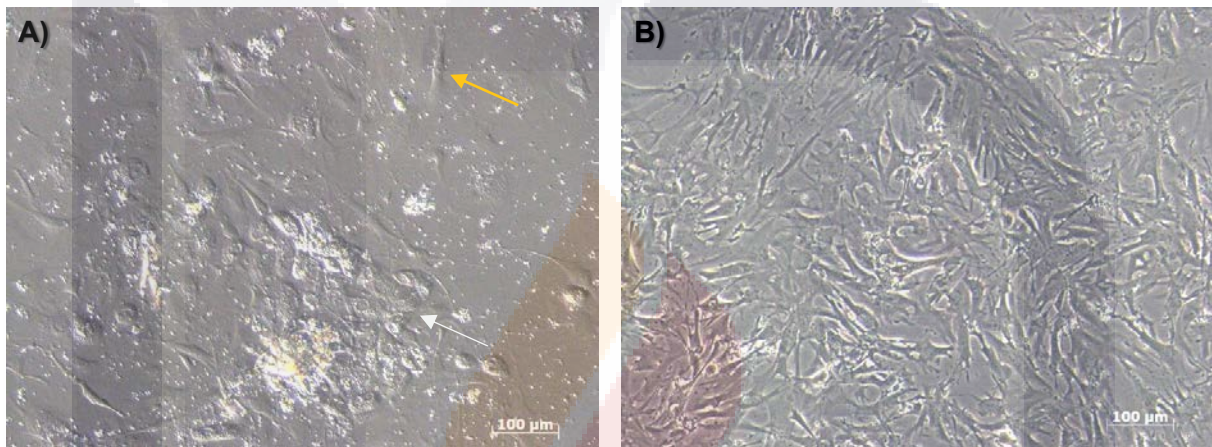


Fig. 11 Cultivo primario de CMs. A) Día 12 de cultivo. Se observa una morfología heterogénea con presencia de células mesangiales (CMs, flecha naranja) y células epiteliales (flecha blanca). **B)** Día 23 de cultivo. Se observa una morfología homogénea correspondiente a un cultivo purificado de CMs. Las imágenes fueron tomadas a 100× mediante microscopía de contraste de fases, utilizando la cámara digital AxioCam MRc acoplada al microscopio ZEISS Axiovert 40 CFL.

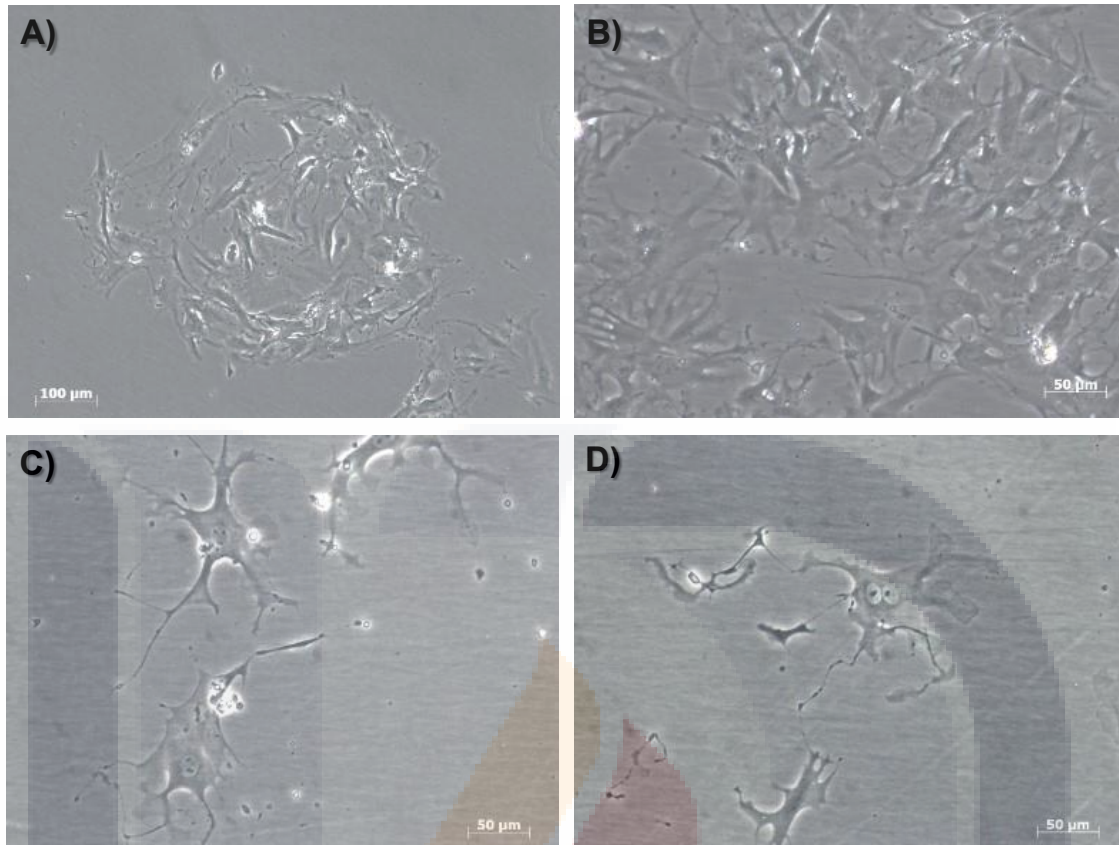


Fig. 12. Morfología de CMs de cultivo primario. Las células presentan una morfología estrellada, con proyecciones espinosas, crecimiento en multicapa y un tamaño mayor a 100 µm. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de fases: **A)** 100x y **B–D)** 200x, utilizando la cámara digital AxioCam MRc acoplada al microscopio ZEISS Axiovert 40 CFL.

En cuanto a la caracterización diferencial, se realizó una inmunofluorescencia de marcaje simple en el pase 3, mostrando positividad para los marcadores Thy-1 y α -SMA. No obstante, la organización de las fibras de α -SMA del citoesqueleto forma líneas paralelas de extremo a extremo de la célula (**Fig. 13-A,B**).

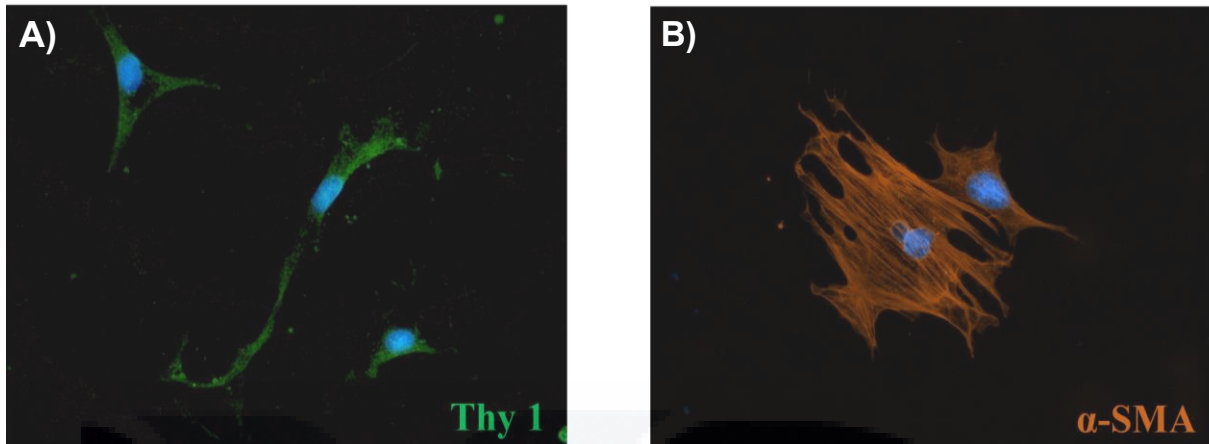


Fig. 13. Caracterización de CMs. A) Positividad para el marcador Thy-1 y B) para α -SMA mediante inmunofluorescencia. Las imágenes fueron tomadas a 400x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Procf acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40.

Modelo experimental en línea celular SV40 MES 13

Las CMs de ratón (*Mus Musculus*) correspondientes a línea celular SV40 MES 13 son de menor tamaño comparativamente con las obtenidas en cultivo primario de rata; además, sus prolongaciones son más cortas, manteniendo ambas una morfología estrellada y alargada (**Fig. 14-A,B**).

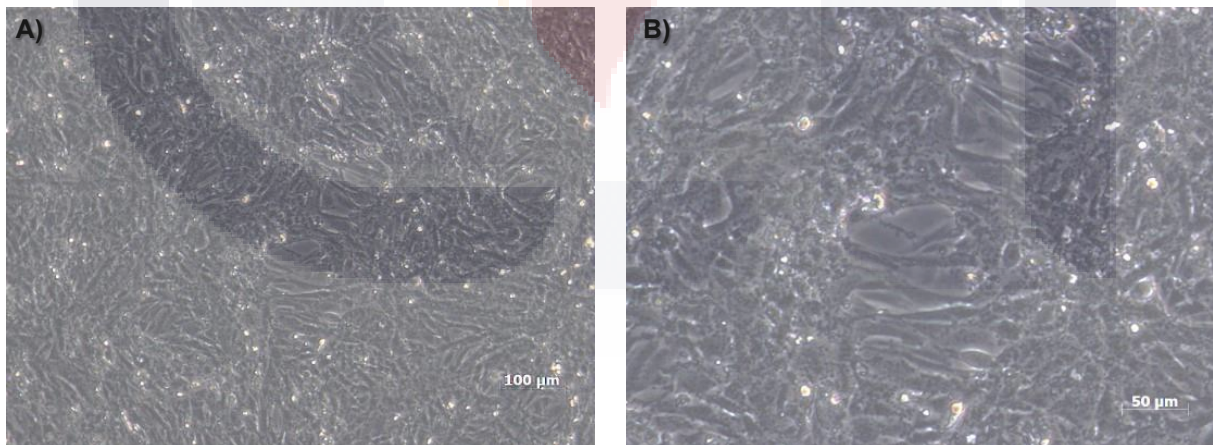


Fig. 14. Línea celular SV40 MES13. Se observa una morfología alargada; las células presentan menor tamaño y mayor capacidad de proliferación en comparación con el cultivo primario. A) 100x y B) 200x. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de fases utilizando la cámara digital AxioCam MRc acoplada al microscopio ZEISS Axiovert 40 CFL.

En CMs de cultivo primario esta reportado que existe la expresión de receptores adrenérgicos del tipo α y β ; sin embargo, en la línea celular SV40 MES 13 no ha sido

reportado previamente, por lo que se realizó una PCR de punto final para comprobar la presencia de estos receptores, encontrando la expresión de los receptores AR- α_1 , AR- α_2 , AR- β_1 AR- β_2 y AR- β_3 (**Fig. 15**).

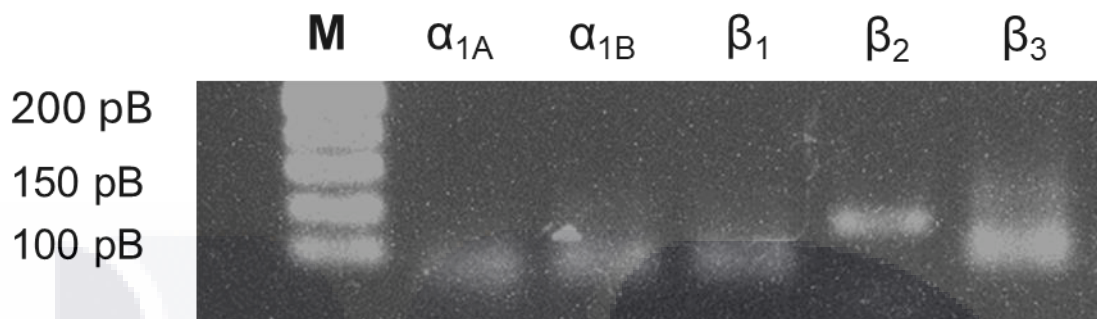


Fig. 15. Expresión de receptores adrenérgicos en línea celular SV40 MES13. Se observó la expresión de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} , β_1 , β_2 y β_3 .

Además, se realizó la técnica de RT-qPCR para evaluar la expresión génica de los receptores adrenérgicos ADRA1A y ADRA2B tras la exposición a distintos inductores y/o tamsulosina. La exposición a un medio alto en glucosa indujo un incremento en la expresión del gen ADRA1A, con un aumento de 1.36 veces respecto al grupo control. La combinación de glucosa con NAd provocó una mayor sobreexpresión, alcanzando un incremento de 1.87 veces, mientras que la estimulación únicamente con NAd resultó en una elevación de 0.77 veces.

En contraste, el tratamiento con tamsulosina ejerció un efecto inhibitorio sobre la expresión génica de ADRA1A. La co-estimulación con NAd y tamsulosina redujo la expresión a 0.424 veces en comparación con el control. De manera similar, en las células tratadas con glucosa y NAd, la adición de tamsulosina disminuyó la expresión a 0.22 veces, mientras que la exposición simultánea a ambos inductores (glucosa + NAd) en presencia de tamsulosina redujo la expresión a 0.564 veces (**Fig. 16-A**).

Por el contrario, la expresión de ADRA2B mostró un patrón inverso al observado en ADRA1A. La estimulación con NAd indujo una disminución en su expresión (0.516 veces), mientras que la exposición a glucosa y a ambos inductores aumentó la expresión génica a 1.201 y 2.84 veces, respectivamente. En presencia de tamsulosina, se observó un incremento de la expresión a 2.535 veces en células tratadas con NAd,

y una disminución a 0.164 y 0.719 veces en células tratadas con glucosa o con ambos inductores, respectivamente (**Fig.16-B**).

Por otro lado, el tratamiento con pioglitazona disminuyó ligeramente la expresión de α 1-AR (0.73 veces), mientras que la expresión de β 2-AR fue similar a la observada en el grupo de alta glucosa, mostrando una reducción en su expresión (0.13 veces).

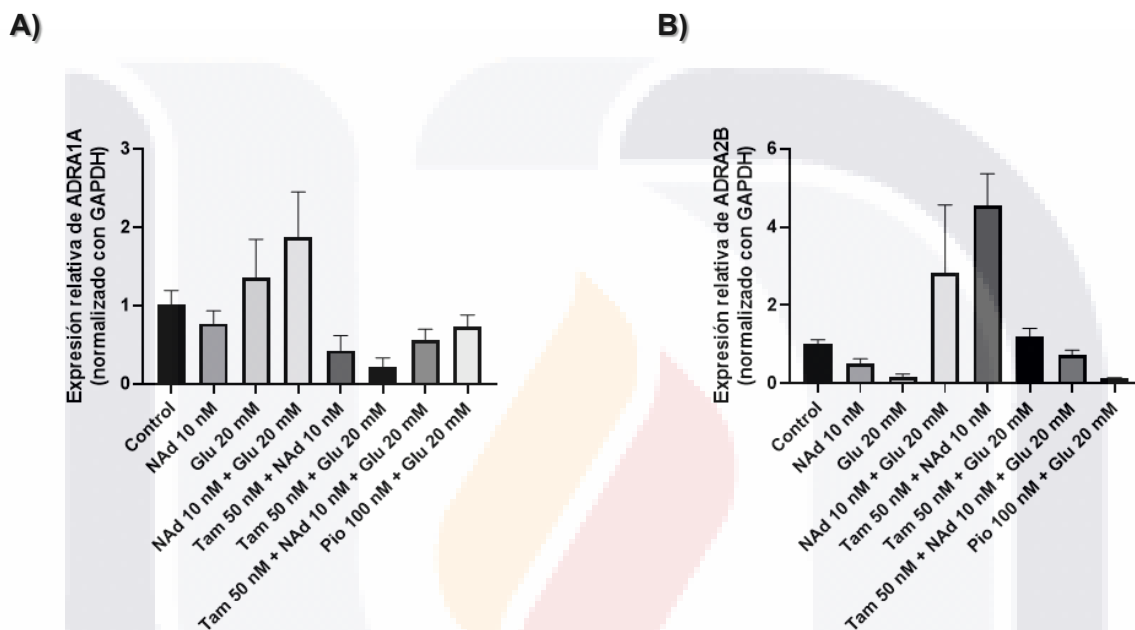


Fig. 16. Expresión génica de los ADRA1A ADRA2B. A) Expresión del gen ADRA1A. Se observó una mayor expresión en el grupo tratado con glucosa y NAd; sin embargo, el tratamiento con tamsulosina disminuyó significativamente su expresión. **B)** Expresión del gen ADRA2B. Se observó una mayor expresión en el grupo tratado con tamsulosina y NAd.

Pruebas de Viabilidad/Citotoxicidad

La activación de las células con NAd y glucosa a distintas concentraciones permitió determinar las condiciones óptimas para la viabilidad celular. Las concentraciones más efectivas fueron 10 nM de NAd, con una viabilidad del 106.87% ($*p < 0.05$) (**Fig. 17-B**) y un índice de permeabilidad celular de 2.01 ($****p < 0.0001$) (**Fig. 18-A,B**), y 20 mM de glucosa, con una viabilidad del 107.10% ($*p < 0.05$) (**Fig. 17-D**) y un índice de permeabilidad de 2.97 ($*p < 0.05$) (**Fig. 18-C,D**). No obstante, NAd

presentó un efecto citotóxico dependiente de la concentración, siendo más evidente a 10 μM , donde la viabilidad celular disminuyó a 90.24% y la permeabilidad aumentó a 3.13 ($****p < 0.0001$). En contraste, la glucosa mostró un efecto proliferativo a concentraciones más elevadas, alcanzando una viabilidad del 110.67% a 25 mM ($**p < 0.01$) y del 115.25% a 30 mM ($***p < 0.001$) con un índice de permeabilidad celular de 3.28 ($**p < 0.01$) y 3.36 ($***p < 0.001$) respectivamente.

En el cultivo primario, al ser activada con NAd (**Fig. 17-A**) y glucosa (**Fig. 17-C**), se observó un efecto similar al de la línea celular; sin embargo, con la NAd, a partir de la concentración de 10 μM , se produjo un aumento en la proliferación del 129.11%.

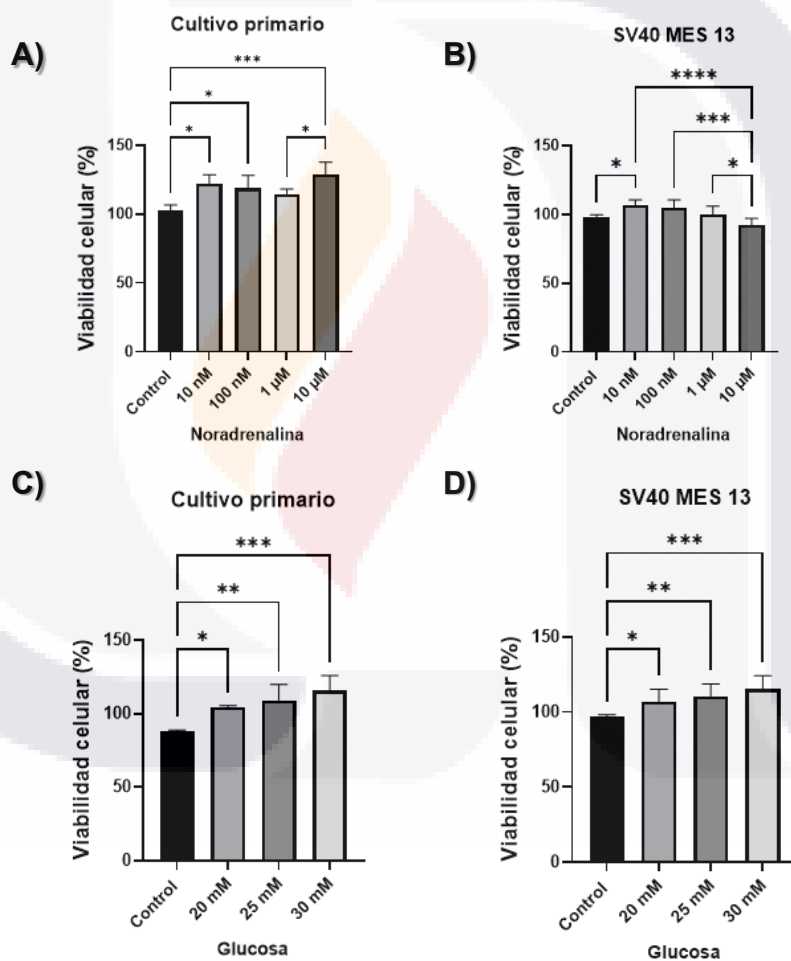


Fig. 17. Prueba de viabilidad para NAd y glucosa. A–B) En el cultivo primario, la NAd mostró un comportamiento similar al observado en la línea celular, con excepción de la concentración de 10 μM , la cual presentó un efecto proliferativo. La glucosa mostró un comportamiento similar. **C–D)** En la línea celular SV40 MES 13 se observó una mayor activación celular a 10 nM de NAd y 30 mM de glucosa. Valores $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$.

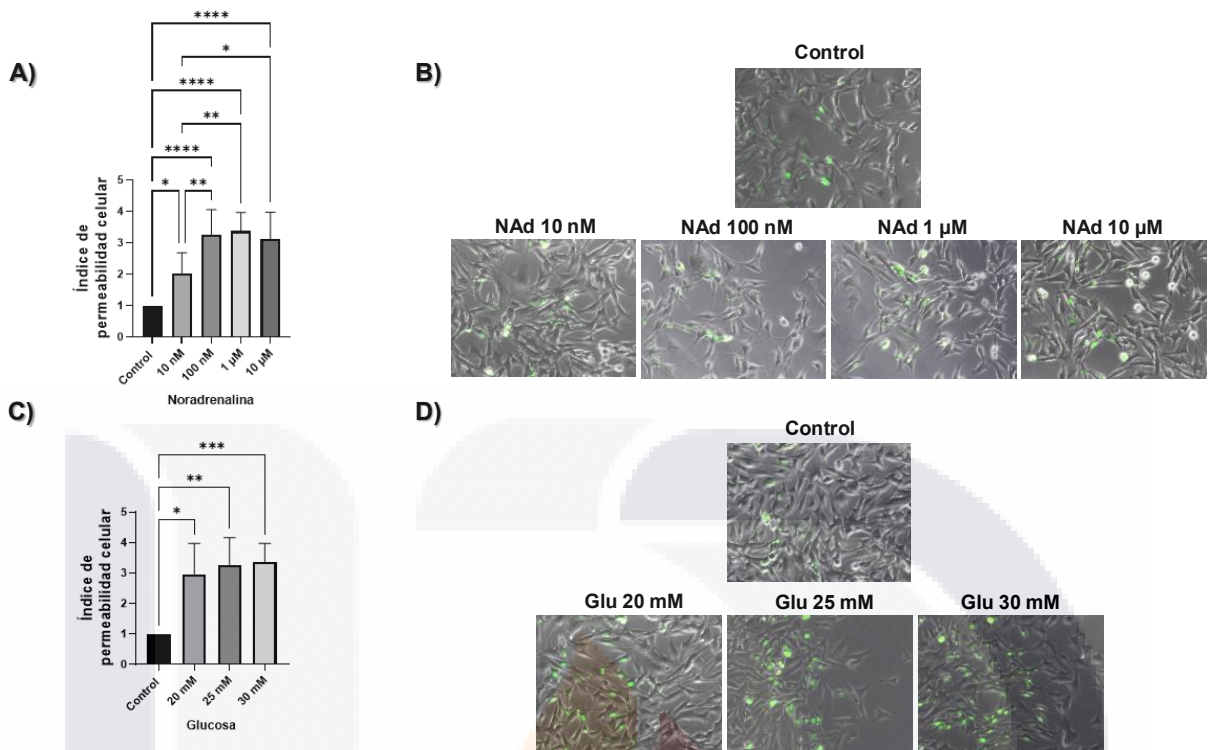


Fig. 18. Prueba de permeabilidad celular para NAD y glucosa. Se observó que la menor permeabilidad celular se presentó a una concentración de 10 nM de NAD y 20 mM de glucosa. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

En la evaluación de proliferación y permeabilidad celular frente a los tratamientos con tamsulosina (**Fig. 19**) o pioglitazona (**Fig. 20**), no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular (**Fig. 19-A**) tras la administración de tamsulosina a distintas concentraciones, manteniéndose relativamente constante. No obstante, el índice de permeabilidad celular más bajo se registró a 50 nM, con un valor de 1.75, por lo que esta concentración fue seleccionada para experimentos posteriores (**Fig. 19-B,C**).

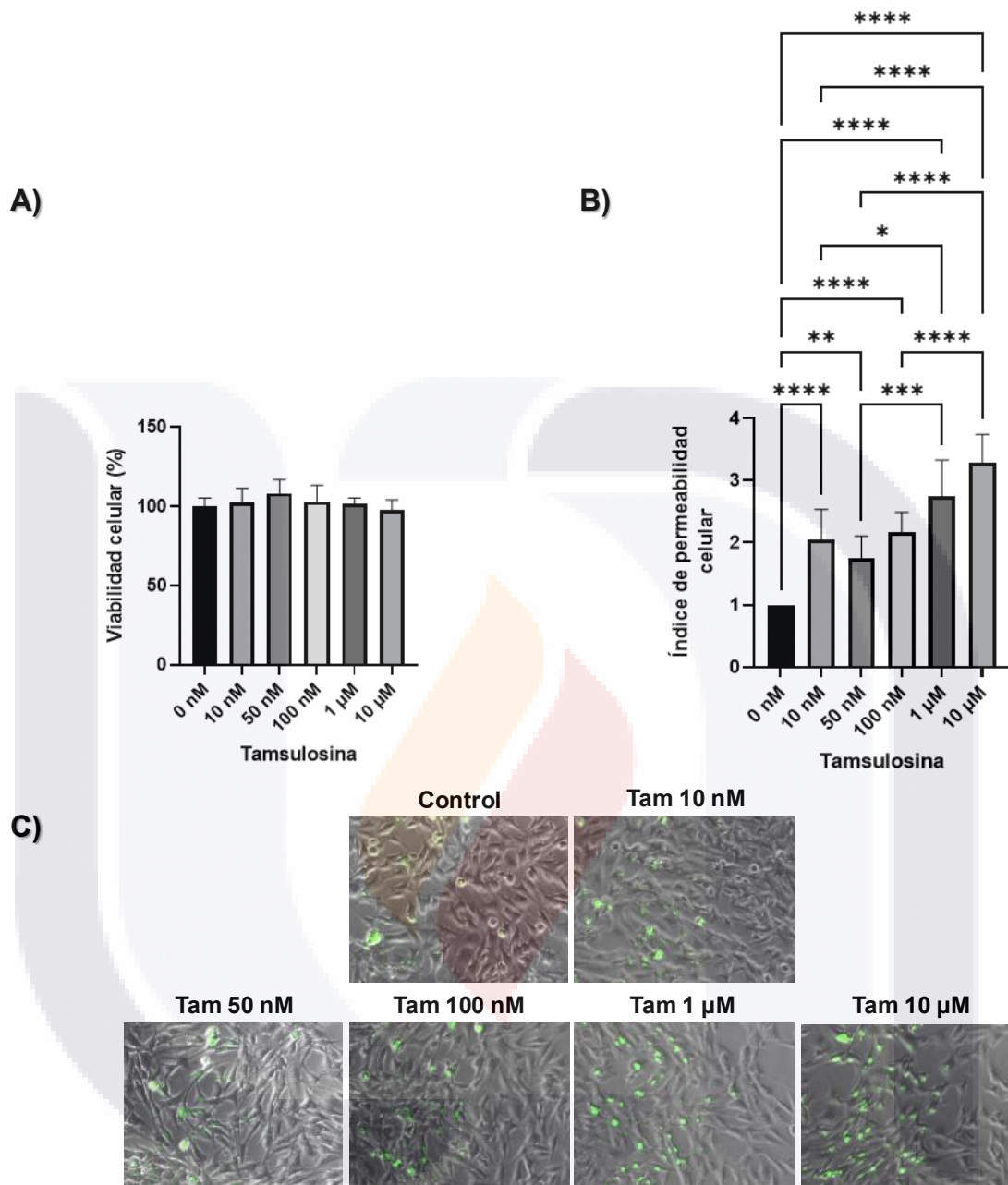


Fig. 19. Prueba de citotoxicidad de Tamsulosina. La concentración de tamsulosina que produce la menor proliferación y permeabilidad celular es de 50 nM. Valores ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$.

En el caso de pioglitazona, la viabilidad celular se mantuvo estable hasta una concentración de 100 nM (**Fig. 20-A**), con un índice de permeabilidad de 0.88 (**Fig. 20-B,C**). Sin embargo, a concentraciones de 1 μM y 10 μM, se observó un incremento significativo en la viabilidad celular, alcanzando 108.47% ($*p < 0.05$) y 108.46% ($*p <$

0.05), respectivamente, acompañado de un aumento en la permeabilidad celular a 2.64 ($****p < 0.0001$) y 3.63 ($****p < 0.0001$), respectivamente. Debido a estos valores elevados de permeabilidad, dichas concentraciones, aunque frecuentemente reportadas en la literatura, fueron descartadas para los siguientes ensayos.

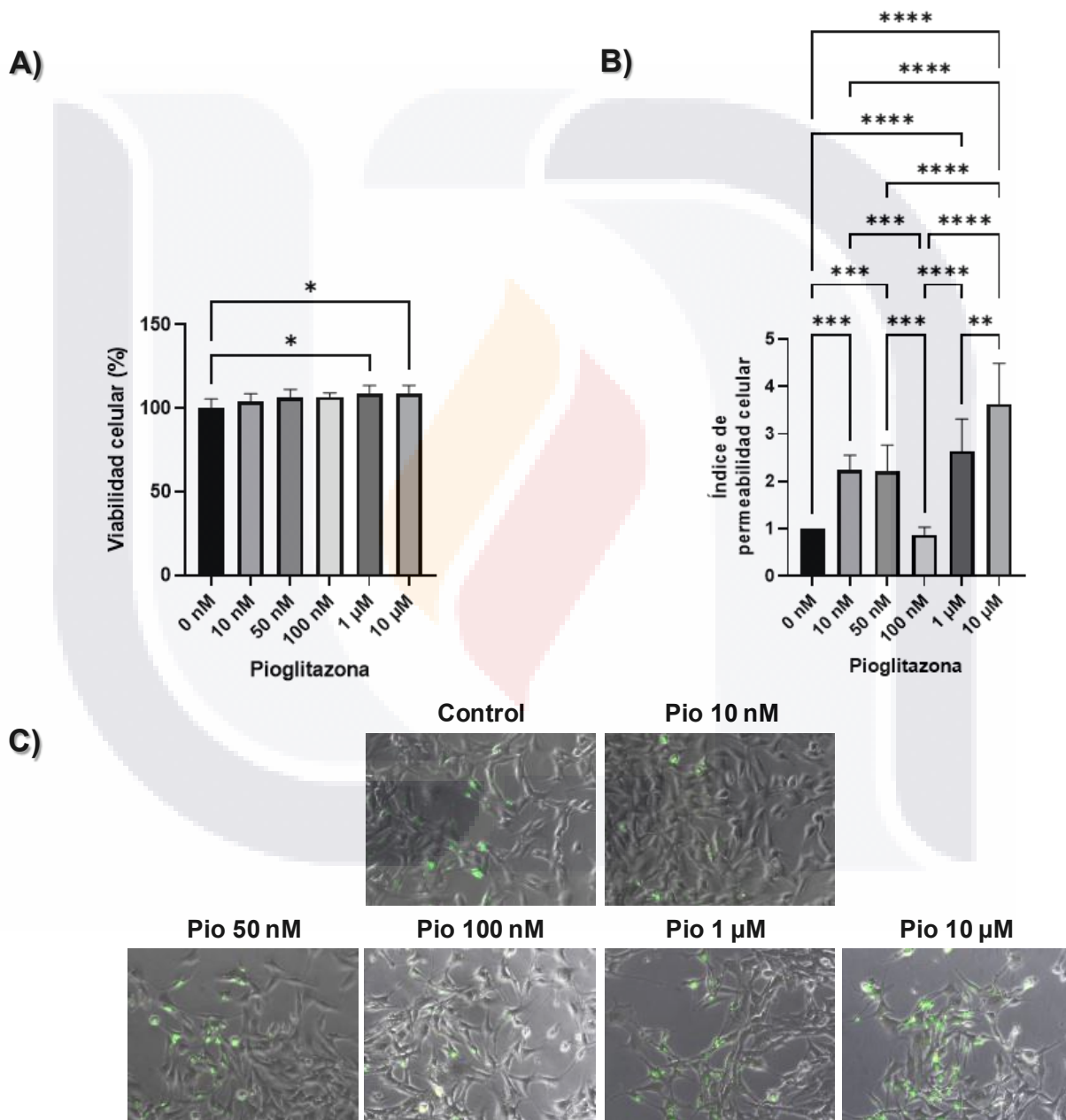


Fig. 20. Prueba de citotoxicidad de Pioglitazona. La concentración de pioglitazona que produce la menor proliferación y permeabilidad celular es de 100 nM. Valores $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$.

El grupo tratado con alta concentración de glucosa mostró el mayor incremento tanto en la viabilidad como en la proliferación celular, con un 135.22% de viabilidad ($****p < 0.0001$) respecto al control y una proliferación celular de 4,881.86 células/mm² ($**p < 0.01$), respectivamente, siguiendo con el grupo tratado con NAd, que presentó una viabilidad del 118.90% ($**p < 0.01$) y una proliferación de 3,924.71 células/mm², así como el grupo con la combinación de ambos inductores, con 4,266.43 células/mm².

En contraste, el tratamiento con tamsulosina indujo una mayor disminución en la proliferación celular en el grupo expuesto a alta glucosa, con un porcentaje de viabilidad celular de 126.91% (**Fig. 21-A**) y una proliferación de 4,231.83 células/mm² (**Fig. 21-B**), reduciéndose aún más a 3,670.67 células/mm² en el grupo tratado con la combinación de inductores.

Por su parte, la pioglitazona mostró efectos similares a los de la tamsulosina, observándose una mayor disminución en el grupo combinado con alta glucosa, con una viabilidad celular del 109.90% ($**p < 0.01$) (**Fig. 21-C**) y una proliferación celular de 4,189.56 células/mm² (**Fig. 21-D**). Finalmente, en el grupo tratado con la combinación de ambos inductores, la viabilidad fue de 112.77%, con una proliferación de 3,639.44 células/mm².

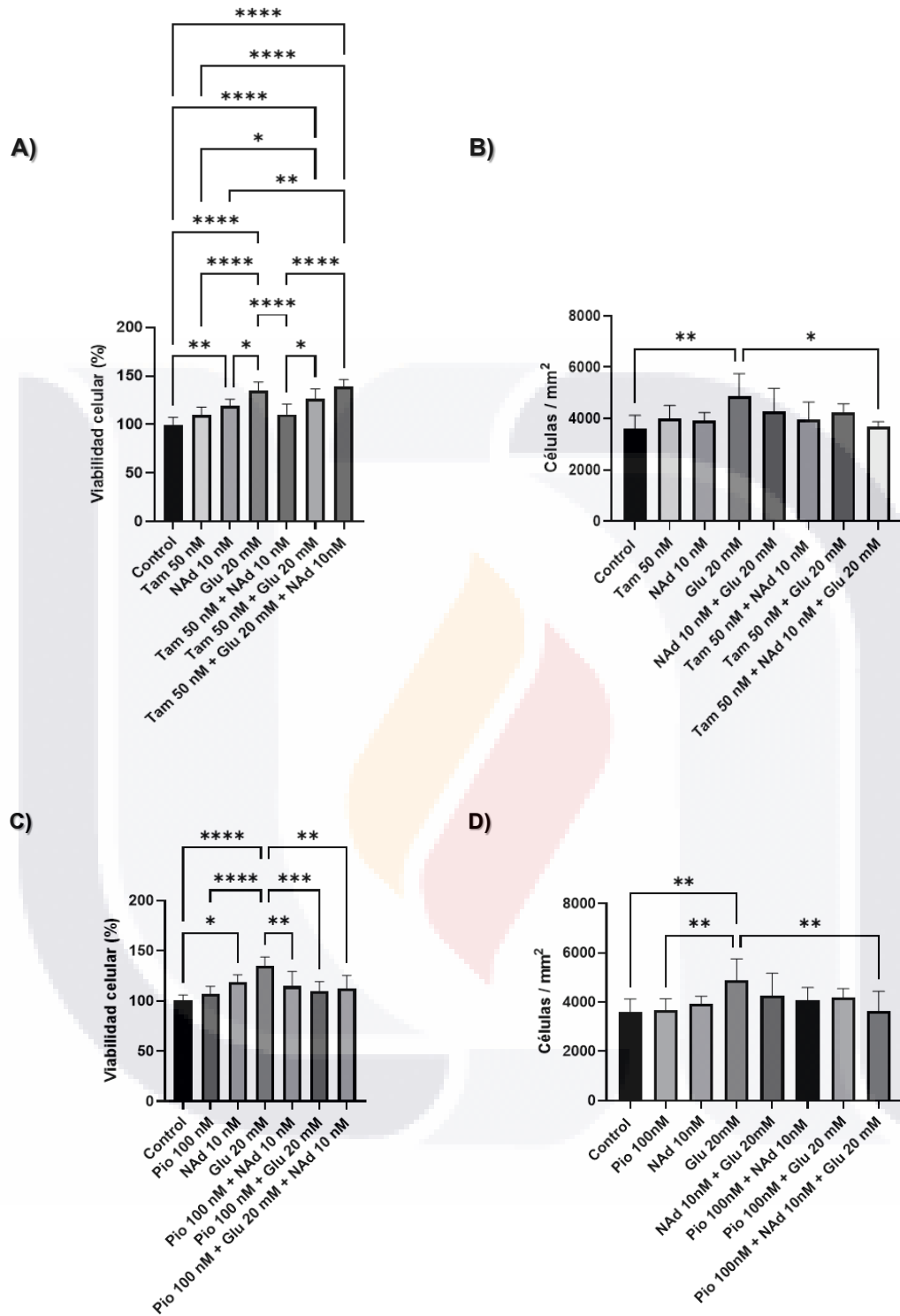
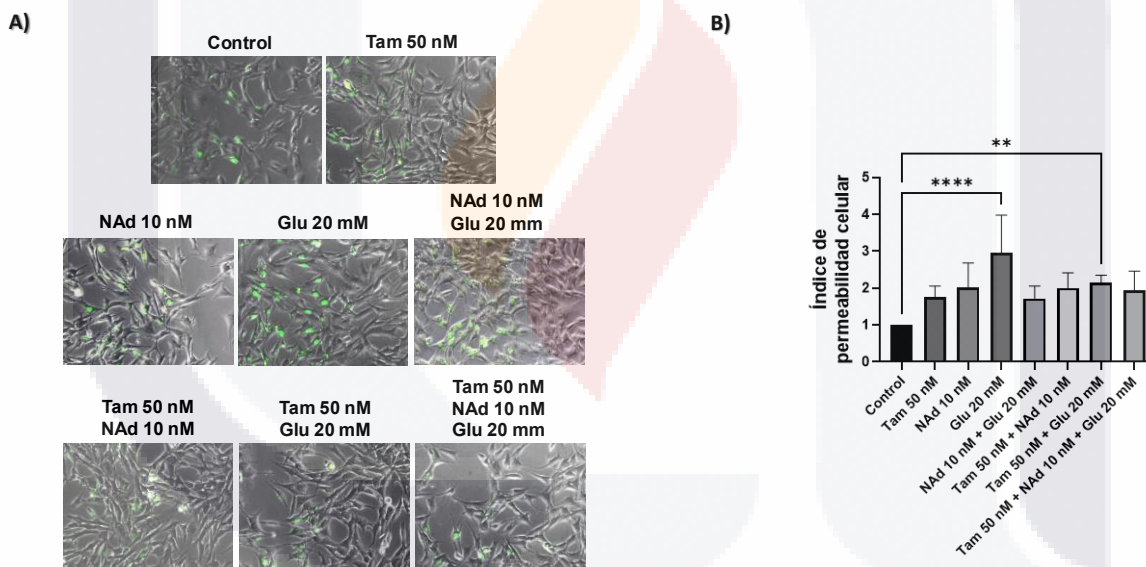


Fig. 21 Prueba de proliferación celular en los retos de tamsulosina y pioglitazona. A–B) La tamsulosina reduce con mayor eficacia la activación de las CMs inducida por alta glucosa. **C–D)** La pioglitazona presenta un efecto similar sobre la activación celular. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Para complementar los resultados anteriores, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando SYTOX™ Green, marcador específico para la detección de daño en la membrana celular. El índice de permeabilidad más elevado se observó en el grupo tratado con alta concentración de glucosa, alcanzando un valor de 2.97 ($****p < 0.0001$), seguido por el grupo estimulado con NAd con 2.01, y el grupo combinado NAd + glucosa alta, con un valor de 1.72.

La adición de tamsulosina redujo significativamente el índice de permeabilidad, siendo más evidente en el grupo de glucosa alta, con un valor de 2.14 ($**p < 0.01$) (**Fig. 22-A,B**). De manera similar, el tratamiento con pioglitazona también disminuyó el índice de permeabilidad celular, alcanzando un valor de 1.00 (**Fig. 22-C,D**).



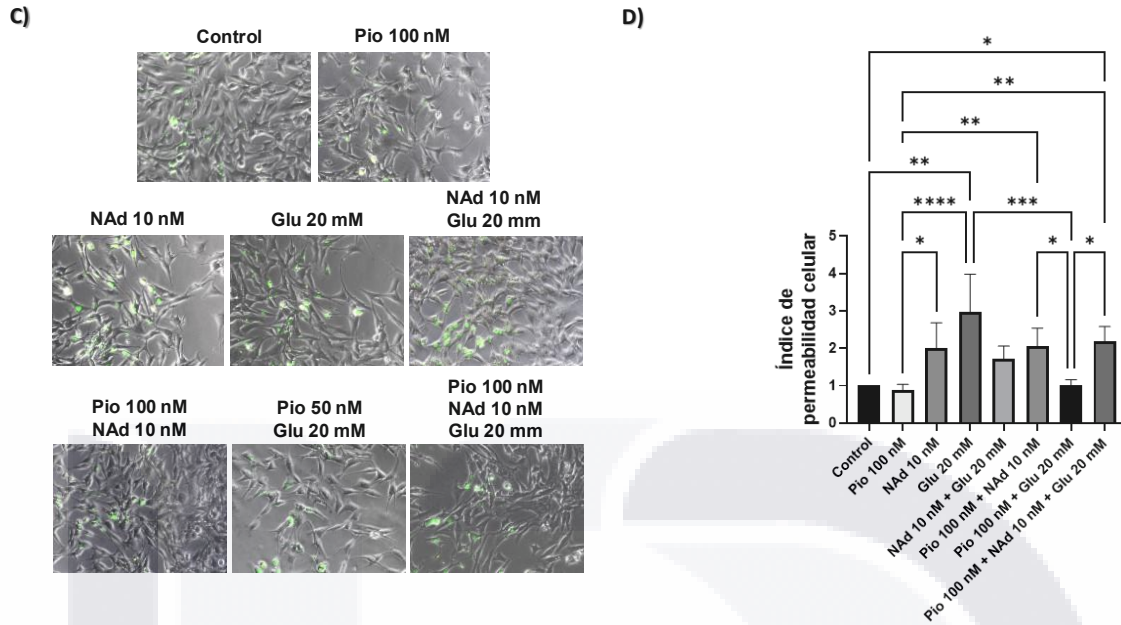
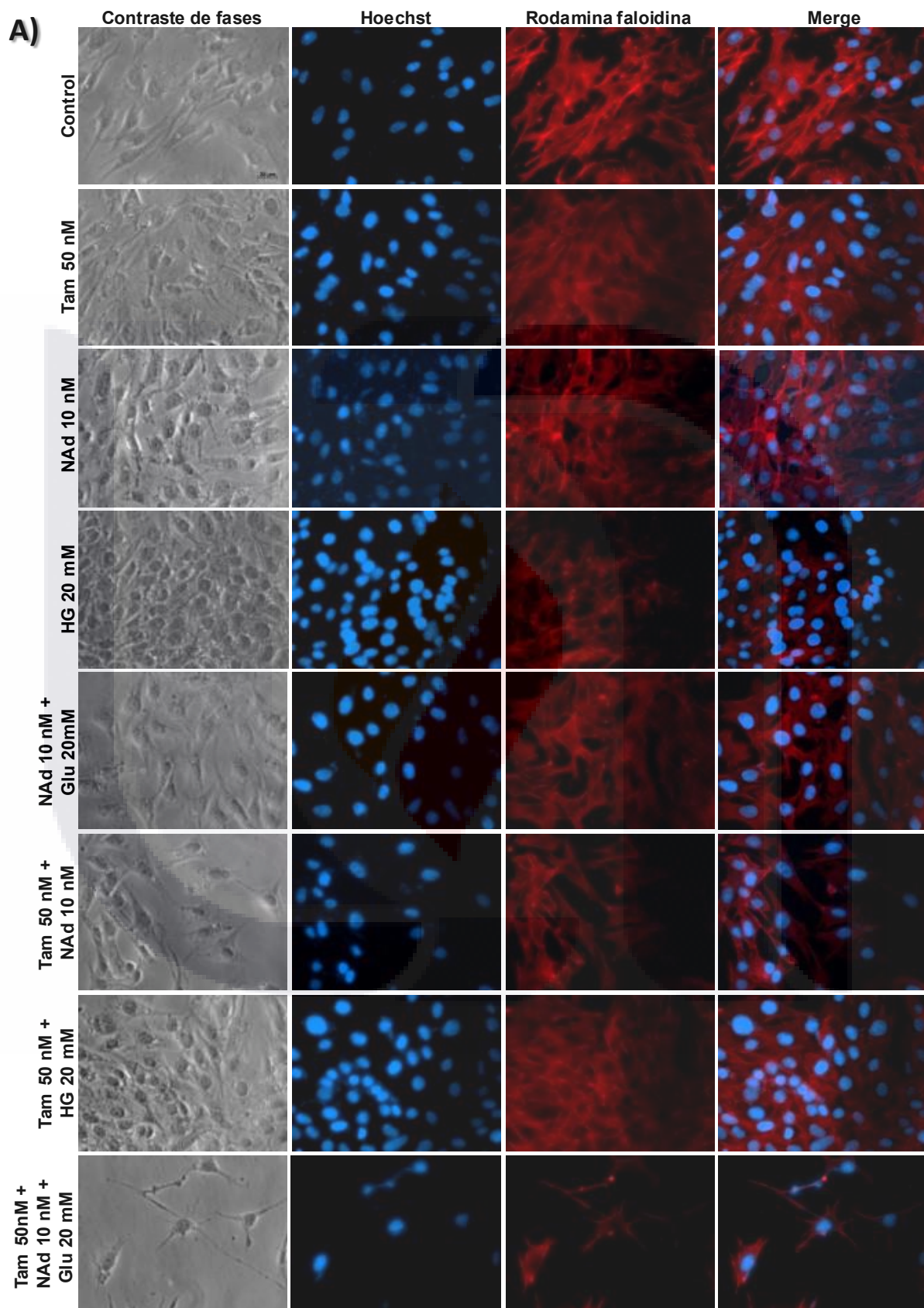


Fig. 22. Viabilidad celular mediante la prueba de permeabilidad membranal con SYTOX™ green. A–B) El tratamiento con tamsulosina y **C–D)** con pioglitazona disminuyen el daño celular causado por NAd y/o alta glucosa. Las imágenes fueron tomadas a 200x mediante microscopía de epifluorescencia y contraste de fases utilizando la cámara digital AxioCam MRc acoplada al microscopio ZEISS Axiovert 40 CFL. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Actividad de F-actina

La F-actina es la forma filamentosa de la actina resultante de su polimerización, y representa un marcador de la actividad del citoesqueleto. Su detección se realiza mediante el reactivo de rodamina-faloidina, detectando la fluorescencia roja, cuya intensidad es proporcional al grado de polimerización: a mayor actividad, mayor intensidad de fluorescencia.

En el presente experimento, se observó que el grupo control presentó la mayor intensidad de fluorescencia roja, indicando una alta actividad del citoesqueleto. En contraste, el grupo tratado con alta concentración de glucosa mostró una disminución considerable en esta señal, lo que sugiere una desorganización del citoesqueleto. Por otro lado, la combinación de NAd + glucosa alta provocó una disminución moderada en la actividad de F-actina. No obstante, los tratamientos con pioglitazona (**Fig. 23-B**) y tamsulosina (**Fig. 23-A**) aparentemente restauraron la organización del citoesqueleto, reflejado en una mayor intensidad de fluorescencia.



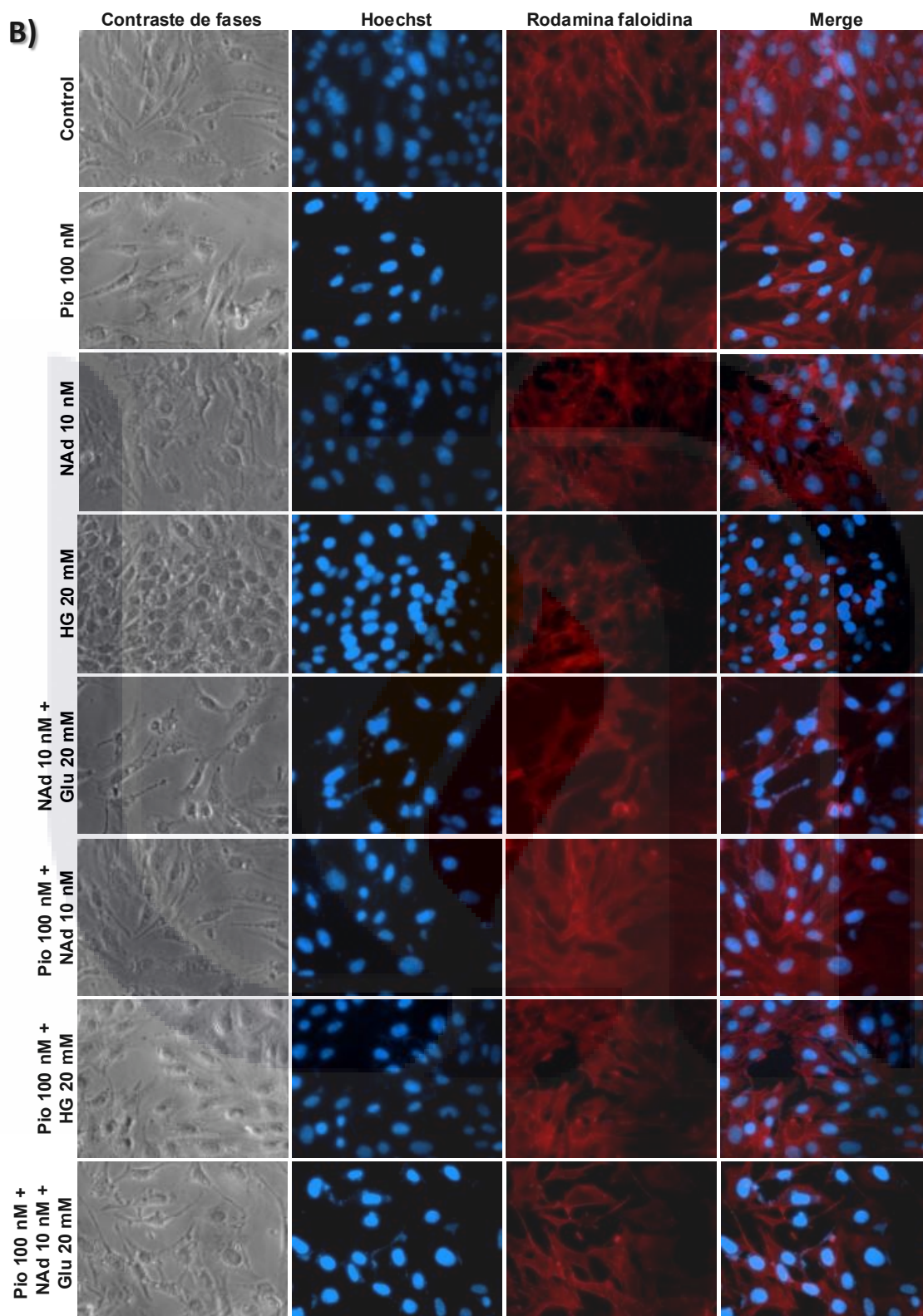
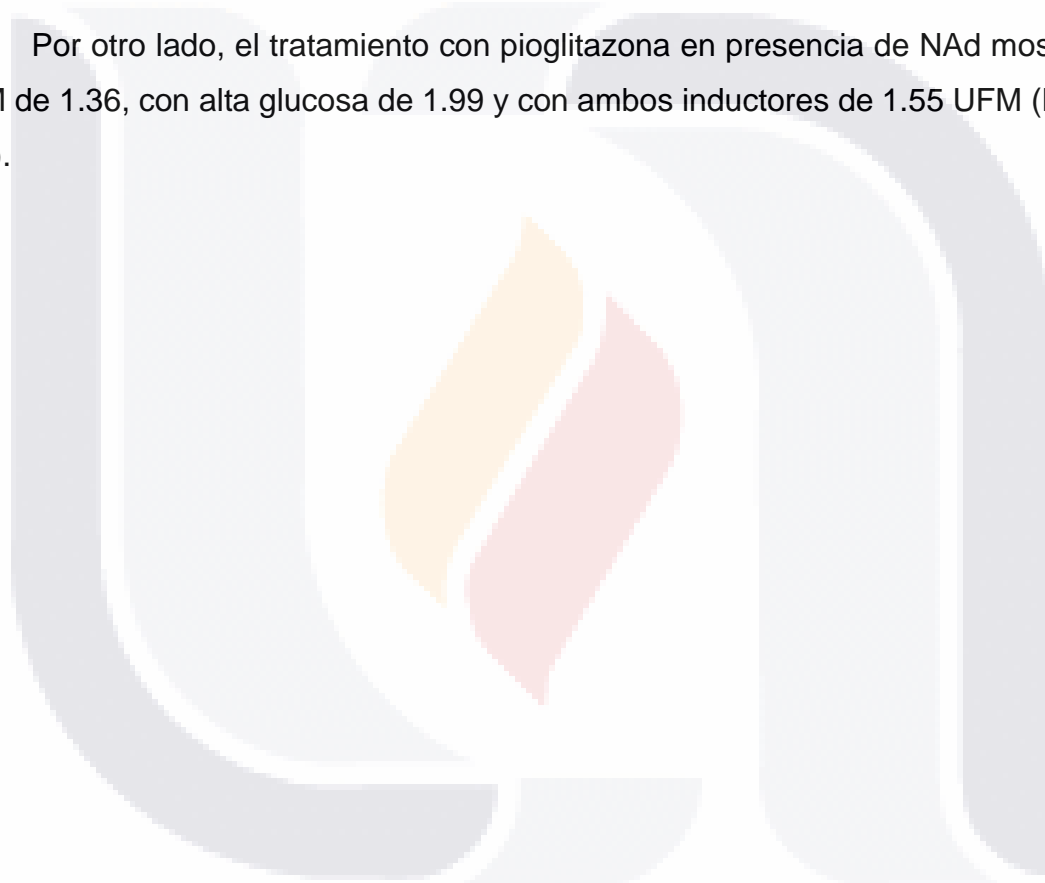


Fig. 23 Actividad de la F-actina. La glucosa y/o la NAd disminuyeron la actividad del citoesqueleto. Por otro lado, los tratamientos con **A)** tamsulosina y **B)** pioglitazona mejoraron dicha actividad. Las imágenes fueron tomadas a 400x.

Superóxido mitocondrial

La intensidad de fluorescencia, indicativo de la presencia de superóxido mitocondrial; mostró que el grupo expuesto a alta concentración de glucosa presentó la mayor positividad, con una unidad de fluorescencia media (UFM) de 3.87 ($****p < 0.0001$). En comparación, con NAd mostró una UFM de 2.04 ($*p < 0.05$), mientras que la combinación de ambos inductores alcanzó 2.02 UFM ($*p < 0.05$). La administración conjunta de tamsulosina con NAd redujo la fluorescencia a 1.37 UFM, con glucosa alta a 2.20 UFM ($**p < 0.01$) y con ambos inductores a 1.14 UFM (**Fig. 24-A,B**).

Por otro lado, el tratamiento con pioglitazona en presencia de NAd mostró una UFM de 1.36, con alta glucosa de 1.99 y con ambos inductores de 1.55 UFM (**Fig. 24-A,C**).



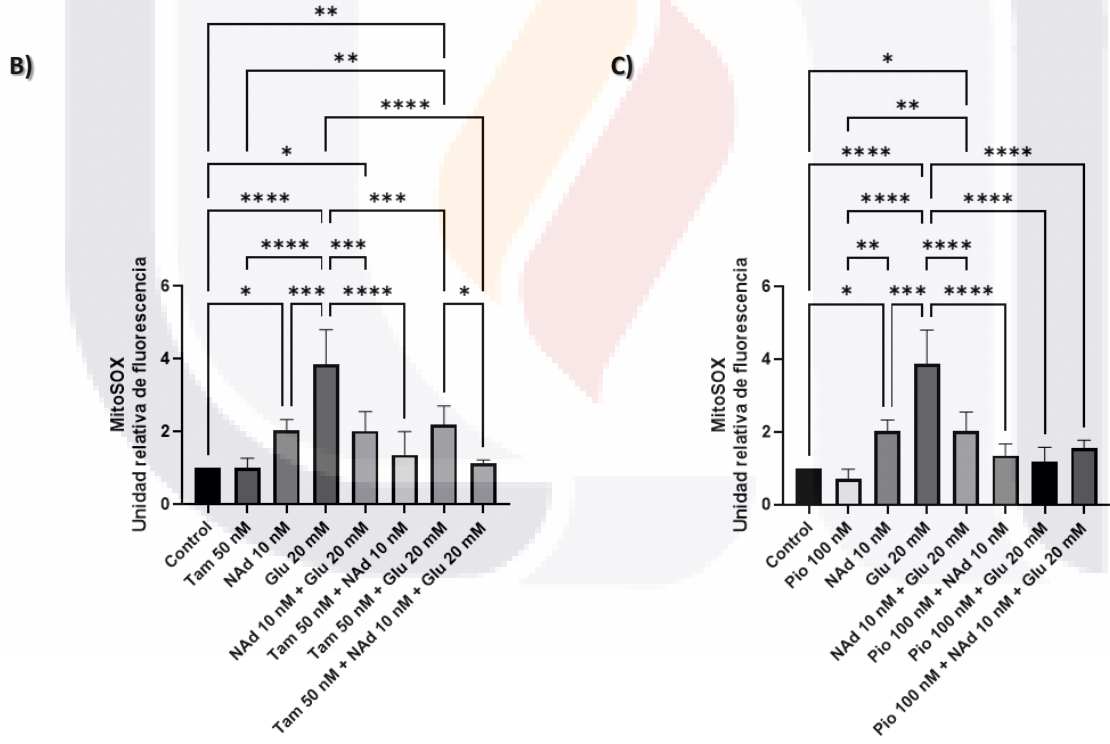
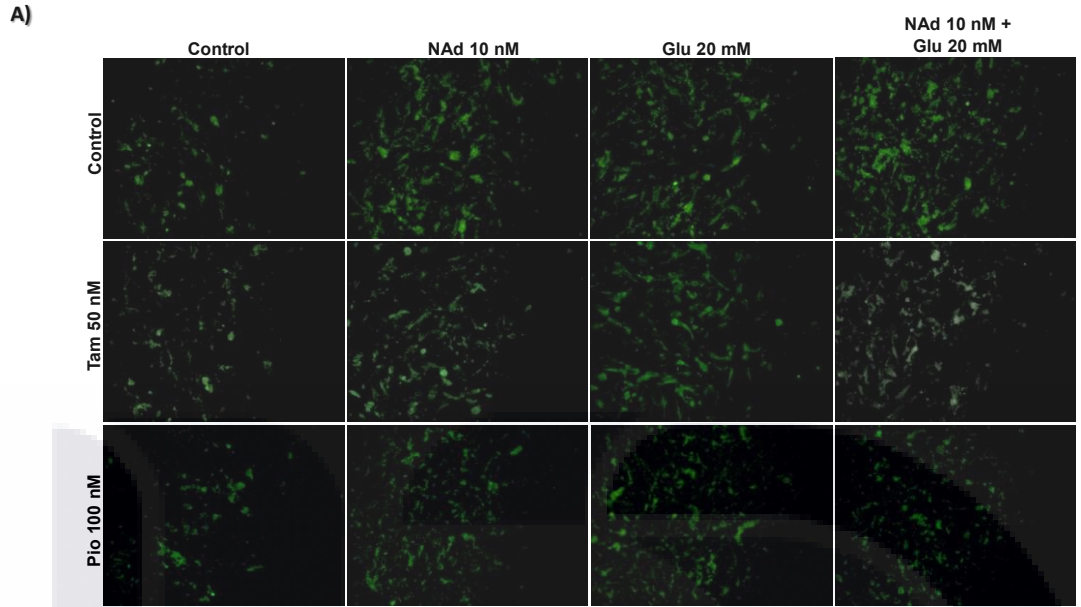
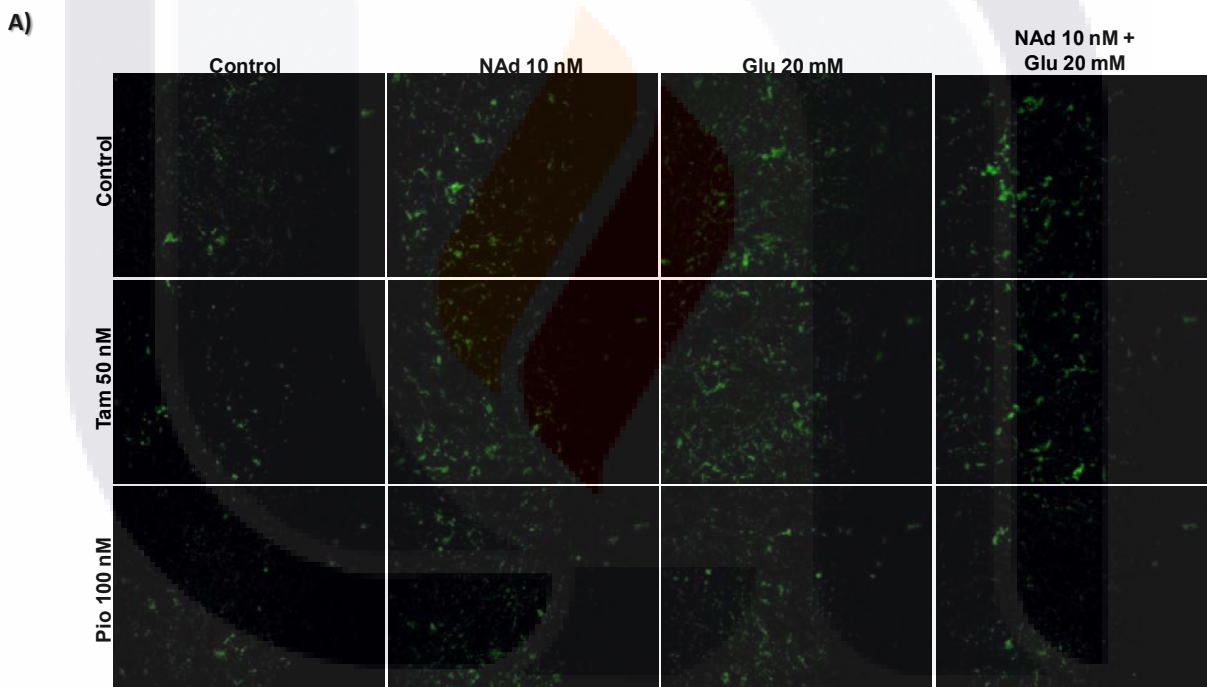


Fig. 24 Superóxido mitocondrial. Los inductores NAd y/o glucosa aumentan la producción de superóxido mitocondrial; sin embargo, los tratamientos con tamsulosina y pioglitazona la disminuyen significativamente. Las imágenes fueron tomadas a 400x.

Calcio intracitoplasmático

El reactivo Fura-2 AM se empleó para la detección de iones calcio (Ca^{2+}) en el citoplasma. El grupo tratado con NAd presentó una UFM de 5.57 ($****p < 0.0001$), mientras que el grupo inducido con alta concentración de glucosa alcanzó 2.60 UFM ($**p < 0.01$) y la combinación de ambos inductores 2.97 UFM ($**p < 0.01$).

La administración conjunta de tamsulosina con NAd redujo significativamente la señal de fluorescencia a 2.23 UFM, con glucosa alta a 1.68 UFM y con ambos inductores a 1.33 UFM (**Fig. 25-A,B**). De manera similar, el tratamiento con pioglitazona combinado con NAd disminuyó la fluorescencia a 1.42 UFM, con alta glucosa a 1.34 UFM y con ambos inductores a 1.20 UFM, lo que indica una menor concentración de calcio citoplasmático (**Fig. 25-A,C**).



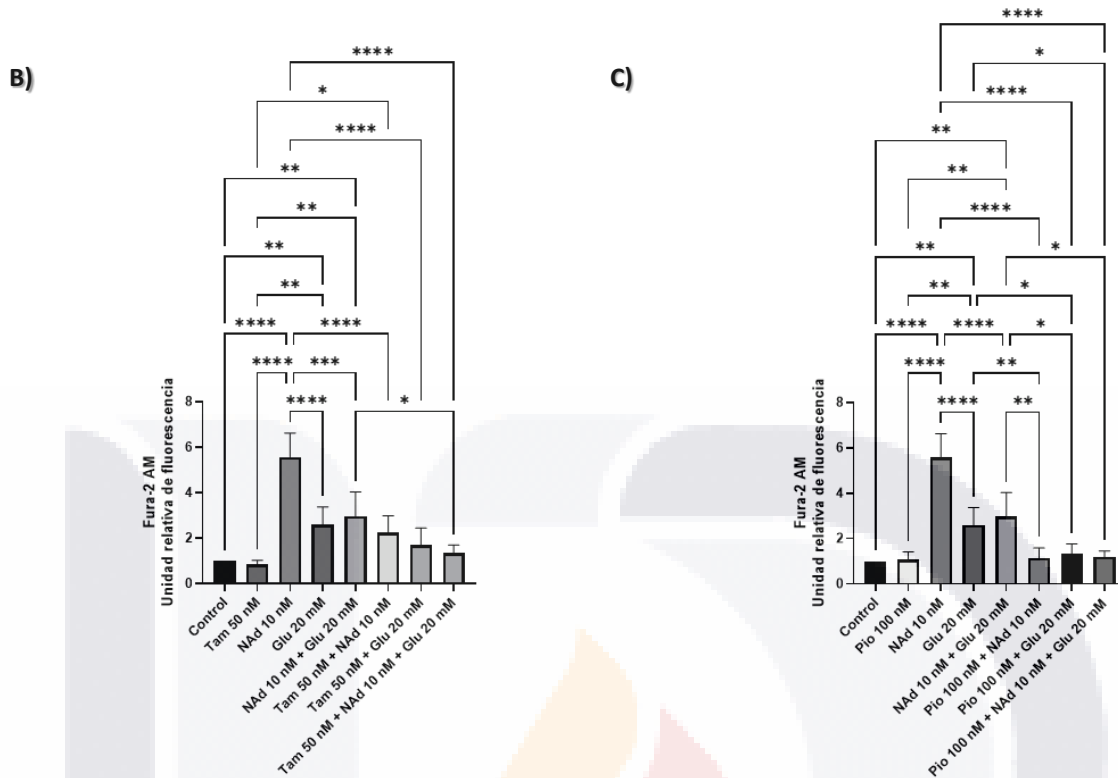


Fig. 25 Calcio intracitoplasmático. La NAd induce una mayor liberación de iones calcio al citoplasma; sin embargo, tanto la tamsulosina como la pioglitazona disminuyen el daño celular causado por uno o ambos inductores. Las imágenes fueron tomadas a 400x.

Expresión de marcadores

Marcadores inflamatorios

Los resultados de inmunofluorescencia y expresión génica demostraron que los tratamientos con NAd y alta glucosa inducen una activación significativa de los marcadores inflamatorios NF-κB, IL-1β e IL-17 en comparación con el grupo control.

La tamsulosina redujo de manera consistente la expresión de NF-κB, IL-1β e IL-17 frente a todos los estímulos, alcanzando niveles cercanos o inferiores a los del control, con una mayor disminución en los grupos combinados con NAd + alta concentración de glucosa.

De forma similar, la pioglitazona atenuó significativamente la activación de NF-κB y, en menor medida, de IL-1β e IL-17, especialmente en las combinaciones con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

NAd y alta glucosa, donde las expresiones génicas descendieron hasta valores mínimos.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la tamsulosina como la pioglitazona ejercen un efecto antiinflamatorio, disminuyendo negativamente la vía de NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias en las condiciones de estrés metabólico (por alta glucosa) y del SNS (elevación de NAd).

NF- κ B

La expresión de NF- κ B fue evaluada a nivel de expresión génica relativa respecto al control y síntesis proteica; esta última mediante dos técnicas: inmunofluorescencia, expresada como UFM, empleada como un indicador indirecto de la abundancia proteica, y análisis por Western blot mediante densitometría, en los distintos grupos experimentales.

En condiciones basales, el tratamiento con tamsulosina mostró una expresión génica relativa respecto al control de 6.83 (**Fig. 26-H**), con una UFM de 2.09 (**Fig. 26-A,C**) y un valor densitométrico de 0.78 (**Fig. 26-E,F**). La estimulación con NAd indujo un incremento significativo en la expresión relativa génica de NF- κ B (37.33, * $p < 0.05$), acompañado de una UFM de 2.19 (**** $p < 0.0001$) y un aumento en el análisis densitométrico (3.57). De manera similar, la exposición a alta glucosa incrementó la expresión relativa génica a 20.78, con una UFM de 2.89 (** $p < 0.01$) y un valor densitométrico de 1.06.

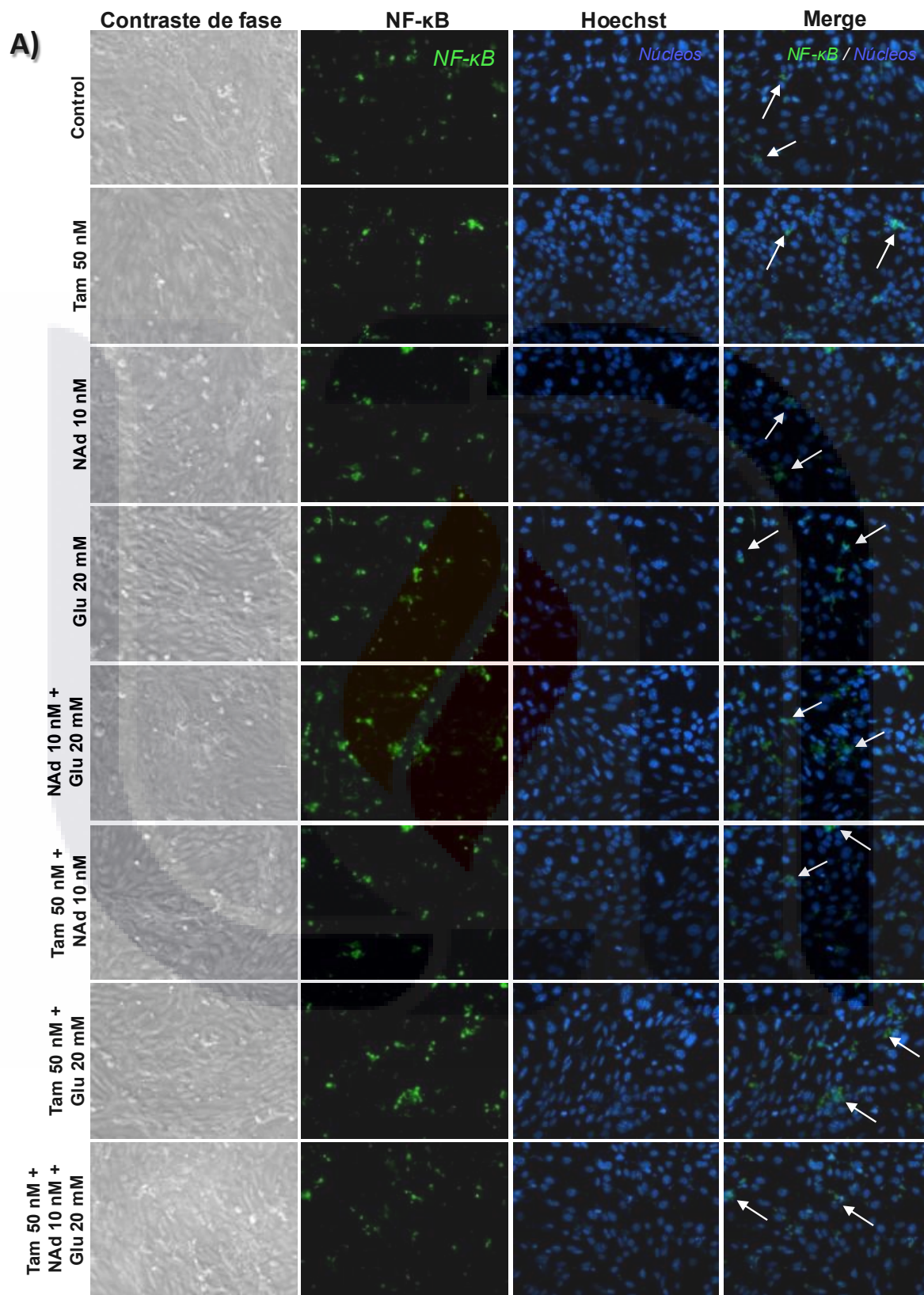
La combinación de NAd y glucosa mantuvo elevados los niveles de expresión relativa génica (21.37), con una UFM de 3.09 (** $p < 0.01$) y un valor densitométrico de 0.87 (**** $p < 0.0001$), lo que sugiere una respuesta sostenida de activación inflamatoria bajo condiciones combinadas.

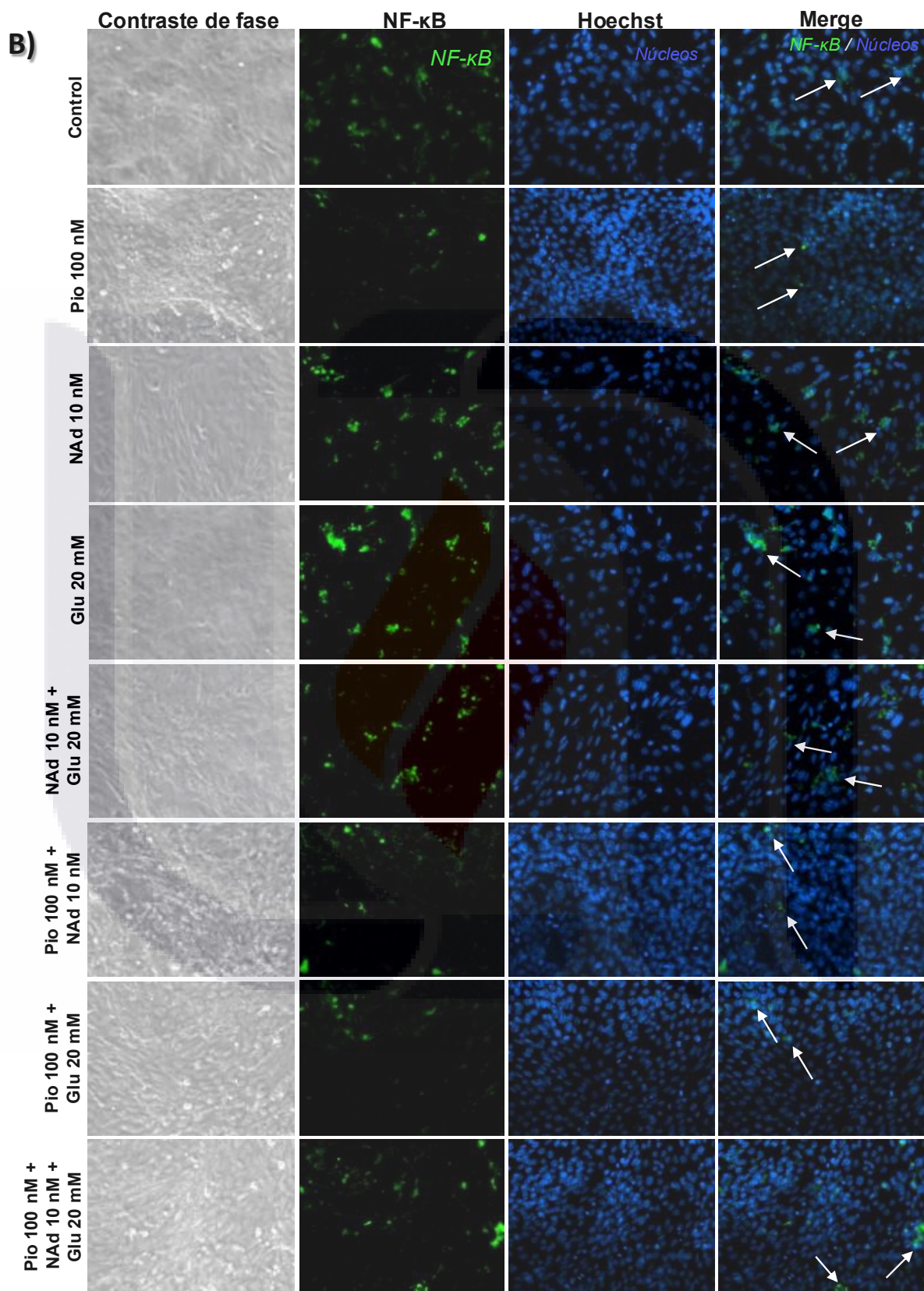
En los grupos tratados con tamsulosina en presencia de los inductores, se observó una disminución en la expresión de NF- κ B. El grupo tamsulosina + NAd presentó una expresión génica relativa de 3.06, con una UFM de 1.63 y un valor densitométrico de 1.12. Por su parte, el grupo tamsulosina + glucosa mostró una expresión génica relativa de 10.55, con una UFM de 1.08 y un valor densitométrico de

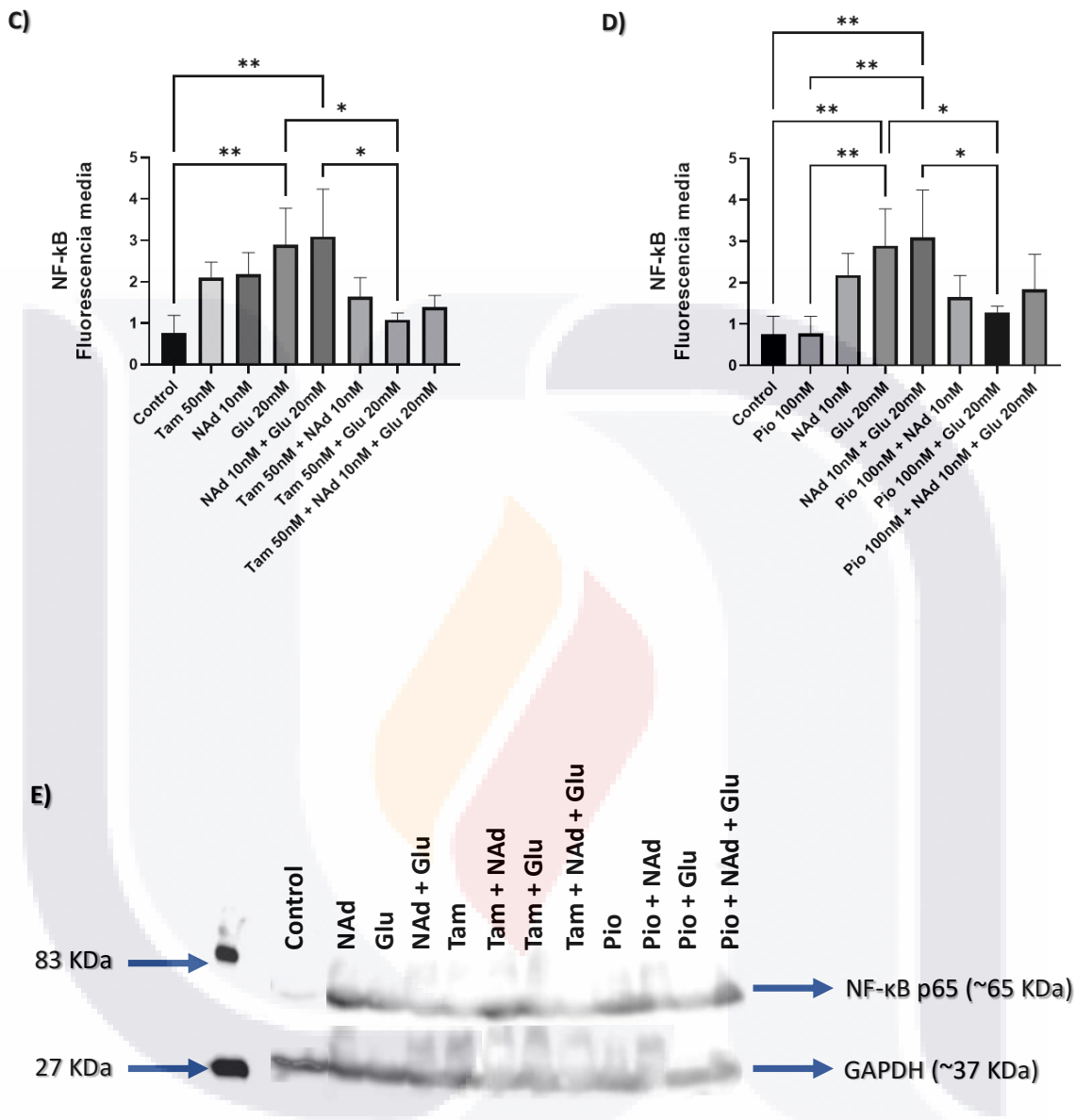
0.39. Notablemente, el tratamiento combinado de tamsulosina con NAd y glucosa redujo de manera más marcada la expresión génica relativa a 1.04, con una UFM de 1.39 y un valor densitométrico de 0.18.

En contraste, la pioglitazona mostró una supresión pronunciada de la expresión génica basal de NF- κ B (0.02) (**Fig. 26-I**), con una UFM de 0.77 (**Fig. 26-B,D**) y un valor densitométrico de 0.49 (**Fig. 26-E,G**). En presencia de NAd, la expresión génica relativa se mantuvo prácticamente suprimida (0.01), con una UFM de 1.67 y un valor densitométrico de 0.47. En el grupo pioglitazona + glucosa, la expresión génica relativa fue de 0.08, con una UFM de 1.29 y un valor densitométrico de 0.28. Finalmente, en el grupo pioglitazona + NAd + glucosa, la expresión génica relativa fue de 0.09, con una UFM de 1.84 y un valor densitométrico de 0.11.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la tamsulosina como la pioglitazona atenúan la activación de NF- κ B inducida por NAd y alta glucosa, siendo la pioglitazona el tratamiento más eficaz en la supresión de la expresión génica relativa. Asimismo, la disminución observada en los niveles proteicos, particularmente mediante Western blot, respalda su potencial efecto antiinflamatorio.







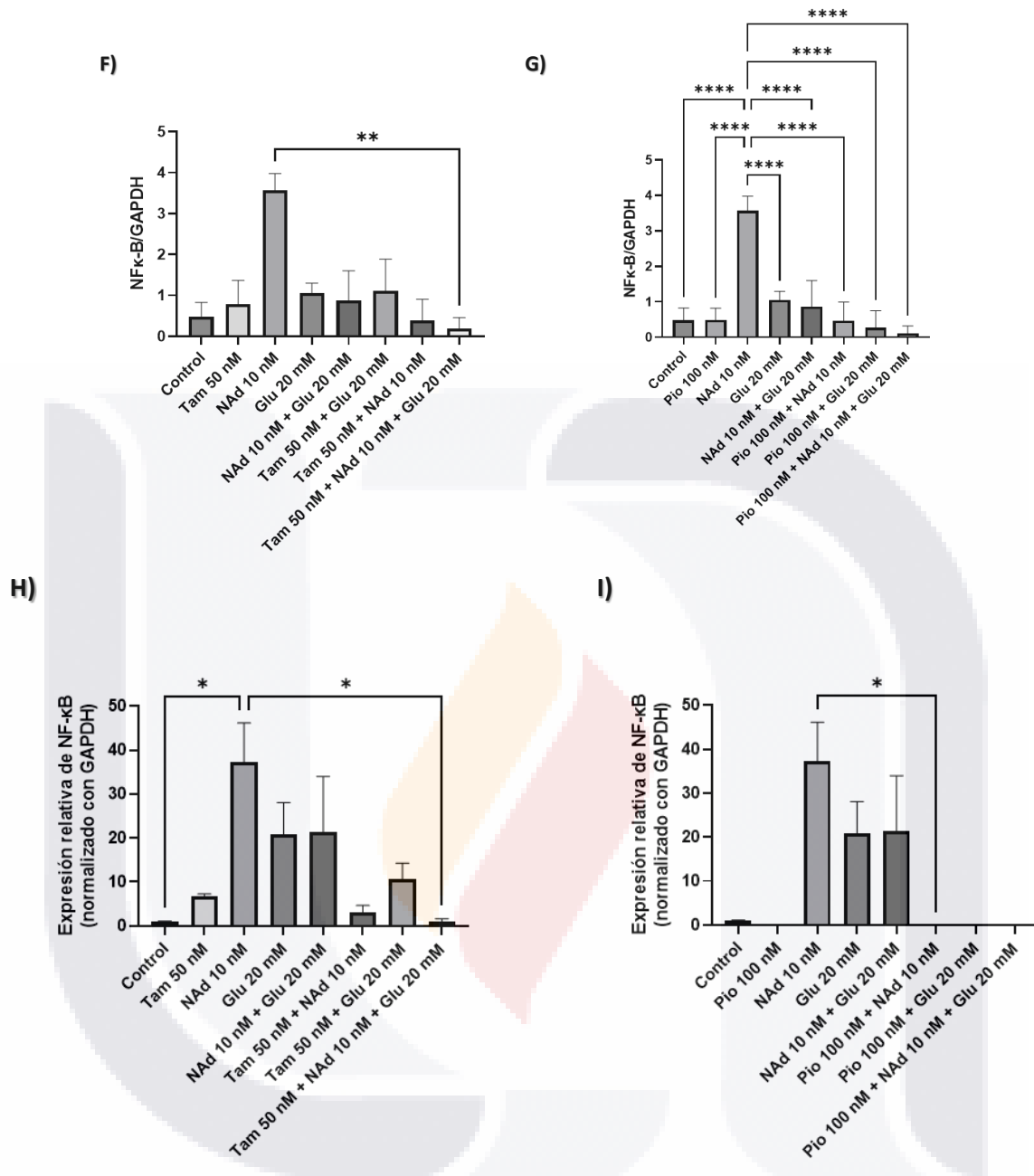


Fig. 26. Expresión de NF-κB. La NAd y la glucosa inducen un aumento en la expresión de NF-κB, siendo la NAd el mayor inductor; sin embargo, ambos tratamientos muestran una disminución de su expresión en presencia de los fármacos evaluados. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (verde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Procf acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C–D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo. **E)** Expresión proteica de NF-κB determinada por Western blot. **F)** Análisis densitométrico para el tratamiento con tamsulosina. **G)** Análisis densitométrico para el tratamiento con pioglitazona. **H)** Expresión génica de NF-κB determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **I)** Expresión génica de NF-κB determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. Valores *p<0.05, **p<0.01 y ****p<0.0001.

IL-1 β

El tratamiento con tamsulosina mostró una expresión génica relativa respecto al control de 1.82 (**Fig. 27-D**), con una UFM de 2.13 (**Fig. 28-A,C**). Por su parte, la estimulación con NAd indujo un incremento marcado en la expresión génica relativa de IL-1 β (21.58, **** $p < 0.0001$), con una UFM de 2.51, mientras que la exposición a alta glucosa también elevó su expresión génica a 10.75 (** $p < 0.01$), con una UFM de 5.70.

En contraste, la combinación de NAd y glucosa mostró una disminución en la expresión génica relativa (3.56), con una UFM de 1.34, lo que sugiere una posible interacción reguladora entre ambos estímulos sobre la expresión de IL-1 β .

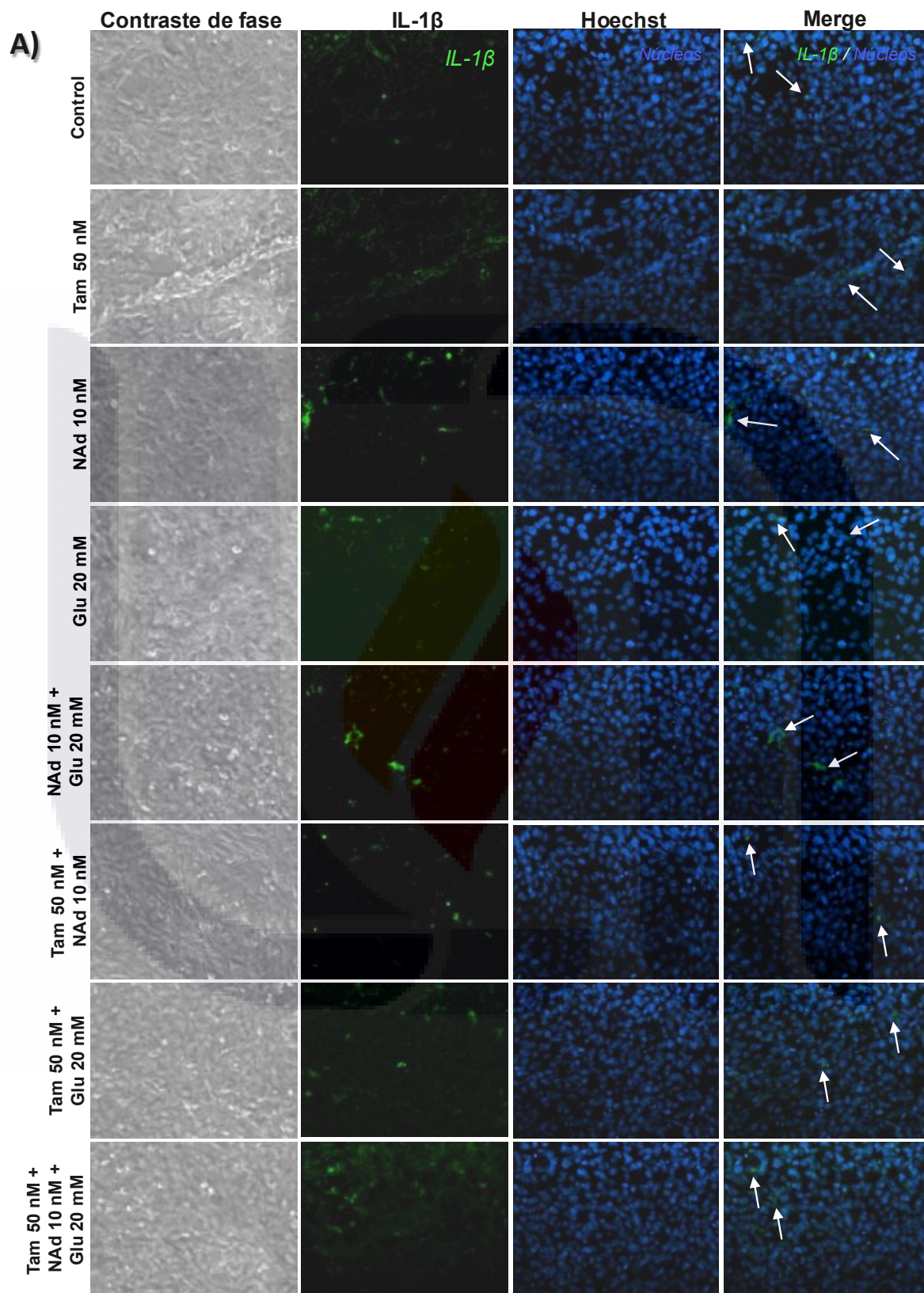
En los grupos tratados con tamsulosina en presencia de los inductores, se observaron efectos variables. El grupo tamsulosina + NAd presentó una disminución en la expresión génica (1.44) y en la UFM (1.12). Sin embargo, en el grupo tamsulosina + glucosa se observó un incremento en la expresión génica relativa (14.60, **** $p < 0.0001$), acompañado de una UFM de 4.61. Notablemente, el tratamiento combinado de tamsulosina con NAd y glucosa mostró una marcada disminución en la expresión génica relativa (0.21), mientras que la UFM aumentó considerablemente (7.86, * $p < 0.05$), lo que sugiere una posible regulación postranscripcional o acumulación proteica.

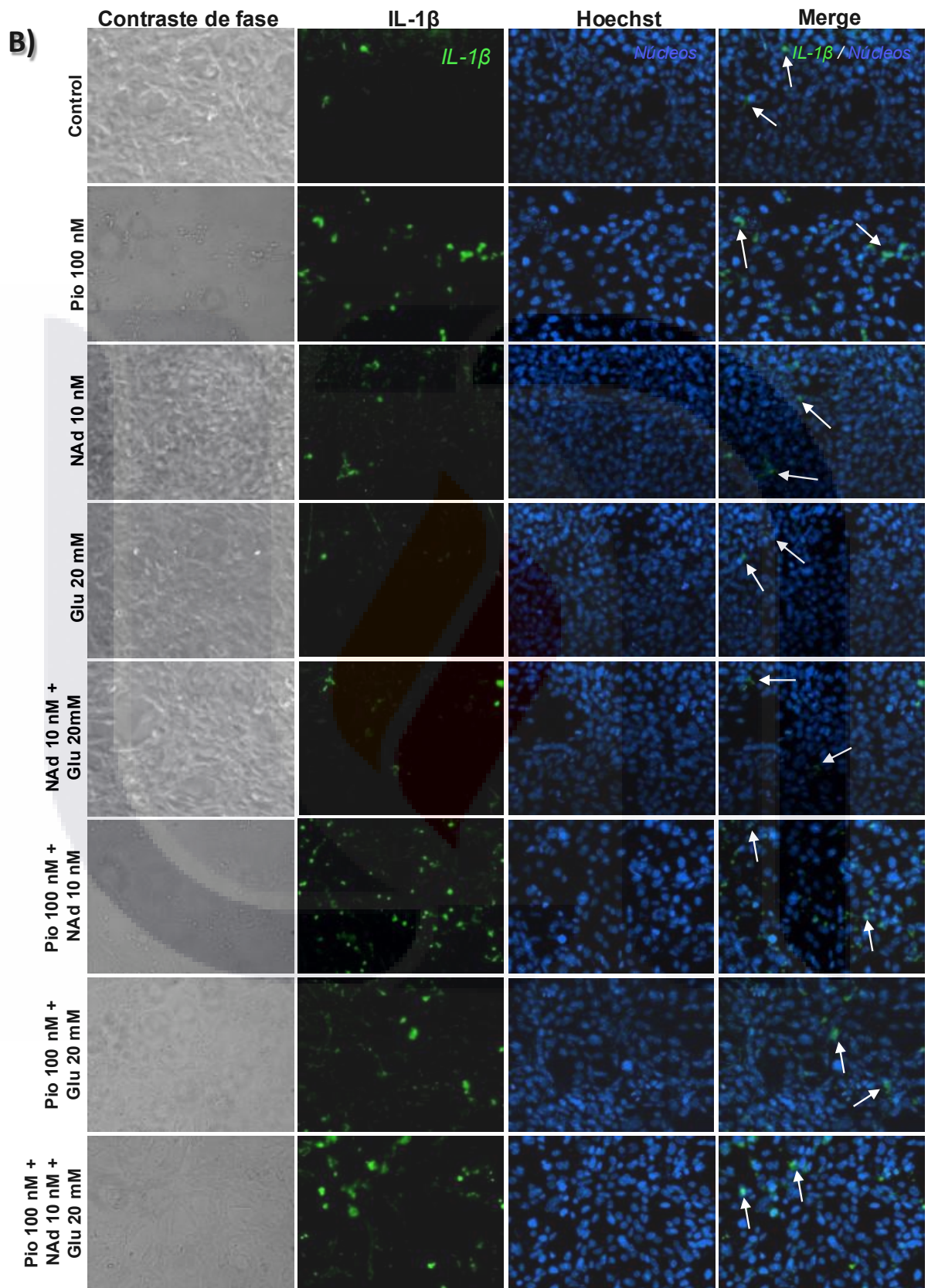
En contraste, la pioglitazona mostró una expresión génica basal baja (0.19) (**Fig. 28-F**), con una UFM de 3.03 (**Fig. 28-B,E**). En presencia de NAd, la expresión génica relativa se mantuvo baja (0.58), aunque con un incremento en la UFM (5.13, ** $p < 0.01$). De manera similar, en el grupo pioglitazona + glucosa, la expresión génica relativa fue de 0.20, con una UFM de 4.43 (* $p < 0.05$). Finalmente, en el grupo pioglitazona + NAd + glucosa, la expresión génica relativa permaneció baja (0.18), con una UFM de 3.19.

En conjunto, estos resultados indican que la tamsulosina y la pioglitazona modulan diferencialmente la expresión de IL-1 β . Mientras que la pioglitazona mantiene una supresión consistente a nivel génico, la tamsulosina muestra efectos dependientes del tipo de estímulo. Asimismo, la discrepancia observada entre la expresión génica

relativa y la UFM sugiere la participación de mecanismos de regulación postranscripcional en la modulación de IL-1 β .







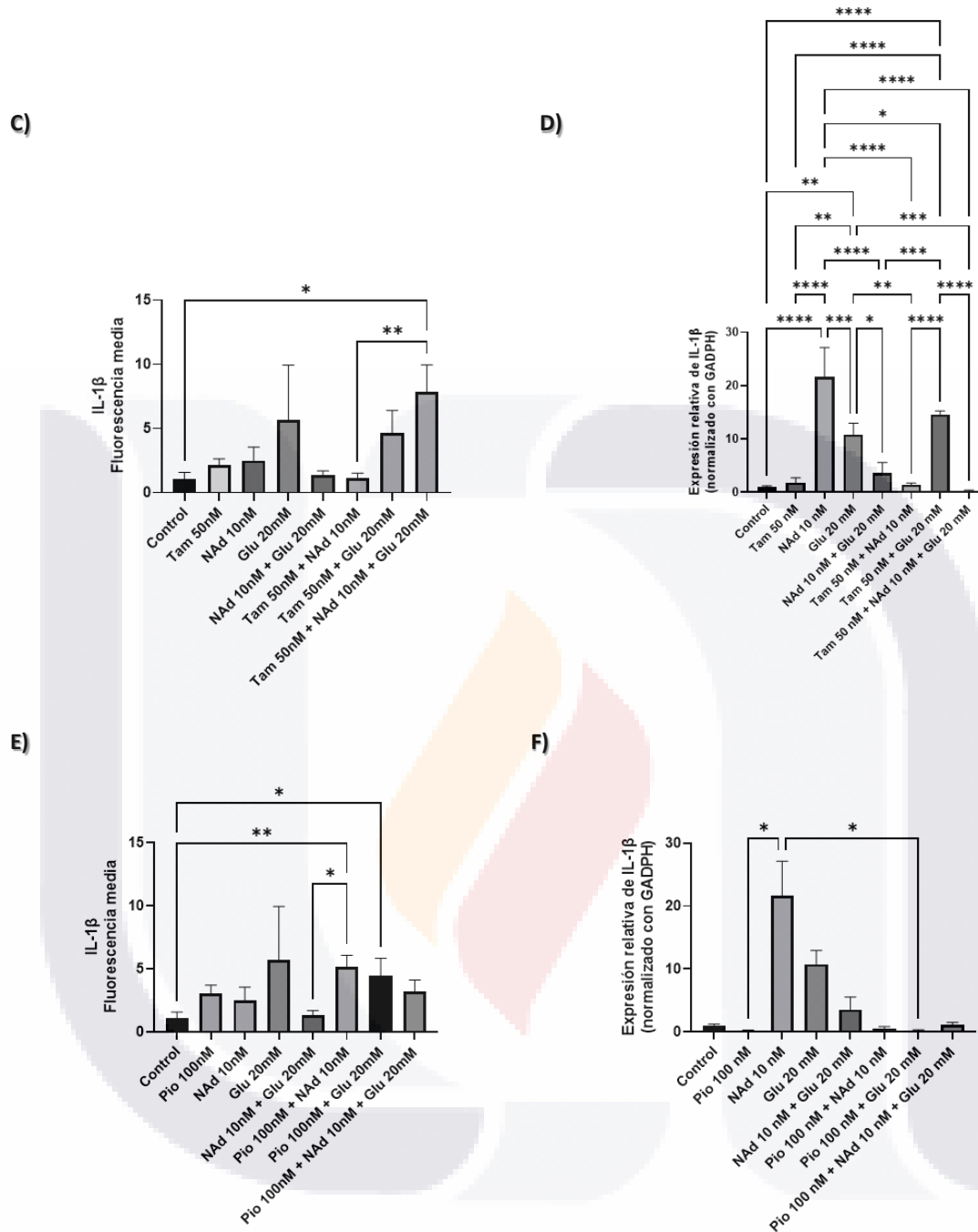


Fig. 27. Expresión de IL-1β. La NAd y la glucosa inducen un aumento en la expresión de IL-1β, siendo la NAd el mayor inductor de la expresión génica. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (verde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Prof acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica de IL-1β determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo de los grupos de tamsulosina. **E)** Expresión génica de IL-1β determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo con pioglitazona. Valores *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

IL-17

La expresión de IL-17 en condiciones basales, el tratamiento con tamsulosina mostró una expresión génica relativa de 3.47 (**Fig. 28-D**), con una UFM de 3.19 (**Fig. 28-A,C**). Por su parte, la estimulación con NAd presentó una expresión génica relativa de 3.32 ($***p < 0.001$), con una UFM de 5.80 ($**p < 0.01$), mientras que la exposición a alta glucosa indujo un incremento más marcado en la expresión génica relativa, alcanzando un valor de 8.20 ($*p < 0.05$), con una UFM de 4.34.

La combinación de NAd y glucosa produjo el mayor incremento en la expresión génica relativa de IL-17 (10.69, $**p < 0.01$), aunque con una UFM de 3.87, lo que sugiere una regulación diferencial entre la expresión transcripcional y la abundancia proteica bajo estas condiciones.

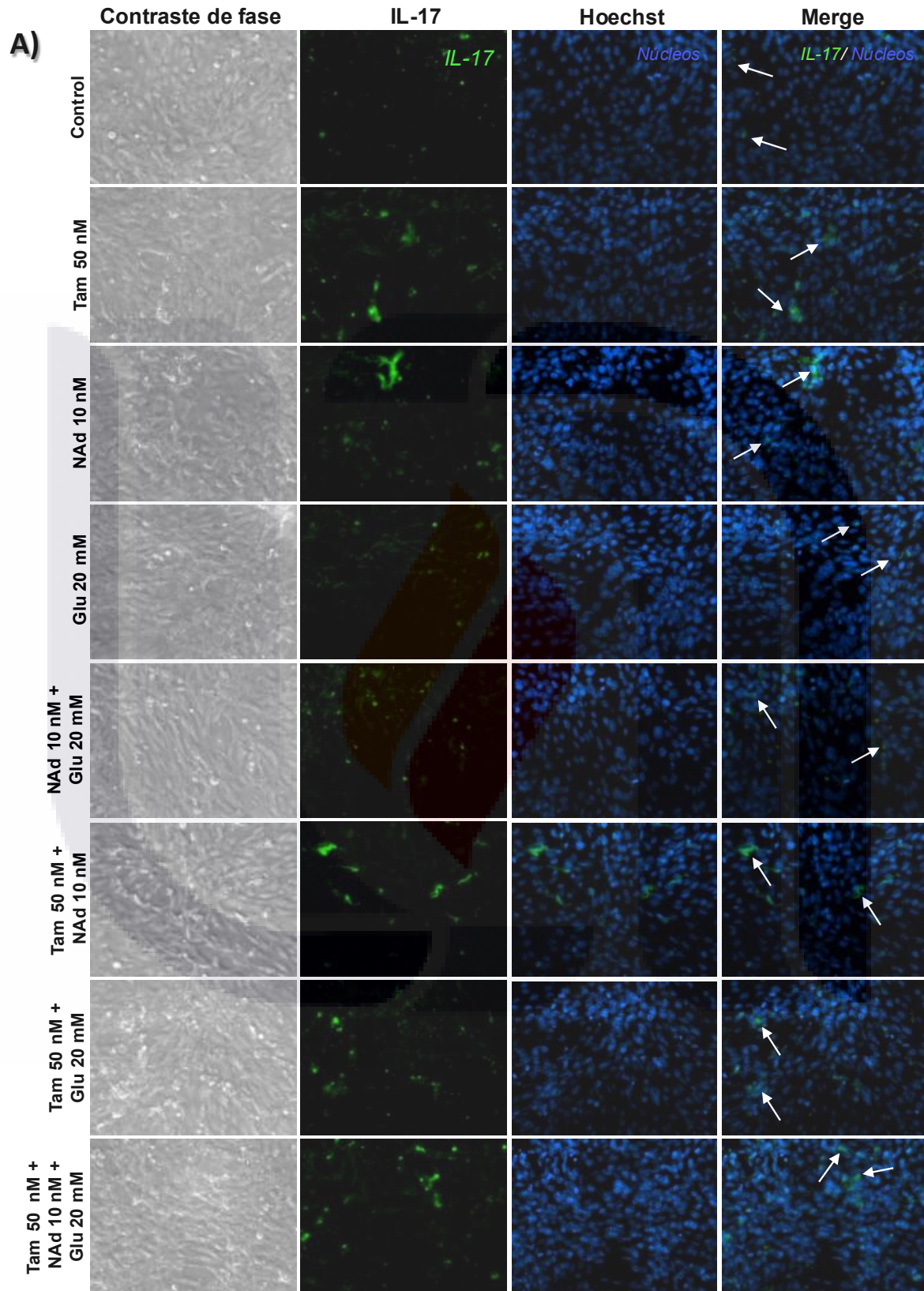
En los grupos tratados con tamsulosina en presencia de los inductores, se observó una disminución generalizada en la expresión génica relativa de IL-17. Específicamente, el grupo tamsulosina + NAd mostró una expresión génica relativa de 1.94 y una UFM de 2.91, mientras que el grupo tamsulosina + glucosa presentó valores de 1.53 y 3.12, respectivamente. Asimismo, el tratamiento combinado de tamsulosina con NAd y glucosa mostró una expresión génica relativa de 2.01 y una UFM de 3.69. Estos resultados indican que la tamsulosina reduce de manera consistente la expresión génica relativa de IL-17; sin embargo, su efecto sobre la expresión proteica es menos evidente.

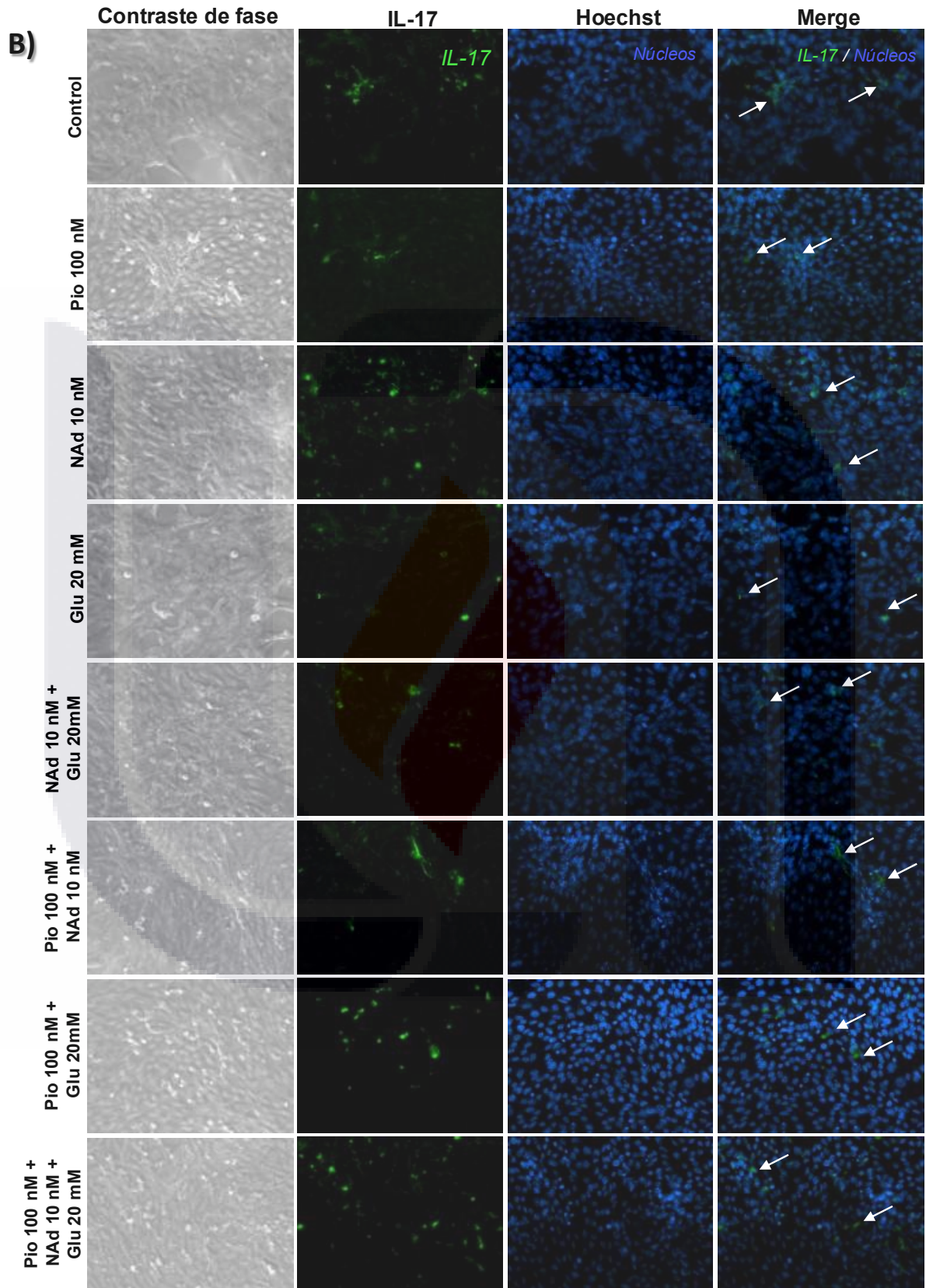
En contraste, la pioglitazona mostró una expresión génica basal de 1.00 (**Fig. 28-F**), con una UFM de 1.07 (**Fig. 28-B,E**). En el grupo pioglitazona + NAd, se observó un incremento notable en la expresión génica relativa (16.58), con una UFM de 1.42. De manera similar, la combinación de pioglitazona con NAd y glucosa indujo un aumento aún mayor en la expresión génica relativa (17.94), con una UFM de 1.46. Por otro lado, en el grupo pioglitazona + glucosa, la expresión génica relativa se mantuvo baja (1.30), con una UFM de 1.20.

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque ambos fármacos modulan la expresión de IL-17, la tamsulosina presenta un efecto más consistente en la reducción de la expresión génica relativa bajo estimulación con glucosa y/o NAd,

mientras que la pioglitazona muestra una respuesta diferencial dependiente del estímulo, particularmente en presencia de NAd. Asimismo, la discrepancia observada entre la expresión génica relativa y la UFM sugiere la posible participación de mecanismos de regulación postranscripcional.







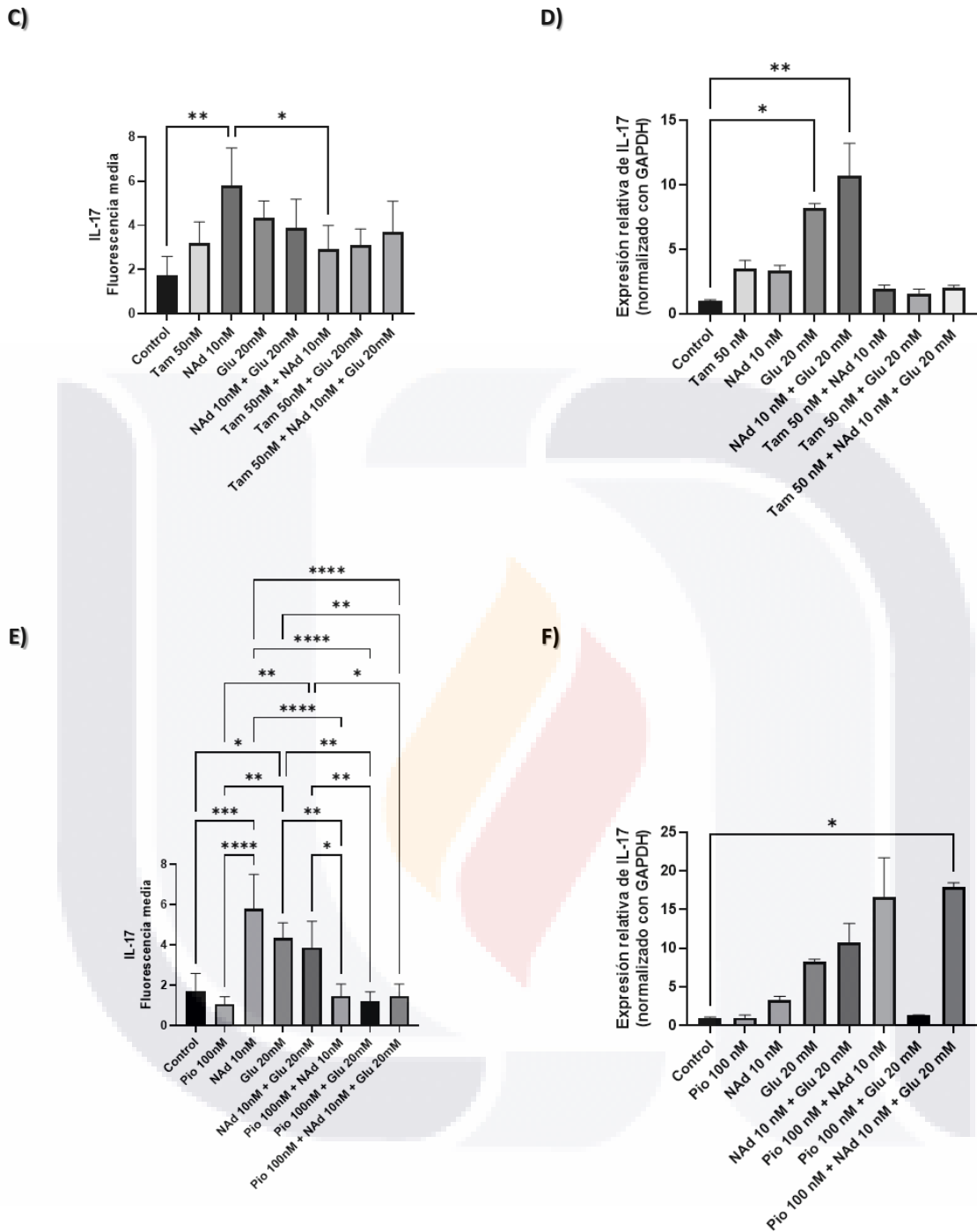


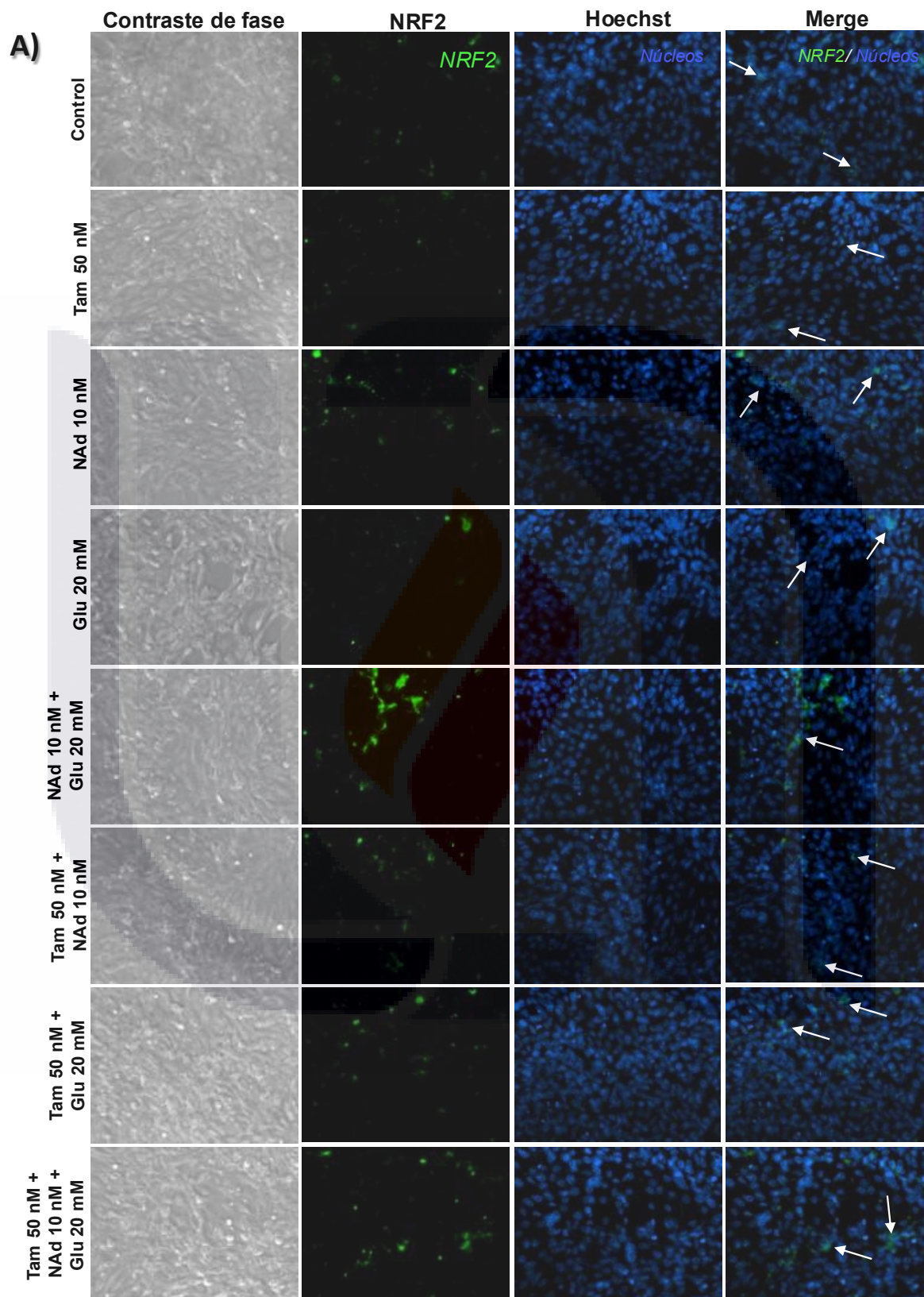
Fig. 28. Expresión de IL-17. La glucosa induce una mayor expresión a nivel génico. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (verde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Procf acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo con tamsulosina. **E)** Expresión génica determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo con pioglitazona. Valores * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001.

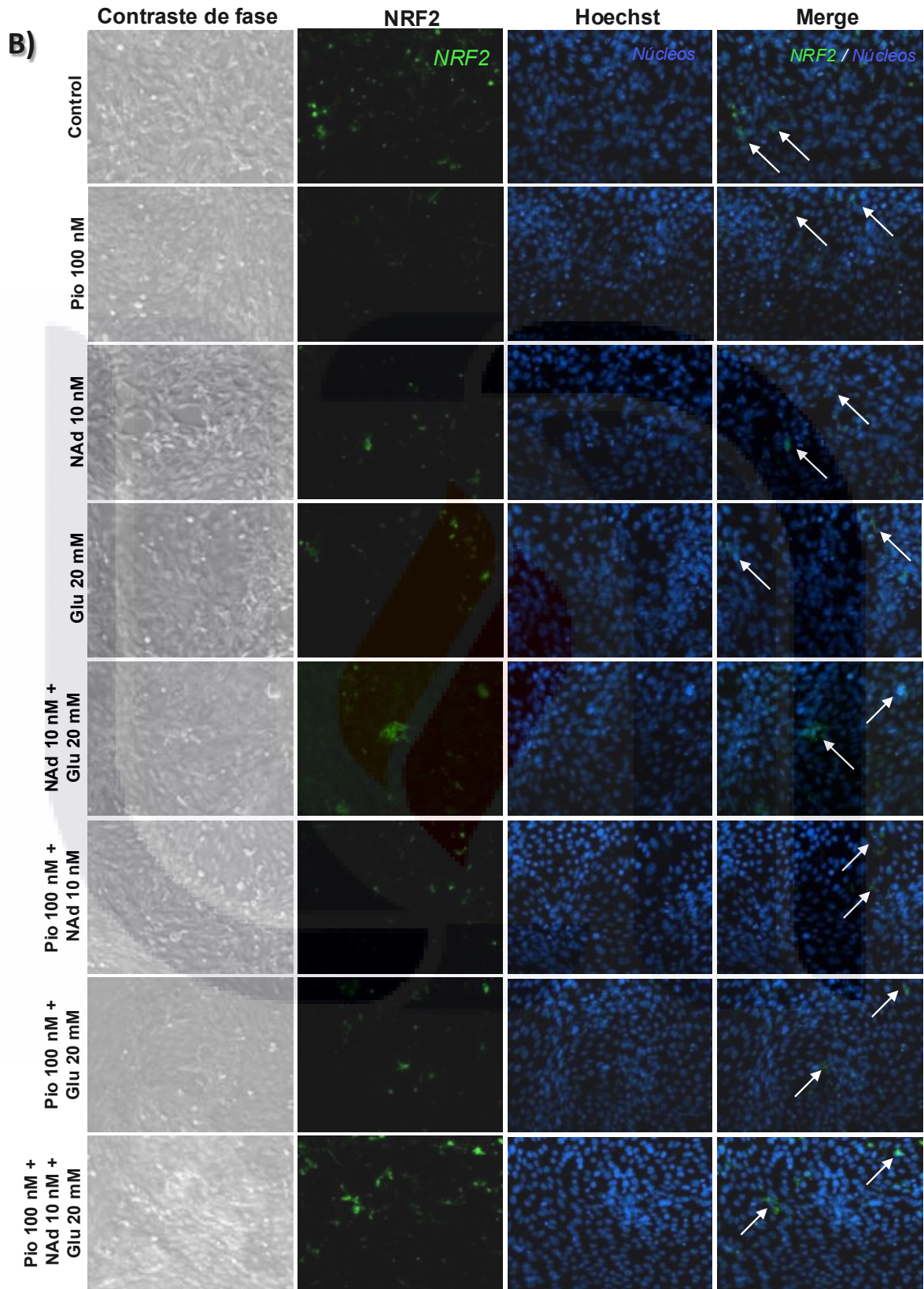
Marcador antioxidante

Para analizar la respuesta celular frente a las ROS, se emplearon técnicas de inmunofluorescencia y PCR para detectar la expresión de NRF2. La tamsulosina y la pioglitazona no mostraron efectos significativos sobre la activación de este factor de transcripción.

Las CMs expuestas a alta glucosa presentaron una respuesta antioxidante marcada en comparación con el grupo control, evidenciada por un incremento significativo en la expresión génica relativa (11.51 veces) y síntesis proteica (8.91 veces) de NRF2. En el caso del tratamiento con NAd, se observó un aumento de 6.12 veces en la expresión génica relativa y de 1.58 veces en la expresión proteica. La combinación de ambos estímulos (alta glucosa + NAd) produjo un incremento de 9.73 veces en la expresión génica relativa y de 5.98 veces en la proteica ($****p < 0.0001$).

No obstante, la adición de tamsulosina o pioglitazona a las células inducidas con alta glucosa y/o NAd redujo la expresión génica relativa y proteica de NRF2 a niveles similares a los del grupo control. Esta disminución fue más evidente en las combinaciones con alta glucosa + NAd. En particular, la combinación con tamsulosina redujo la expresión proteica a 1.37 veces (**Fig. 29-A,C**), mientras que con pioglitazona disminuyó a 1.48 veces (**Fig. 29-B,E**). La reducción más marcada en la expresión génica relativa se observó en las células tratadas con alta glucosa en combinación con tamsulosina (**Fig. 29-D**), donde disminuyó a 2.15 veces, y con pioglitazona, donde alcanzó 0.65 veces respecto al control (**Fig. 29-F**).





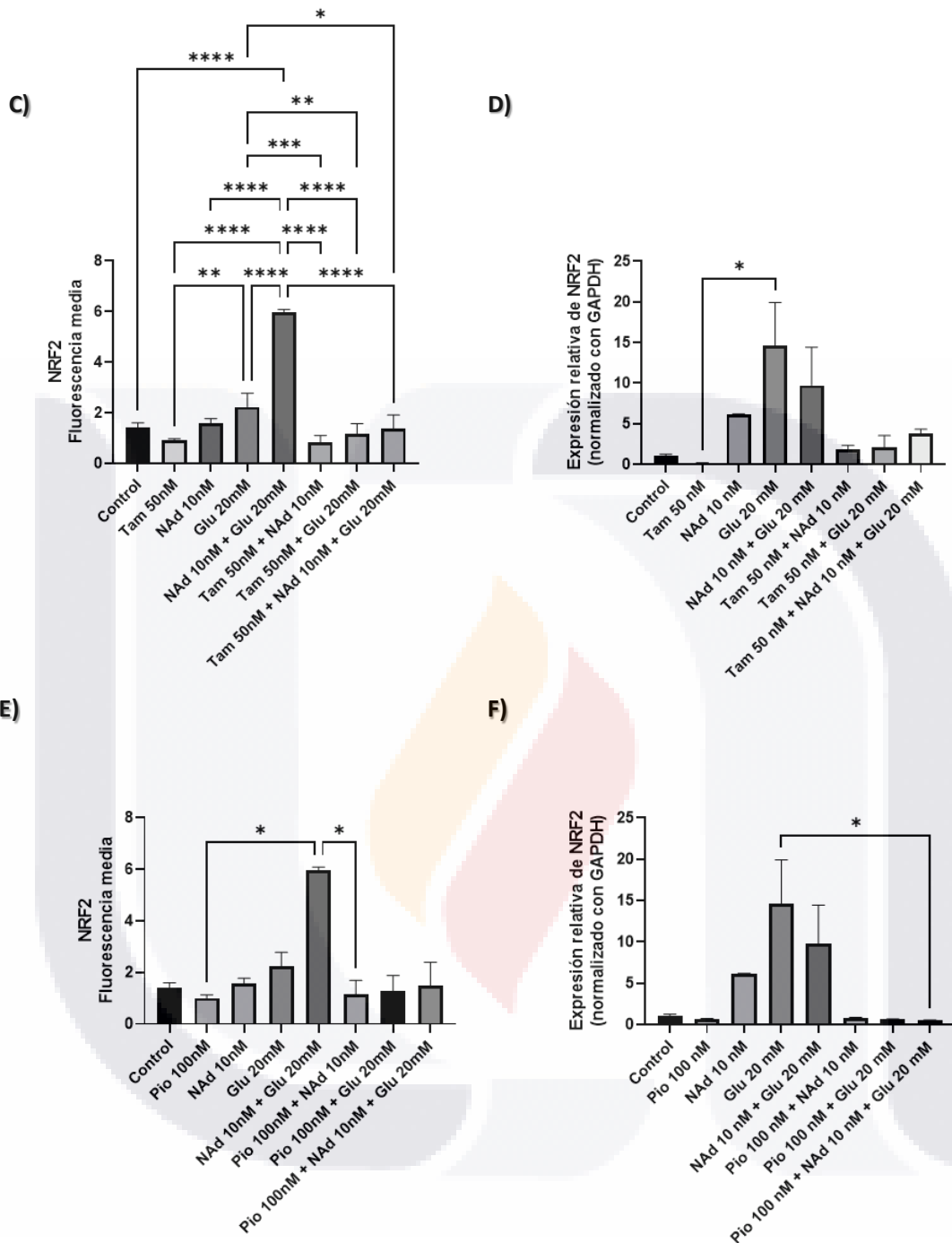


Fig. 29. Expresión de NRF2. Se observa un aumento en la expresión de NRF2 tras la exposición a alta glucosa o NAd. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (verde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Profc acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica de NRF2 determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con tamsulosina. **E)** Expresión génica de NRF2 determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con pioglitazona. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Marcadores fibrogénicos

Los resultados de la síntesis proteica y expresión génica mostraron que tanto la NAd como la alta glucosa incrementaron significativamente la expresión de α -SMA y Col I en comparación con el control.

Tanto tamsulosina como pioglitazona atenuaron la expresión de ambos marcadores relacionados con fibrosis frente a todos los estímulos, aunque con distinta magnitud. Para α -SMA, ambas moléculas disminuyeron la expresión proteica y génica inducida por NAd y alta glucosa, siendo pioglitazona la que mostró el mayor efecto supresor sobre la expresión génica (valores cercanos a cero en todos los tratamientos).

Para Col I, ambas intervenciones redujeron la expresión frente a NAd, alta glucosa y NAd + alta glucosa. La pioglitazona mostró una inhibición más marcada, especialmente bajo un medio con alta glucosa, donde los niveles génicos cayeron a menos del 1 % del control.

La tamsulosina mostró un efecto moderadamente inhibitorio sobre TGF- β , reduciendo tanto la expresión proteica como la génica frente a los tres estímulos, con una mayor disminución en los tratamientos con alta y con la combinación NAd + alta glucosa.

Por su parte, la pioglitazona produjo una inhibición más efectiva al ser inducidas con un medio de alta glucosa, pero mantuvo niveles elevados de expresión génica cuando se combinó con NAd o con NAd + alta glucosa, lo que sugiere una respuesta diferencial y dependiente del tipo de estímulo.

En conjunto, los resultados confirman que NAd y un medio con alta glucosa inducen un fenotipo profibrótico, mientras que tamsulosina y pioglitazona ejercen un efecto antifibrótico, disminuyendo la expresión de α -SMA y Col I en condiciones de estrés metabólico y sobrestimulación del SNS (**Fig. 30-32**).

TGF- β

La expresión génica relativa respecto al control del TGF- β en el grupo tratado con tamsulosina fue de 1.76, con una UFM de 0.44. En contraste, la exposición a alta glucosa incrementó notablemente la expresión génica relativa de hasta 4.94, acompañada de un aumento en la UFM a 1.48 ($****p < 0.0001$). De manera similar, el tratamiento con NAd mostró una expresión génica relativa de 1.78 ($***p < 0.001$) y una UFM de 1.31.

La combinación de alta glucosa y NAd aumentó significativamente la respuesta, alcanzando el valor más alto de expresión génica relativa de 9.94 ($****p < 0.0001$), junto con una UFM de 1.54 ($**p < 0.01$), lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambos estímulos en la expresión de TGF- β (**Fig. 30-A,C,D**).

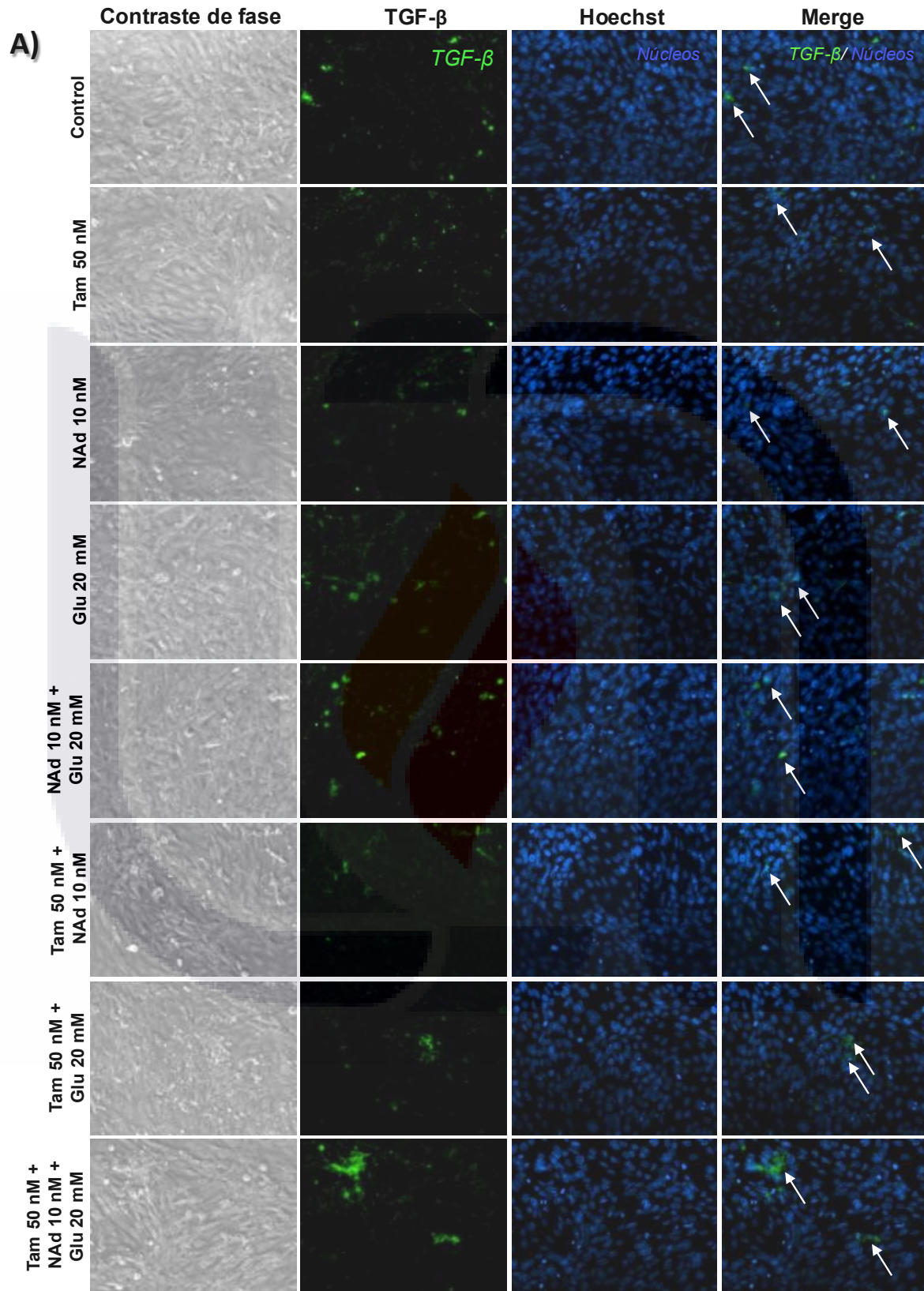
Por otro lado, el tratamiento con tamsulosina en combinación con NAd redujo la expresión génica relativa a 1.56 y la UFM a 0.66. De forma similar, la combinación de tamsulosina con glucosa disminuyó la expresión génica relativa a 2.28 y la UFM a 1.12 ($**p < 0.001$), en comparación con el grupo de solo alta glucosa. En el grupo tratado con tamsulosina, NAd y glucosa, la expresión génica relativa fue de 2.50 y la UFM de 0.98, disminuyendo su expresión a comparación del grupo de NAd y glucosa (**Fig. 30-B,E,F**).

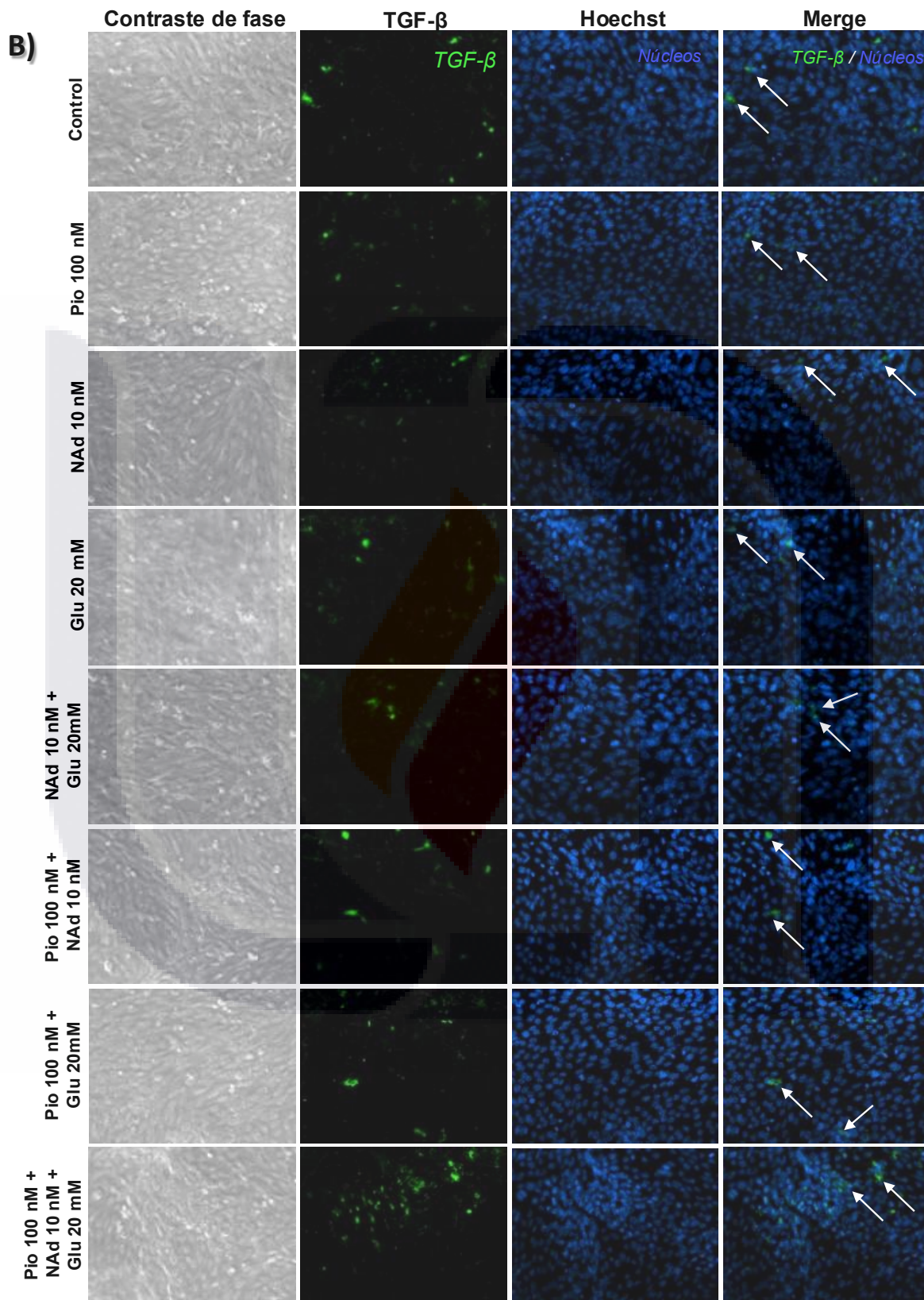
En cuanto al tratamiento con pioglitazona, se observó una disminución marcada en la expresión génica relativa (1.15), aunque con una UFM de 1.14 ($*p < 0.05$). La combinación de pioglitazona con NAd incrementó la expresión génica relativa a 1.77 y la fluorescencia a 1.68 ($****p < 0.0001$). En el grupo de pioglitazona con glucosa ($***p < 0.001$), la expresión génica relativa fue de 0.79 y la fluorescencia media de 1.38, mostrando una reducción respecto al grupo de glucosa sola. Finalmente, la combinación de pioglitazona, NAd y glucosa presentó una expresión génica relativa de 1.40 y una fluorescencia media de 0.95.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la tamsulosina como la pioglitazona atenúan el incremento en la expresión génica relativa inducido por la hiperglicemia y su potenciación por NAd. Este efecto se acompaña de una tendencia

a la disminución en la UFM, lo que sugiere un posible efecto modulador sobre la síntesis proteica asociada al estrés metabólico.







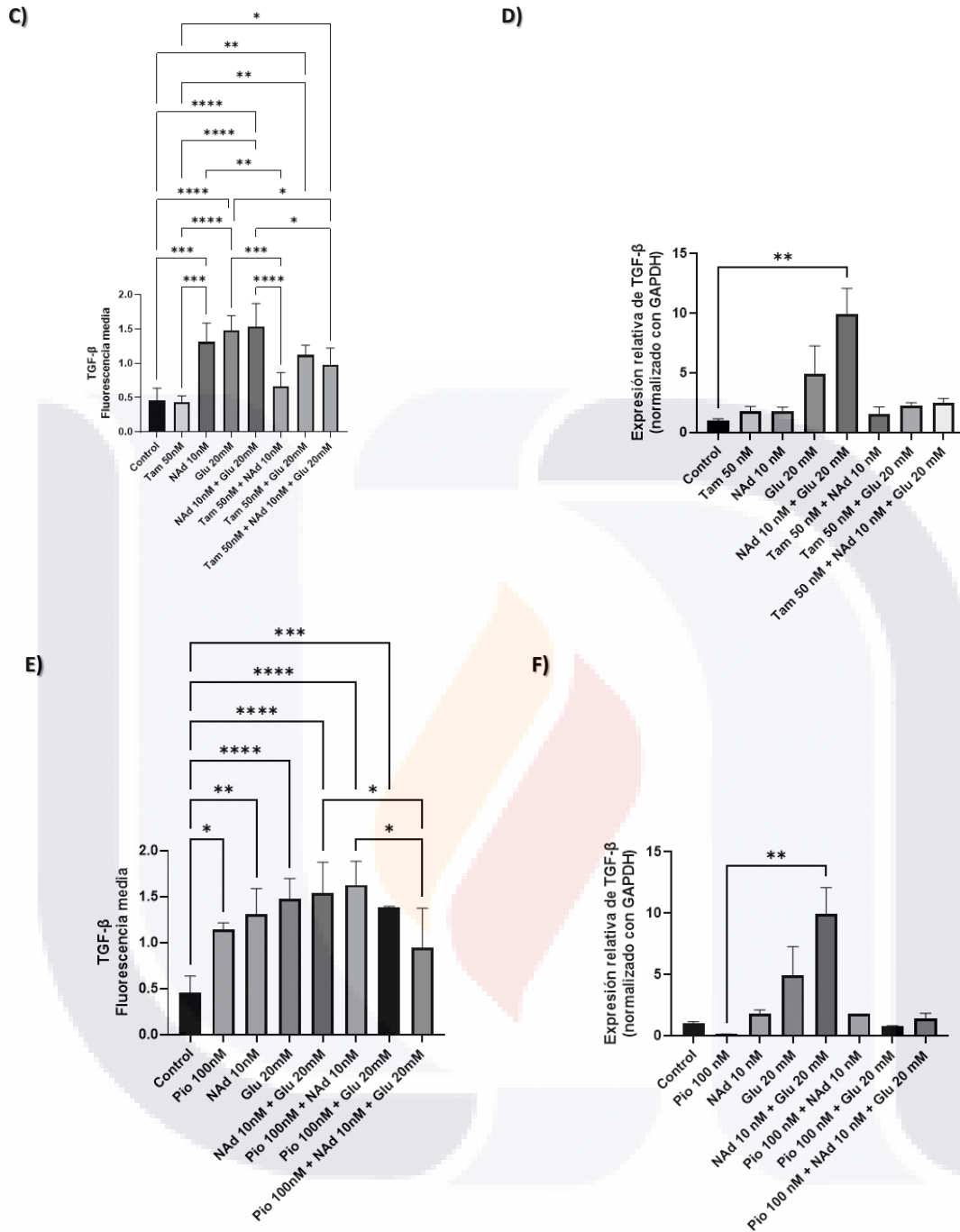


Fig. 30. Expresión de TGF-β. Se observa una mayor activación celular en los grupos tratados con los inductores. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (rverde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Pro acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica de TGF-β determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con tamsulosina. **E)** Expresión génica de TGF-β determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con pioglitazona. Valores *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001.

α -SMA

La expresión de α -SMA fue evaluada a nivel transcripcional y proteico; este último mediante dos aproximaciones complementarias: inmunofluorescencia, expresada como UFM, utilizada como un indicador indirecto de la abundancia proteica, y análisis densitométrico en los distintos grupos experimentales.

En condiciones basales, el tratamiento con tamsulosina presentó una expresión génica relativa de 1.05 (**Fig. 31-H**), acompañada de una UFM de 13.37 (**Fig. 31-A,C**) y un valor densitométrico de 1.04 (**Fig. 31-E,G**). La estimulación con NAd incrementó la expresión génica relativa de α -SMA a 1.98, con una UFM de 14.81 y un valor densitométrico de 1.88 ($***p < 0.001$). De manera concordante, la exposición a alta glucosa indujo un aumento más pronunciado en la expresión génica relativa (3.89), acompañado de una UFM de 15.20 y un valor densitométrico de 1.73 ($**p < 0.01$).

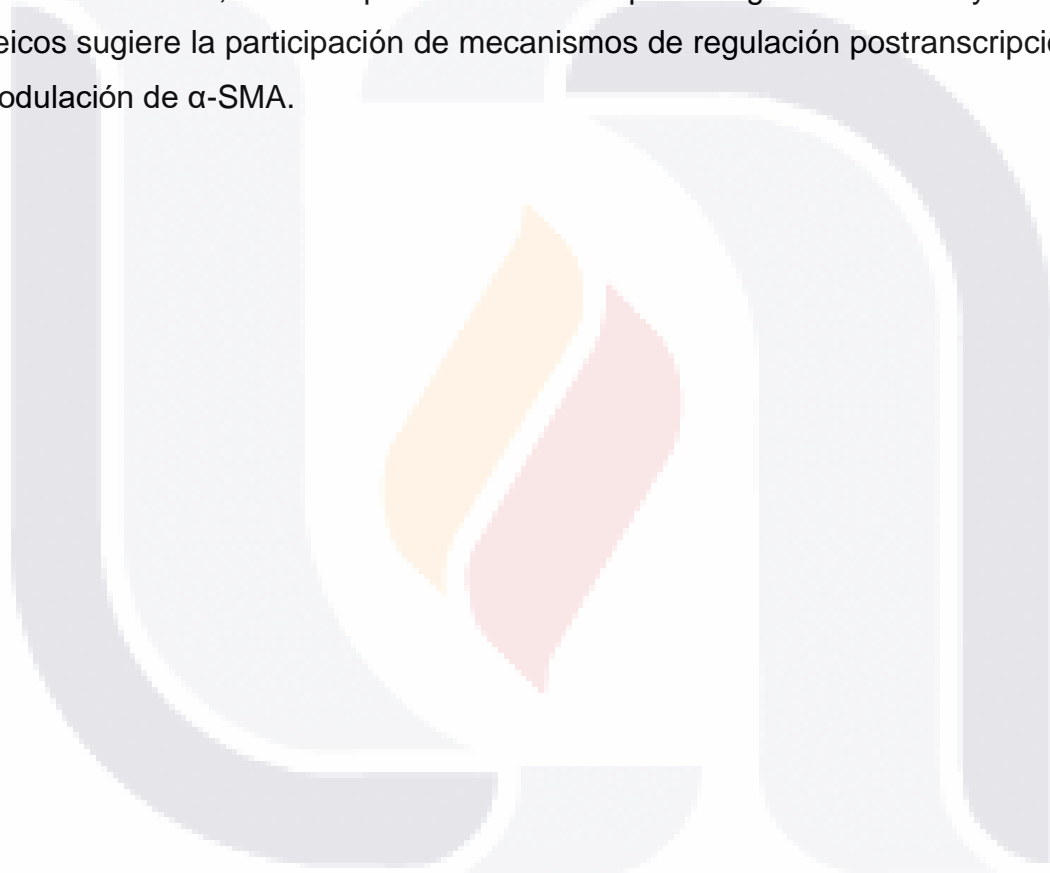
La combinación de NAd y glucosa resultó en una expresión génica relativa de 3.04, asociada a una disminución en la UFM (7.47) y un valor densitométrico de 0.99, lo que sugiere una posible disociación entre los niveles transcripcionales y proteicos bajo condiciones combinadas.

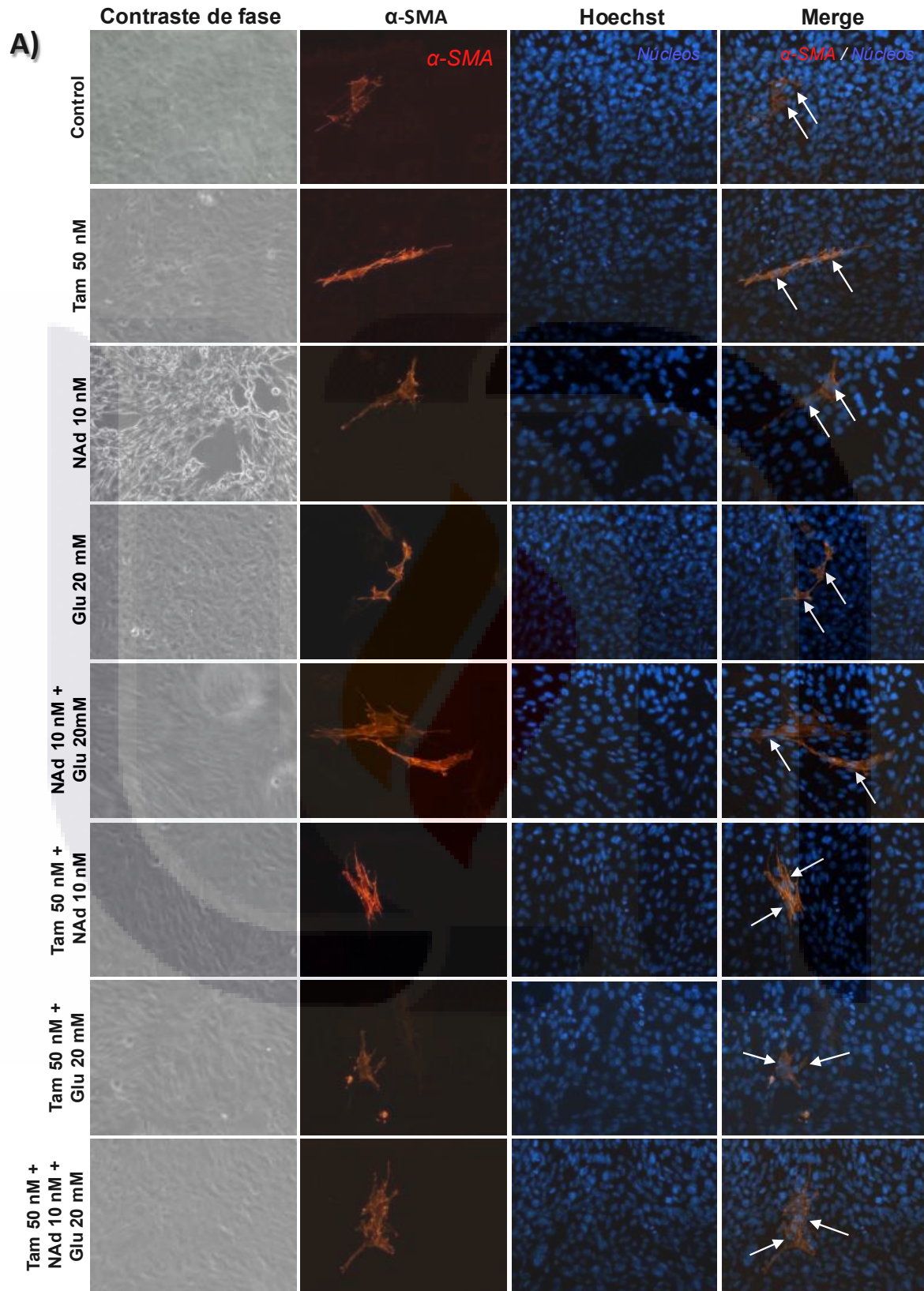
En los grupos tratados con tamsulosina en presencia de los inductores, se observaron efectos diferenciales. El grupo tamsulosina + NAd presentó una expresión génica relativa de 1.18, con una UFM de 12.31 y un valor densitométrico de 1.68 ($**p < 0.01$). Por su parte, el grupo tamsulosina + glucosa mostró una expresión génica relativa de 2.39, con una UFM de 9.88 y un valor densitométrico de 0.86. En el grupo tratado con tamsulosina, NAd y glucosa, la expresión génica relativa fue de 2.20, con una UFM de 15.39 y un valor densitométrico de 0.75, evidenciando una reducción a nivel proteico pese a la persistencia de niveles transcripcionales relativamente elevados.

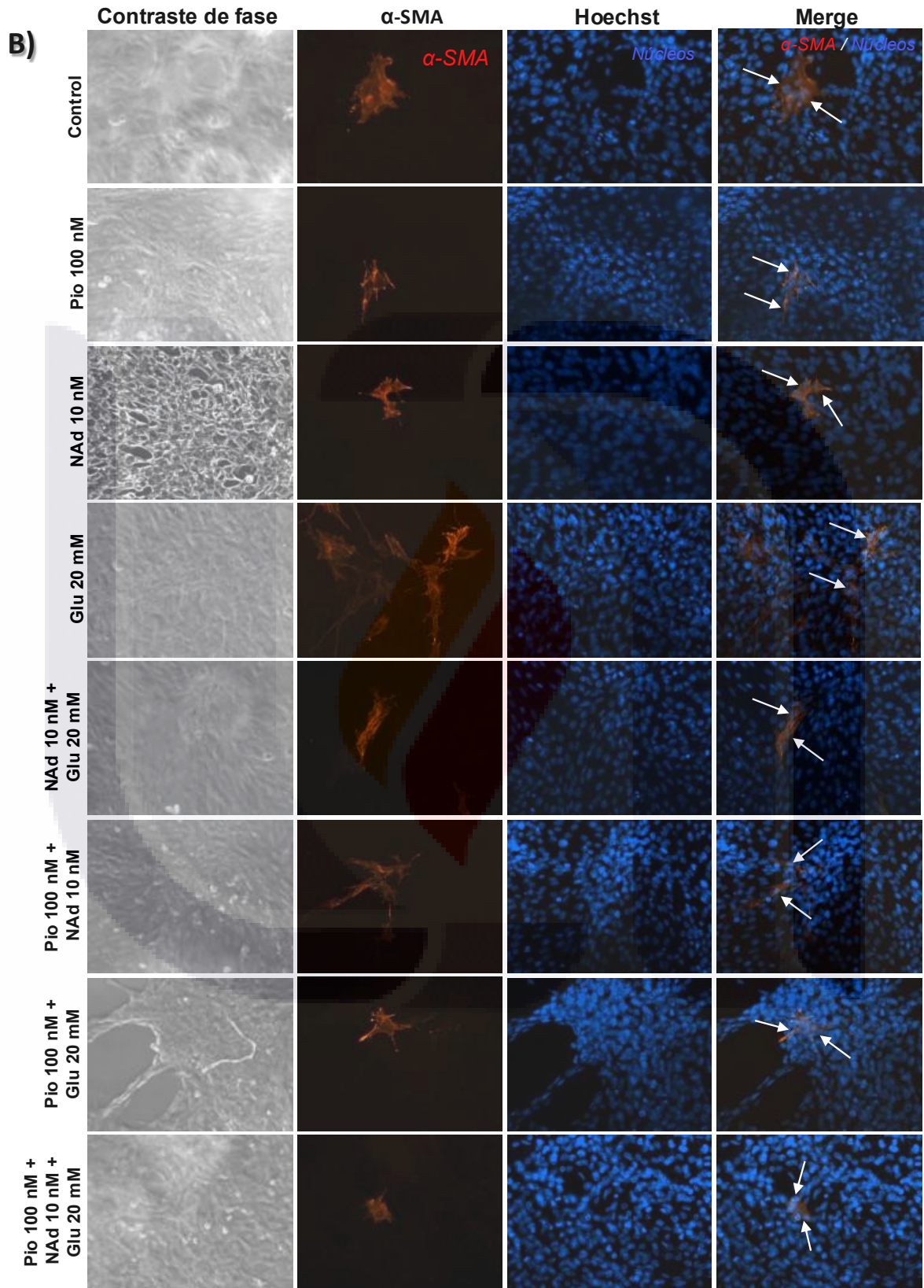
En contraste, la pioglitazona indujo una marcada supresión de la expresión génica relativa basal de α -SMA (0.14) (**Fig. 31-I**), con una UFM de 13.46 (**Fig. 31-B,D**) y un valor densitométrico de 0.79 (**Fig. 31-E,F**). En presencia de NAd, la expresión génica relativa se redujo aún más (0.01), con una UFM de 14.78 y un valor densitométrico de 0.51. En el grupo pioglitazona + glucosa, la expresión génica relativa

fue de 0.08, con una UFM de 12.74 y un valor densitométrico de 1.24. Finalmente, en el grupo pioglitazona + NAd + glucosa, la expresión génica relativa fue de 0.09, con una UFM de 13.37 y un valor densitométrico de 0.24.

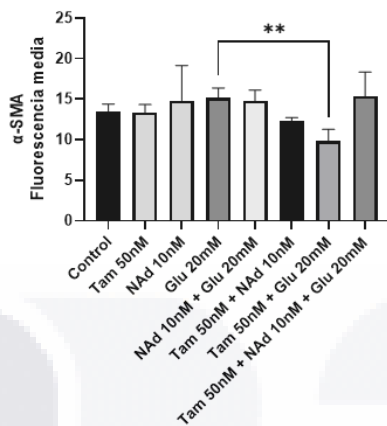
En conjunto, estos hallazgos indican que la pioglitazona ejerce una inhibición más consistente a nivel transcripcional de α -SMA, en comparación con la tamsulosina. No obstante, los efectos observados a nivel proteico, evaluados mediante UFM y análisis densitométrico, evidenciaron una regulación diferencial dependiente del estímulo. Asimismo, la discrepancia entre la expresión génica relativa y los niveles proteicos sugiere la participación de mecanismos de regulación postranscripcional en la modulación de α -SMA.



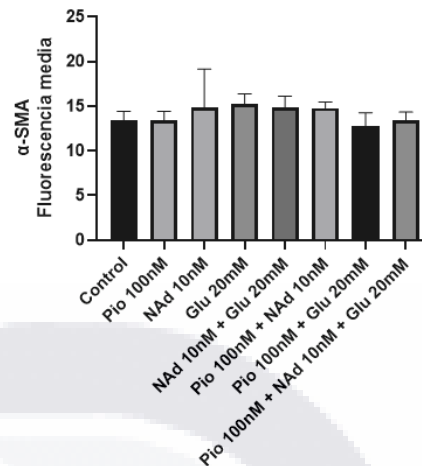




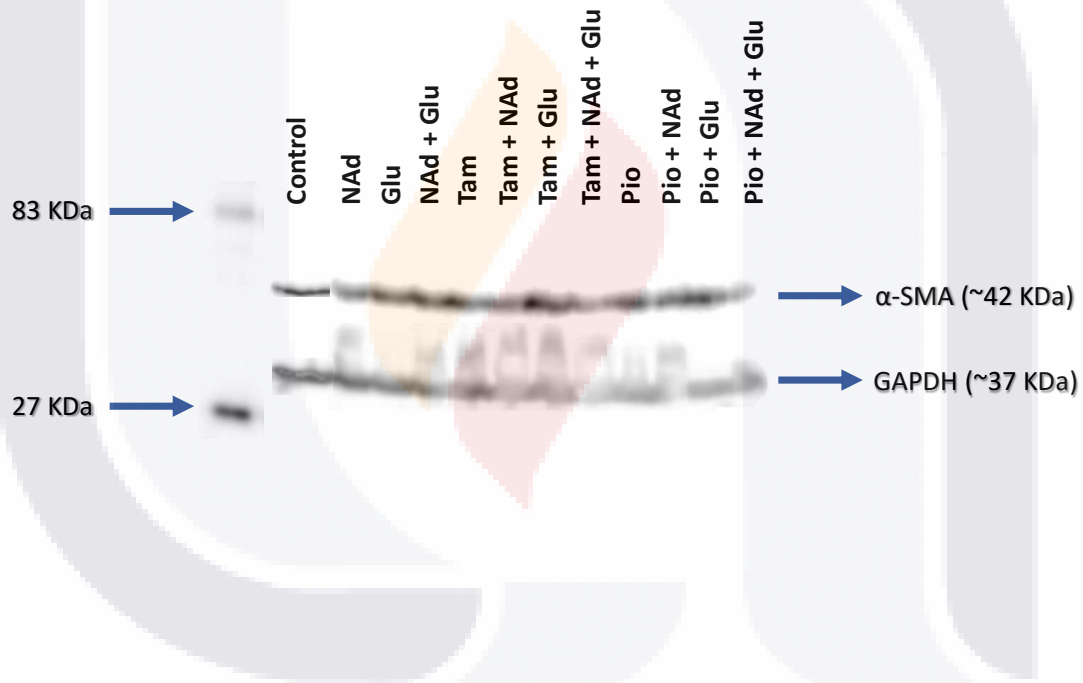
C)



D)



E)



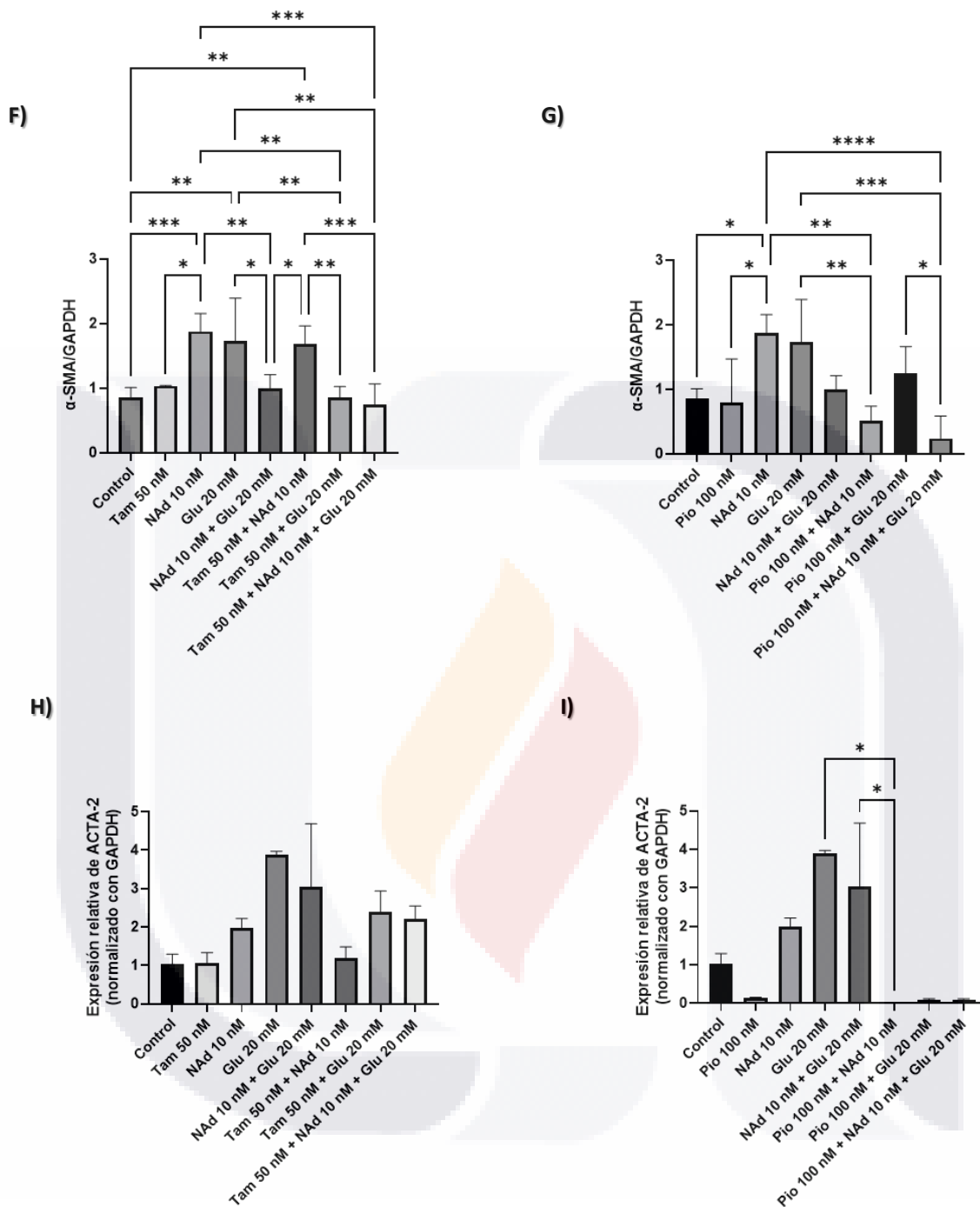


Fig. 31. Expresión de α-SMA. Se observa una mayor activación celular en los grupos tratados con los inductores. El tratamiento con tamsulosina y pioglitazona disminuye la expresión de α-SMA. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 594 como anticuerpo secundario (rojo) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Pro acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica de α-SMA determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con tamsulosina. **E)** Expresión génica de α-SMA determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con pioglitazona. Valores *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 y ****p < 0.0001.

Col-I

La expresión de Col-I fue evaluada a nivel de expresión génica relativa y mediante UFM en los distintos grupos experimentales. En condiciones basales, el tratamiento con tamsulosina mostró una expresión génica relativa de 2.21 (**Fig. 32-D**), con una UFM de 1.75 (**Fig. 32-A,C**). Por su parte, la inducción con NAd incrementó la expresión génica relativa de Col-I a 3.24, con una UFM de 1.96, mientras que la exposición a alta glucosa indujo un aumento más marcado, alcanzando valores de 5.04 y 2.93, respectivamente.

La combinación de NAd y glucosa produjo el mayor incremento observado en la expresión de Col-I, con una expresión génica relativa de 5.69 y una UFM de 7.47 ($**p < 0.01$), lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambos estímulos en la inducción de fibrosis.

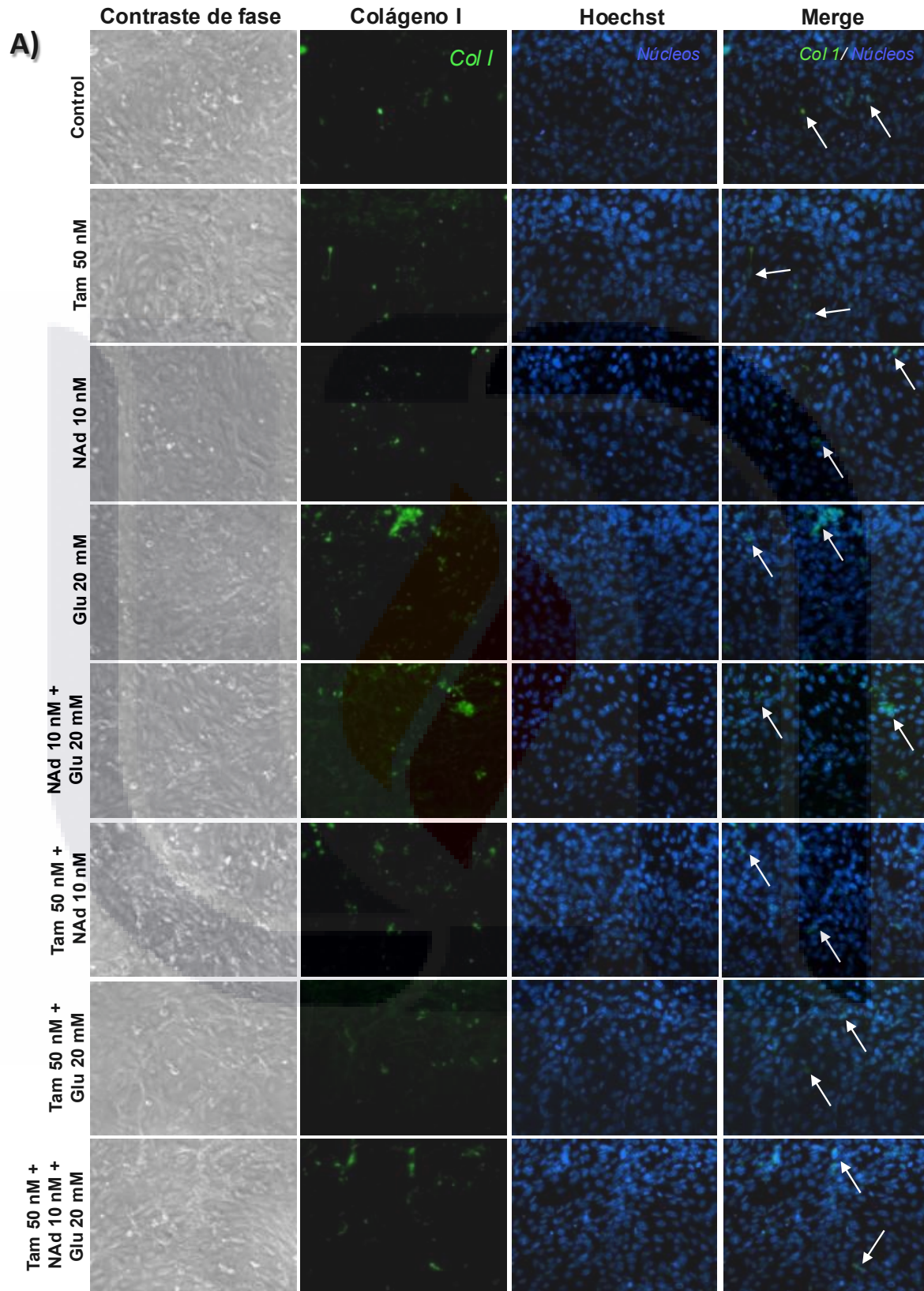
En los grupos tratados con tamsulosina en presencia de los inductores, se observó una disminución parcial de la expresión de Col I. Específicamente, en el grupo tamsulosina + NAd se observó una expresión génica relativa de 3.57 y una UFM de 1.55, mientras que el grupo tamsulosina + glucosa mostró valores de 4.67 y 3.24, respectivamente, por lo que la tamsulosina no disminuyó la síntesis proteica de Col I. Notablemente, el tratamiento combinado de tamsulosina con NAd y glucosa redujo de forma marcada la expresión de Col-I, alcanzando valores de 2.25 en expresión génica relativa y 1.42 en UFM.

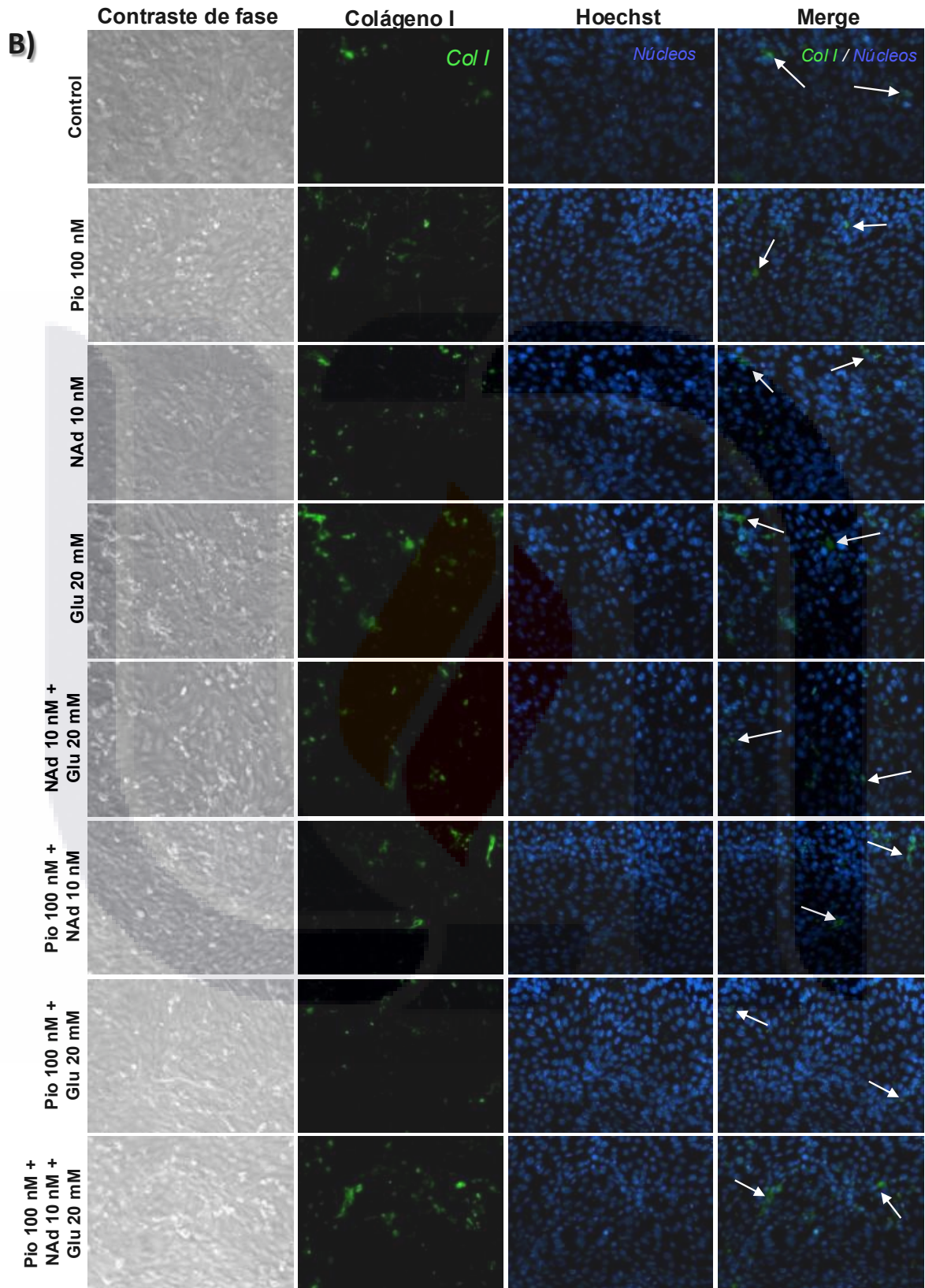
En contraste, la pioglitazona mostró mayor efecto en la reducción de la expresión de Col-I. En condiciones basales, este fármaco presentó una expresión génica relativa de 0.16 (**Fig. 32-F**) y una UFM de 1.38 (**Fig. 32-B,E**). En presencia de NAd, la expresión aumentó a 1.83 con una UFM de 1.72; sin embargo, estos valores permanecieron por debajo de los observados en los grupos sin tratamiento. En el grupo pioglitazona + glucosa, la expresión génica relativa disminuyó notablemente a 0.35, con una UFM de 0.72. Finalmente, en el grupo pioglitazona + NAd + glucosa, se observó una expresión génica relativa de 1.42 y una UFM de 1.81.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la tamsulosina como la pioglitazona atenúan la sobreexpresión de Col-I inducida por NAd y alta glucosa, siendo la

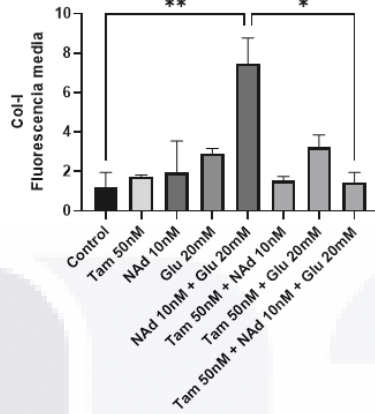
pioglitazona el tratamiento más eficaz en la reducción de marcadores fibrogénicos, sin embargo, la tamsulosina no controla la síntesis proteica de Col I.



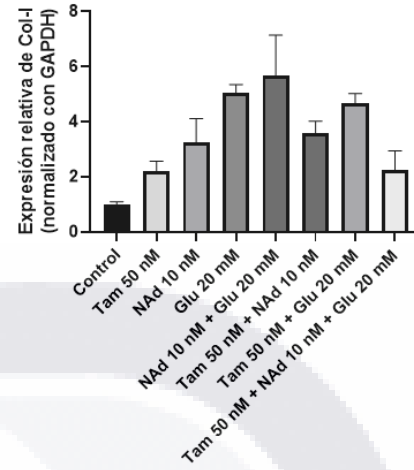




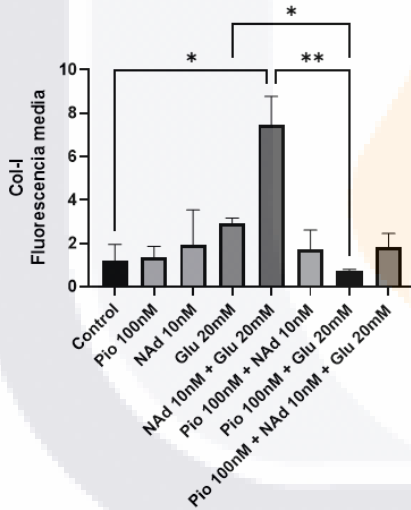
C)



D)



E)



F)

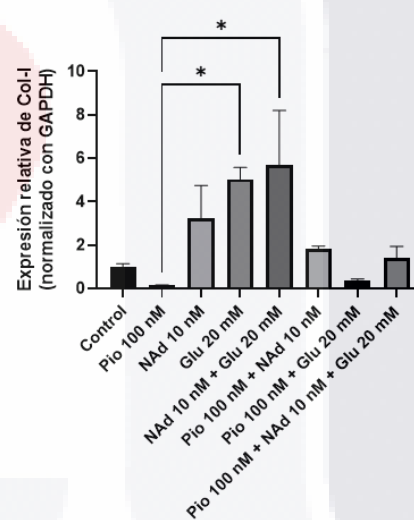


Fig. 32. Expresión de Col I. Se observa una mayor activación celular en los grupos tratados con los inductores; sin embargo, el grupo inducido con ambos inductores mostró una mayor síntesis de Col I. **A–B)** Detección por inmunofluorescencia utilizando Alexa Fluor™ 488 como anticuerpo secundario (verde) y Hoechst para la tinción nuclear (azul). Las células positivas se indican con flechas blancas. Las imágenes fueron tomadas a 200x utilizando la cámara digital CoolSNAP-Pro acoplada al microscopio ZEISS Axioskop 40. **C)** Expresión génica de Col I determinada por RT-qPCR para el tratamiento con tamsulosina. **D)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con tamsulosina. **E)** Expresión génica de Col I determinada por RT-qPCR para el tratamiento con pioglitazona. **F)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo para el tratamiento con pioglitazona. Valores *p < 0.05 y **p < 0.01.

Discusión de resultados

La ERC constituye una patología de alta relevancia clínica debido a su asociación con un incremento en la mortalidad, afectando a más del 60% de la población mayor de 80 años (Ruiz-Ortega et al., 2020). Uno de los principales desafíos en su manejo radica en la ausencia de tratamientos efectivos, lo cual se atribuye a la complejidad de los mecanismos inflamatorios y fibrogénicos subyacentes, particularmente en la progresión de las patologías de la ND y la hipertensión (Kang et al., 2003; Nastase et al., 2018).

Actualmente, los tratamientos de primera línea incluyen fármacos dirigidos al control de la hiperglucemia, como los inhibidores de SGLT2 y los agonistas del receptor GLP-1 (J.-H. Zhao, 2019); así como bloqueadores del RAS, recomendados en pacientes con proteinuria o nefropatías de origen hipertensivo (Ruiz-Ortega et al., 2020). No obstante, estas estrategias terapéuticas únicamente logran ralentizar la progresión de la enfermedad y, en muchos casos, requieren dosis elevadas para alcanzar un efecto clínico significativo, lo que incrementa el riesgo de efectos adversos (Kang et al., 2003; Nastase et al., 2018); por lo que se requiere el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la ERC.

En el presente estudio, se observó que tanto la tamsulosina como la pioglitazona presentan un potencial efecto antifibrótico y antiinflamatorio en un modelo *in vitro* de CMs, lo que sugiere su posible utilidad como estrategias terapéuticas complementarias.

Por otro lado, para este proyecto se realizó la caracterización de las CMs obtenidas en cultivo primario, lo que adquiere especial relevancia en la ERC asociada a DM, una complicación de largo plazo causada por hiperglucemia sostenida (Romagnani et al., 2017), caracterizada por alteraciones vasculares y metabólicas derivadas de cambios de la matriz extracelular. Dichas alteraciones afectan la retina, la vascularización periférica (pie diabético) y órganos altamente irrigados. En riñón, inducen la expansión mesangial y acumulación de matriz extracelular, alterando así la fisiología glomerular (Esler et al., 1989; Kong et al., 2015; Majumder et al., 2020).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los resultados muestran que, al inicio del cultivo del tejido cortical renal, las CMs pueden coexistir con células epiteliales parietales y viscerales, lo que refleja la heterogeneidad celular del tejido. La morfología observada (con CMs estrelladas formando multicapas y células epiteliales poligonales) coincide con lo reportado por Wilson y Stewart, lo que valida el comportamiento fenotípico esperado.

La obtención de un cultivo purificado de CMs al día 23, en comparación con los 30 días reportados previamente, sugiere que las condiciones de cultivo empleadas aceleraron la purificación celular, posiblemente debido a variaciones en la densidad celular inicial o en la composición del medio de cultivo. Cabe destacar que las células parietales y viscerales del glomérulo, al no ser de origen mesenquimal, presentan una alta sensibilidad a la tripsinización y no sobreviven *in vitro* por periodos prolongados (Rodríguez-Barbero et al., 2000; Wilson & Stewart, 2012).

Diversos autores han señalado que no existe un marcador específico para las CMs, debido a los múltiples fenotipos que pueden desarrollar. No obstante, estas células se caracterizan por su positividad para Thy-1, una proteína membranal, y α -SMA, una proteína citoesquelética, ambas comúnmente utilizadas como marcadores de caracterización de las CMs.

Al igual que lo reportado por Nobiling y Bührle en 1987, los polímeros de α -SMA en las CMs de este estudio se organizaron de forma paralela, extendiéndose de un extremo del citoplasma al otro (Nobiling & Bührle, 1987; Rodríguez-Barbero et al., 2000; Wilson & Stewart, 2012). Este patrón, junto con la morfología característica y la positividad para Thy-1 y α -SMA, confirma que el cultivo obtenido corresponde a CMs purificadas, proporcionando un modelo celular confiable para estudios *in vitro*. Sin embargo, la baja tasa de proliferación del cultivo primario impidió realizar experimentos adicionales, por lo que se optó por emplear la línea celular mesangial de ratón SV40 MES 13.

El medio con alta glucosa se ha empleado ampliamente como un modelo *in vitro* de la ND, utilizando típicamente concentraciones de 20, 25 y 30 mM (Chen et al., 2018; Jie et al., 2020). No obstante, algunos estudios han reportado citotoxicidad a 30 mM (Ding et al., 2017). En este trabajo, la exposición de las CMs a dichas concentraciones

de glucosa incrementó la proliferación y la permeabilidad membranal, evidenciando el daño celular típico de la ND. La concentración de 20 mM mostró un efecto proliferativo y permeabilidad membranal sin causar un efecto citotóxico, por lo que fue seleccionada para los experimentos posteriores. Dicha concentración equivale a 360.31 mg/dL de glucosa, correspondiente a los niveles hiperglucémicos observados en pacientes diabéticos descontrolados.

En el mesangio, la expansión y el aumento de la matriz mesangial son consecuencia de la activación de las CMs (Thomas & Ford Versypt, 2022). Por ello, se realizaron pruebas de viabilidad y proliferación para determinar su grado de activación. Ni la tamsulosina, ni la pioglitazona modificaron la proliferación o viabilidad celular bajo condiciones normales. Por lo tanto, *per se*, los tratamientos de tamsulosina y pioglitazona en las concentraciones utilizadas, no generaron daño celular. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zhao et al. (2021), quienes observaron que la rosiglitazona (perteneciente a la misma familia de las TZD), no afecta la viabilidad celular a bajas concentraciones, aunque a dosis elevadas produce toxicidad; sin embargo, la pioglitazona incrementa la proliferación celular (D. Zhao et al., 2021). En contraste, el medio alto en glucosa y la NAd incrementaron la proliferación de CMs, lo que sugiere su activación.

El ensayo con Sytox Green mostró un mayor número de células con daño de membrana en el grupo alta glucosa, en concordancia con lo descrito por Kang et al. (2003), quienes atribuyeron este efecto a la apoptosis inducida por las ROS (Kang et al., 2003). En nuestro estudio, se observó un incremento de superóxido en las CMs tratadas con alta glucosa, mientras que la combinación de alta glucosa con tamsulosina o pioglitazona redujo la proporción de células dañadas, indicando un posible efecto protector mediado por la regulación de la función mitocondrial (Kamiar et al., 2021).

Por otro lado, el calcio intracelular está relacionado con numerosas funciones celulares (Bonventre, 1996; Stockand & Sansom, 1998). Sin embargo, bajo condiciones patológicas, un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular puede

inducir apoptosis (Moon, 2023) o necrosis, debido al daño en organelos como las mitocondrias o el retículo endoplásmico o necrosis, dañando las mitocondrias o el retículo endoplasmático (Dong et al., 2006).

No obstante, pocos estudios han evaluado los efectos de concentraciones elevadas de Ca^{2+} intracelular en CMs inducidas por alta glucosa. En un estudio realizado por Saleh et al. (2000), se demostró que altas concentraciones de glucosa incrementan el Ca^{2+} intracelular, lo que puede iniciar vías de señalización apoptótica (Saleh et al., 2000). De manera consistente con estos hallazgos, en el presente trabajo se observó que la exposición a alta glucosa, NAd o la combinación de ambos estímulos incrementó la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, lo cual sugiere la presencia de daño celular.

Por otro lado, la hipertensión constituye otra causa importante de la ERC. Actualmente, no existe un modelo *in vitro* establecido en CMs que reproduzca las condiciones hipertensivas causadas por una sobreactivación del SNS; por ello, en este estudio se utilizó NAd para simular la hipertensión. Hasta el momento, no se ha reportado en la literatura una concentración óptima de NAd capaz de inducir la activación de las CMs; sin embargo, se sabe que la NAd actúa principalmente sobre los receptores α_1 -AR (Carrier & White, 1985). Sigala *et al* (2013), demostraron en células estelares hepáticas (CEH) (pericitos funcionalmente análogos a las CMs) que la concentración de 10 nM de NAd induce la máxima proliferación (Kostallari & Shah, 2019; Sigala et al., 2013).

Dado que los α -AR poseen propiedades proliferativas (Kong et al., 2015; Tsai et al., 1995), y su sobreactivación produce estrés en el retículo endoplásmico (Abdullahi et al., 2020); se realizó el ensayo de SYTOX Green con el objetivo de evaluar el daño celular mediante la permeabilidad de la membrana plasmática, que puede ser provocado por el estrés del retículo endoplasmático. Con base en estos resultados, se seleccionó una concentración de NAd de 10 nM para los experimentos subsecuentes, debido a la relación observada entre el aumento en la proliferación celular y la menor permeabilidad de la membrana en las diferentes concentraciones de NAd evaluadas.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la participación de los AR en la regulación de metabolismo de la glucosa en CMs, con el propósito de prevenir su activación en condiciones de hiperglicemia, situación común en pacientes con ND. Estudios previos han demostrado los efectos de la estimulación de receptores α - o β -AR en CMs; por ejemplo, la activación de α 1-AR genera un efecto contráctil, aumenta la síntesis de matriz extracelular y promueve una respuesta proinflamatoria (Kong et al., 2015; Pawluczyk et al., 2006). Por otro lado, la estimulación de los β -AR (en particular β 2) modulan la respuesta inmunitaria, incrementa la función y biogénesis mitocondrial y optimiza la cadena respiratoria (Kamiar et al., 2021).

En este estudio se demostró que las CMs SV40 MES 13 expresan diferentes subtipos de receptores α - y β -AR, de manera similar a lo reportado en cultivos primarios de CMs. De acuerdo con la Figura 16, se observó la expresión de α 1-, α 2-, β 1-, β 2- y β 3-AR en las CMs. La tamsulosina, un antagonista de los receptores α 1A- y α 1D-AR (Chapple & Andersson, 2002) se utiliza comúnmente para tratar la hiperplasia prostática benigna; sin embargo, existen pocos estudios que analicen sus posibles efectos renoprotectores y sus beneficios potenciales en el control de los procesos fibrogénicos observados en la ND.

En relación con el comportamiento de los receptores α 1- y β 2-AR en la línea celular SV40 MES 13 inducida con NAd y/o alta glucosa, se observó un cambio en su expresión: el α 1-AR se incrementó, mientras que el β 2-AR disminuyó. Este patrón coincide con lo descrito por Safi et al. (2014) y Papay et al. (2020), quienes reportaron una disminución de β -AR y un aumento de α -AR en células endoteliales inducidas con alta glucosa. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el incremento de α 1-AR en las CMs favorecen su activación, promoviendo un estado proinflamatorio y profibrogénico (Papay & Perez, 2021; Safi et al., 2014).

La adición de tamsulosina redujo la expresión de α -AR y restauró la de β -AR, lo que indica un posible efecto regulador sobre la activación celular causada por la alta glucosa. Por otro lado, la pioglitazona atenuó solo el α 1-AR, aunque no logró restaurar la expresión de β 2-AR, sugiriendo que la disminución de este receptor depende

principalmente de la hiperglucemia y ocurre de manera independiente de las vías mediadas por PPAR γ (Kamiar et al., 2021).

La regulación del proceso antioxidante celular está controlada por el sistema NRF2, el cual es modulado por la proteína Keap1 (Samsu, 2021). En condiciones de alta glucosa, las ROS generadas durante la respiración celular incrementan el estrés oxidativo (Jasielec et al., 2020), mientras que la activación de la vía del poliol reduce la disponibilidad de NADPH, cofactor esencial para la regeneración del glutatión reducido (Brownlee, 2005). En consecuencia, las CMs incrementaron la expresión de genes antioxidantes en respuesta al aumento de ROS.

El estrés oxidativo también induce la sobreproducción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , que amplifican el estrés oxidativo mediante la activación de NF- κ B. La activación del sistema NRF2/elementos de respuesta antioxidante (ARE) interrumpe este ciclo al inducir genes antioxidantes y antiinflamatorios, entre ellos hemo oxigenasa-1 (HO-1), que atenúan el daño y limitan la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Ahmed et al., 2017; Samsu, 2021).

La actividad de NF- κ B influye en la vía Keap1/NRF2/ARE a través de varios mecanismos: Keap1 media la ubiquitinación y degradación de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa-B (IKKB), lo que suprime la activación de NF- κ B; mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) reaccionan con Keap1 para activar NRF2, coordinando la transcripción génica y, simultáneamente, suprimiendo la actividad de NF- κ B; además, NF- κ B compite con NRF2 por el coactivador transcripcional CBP (cAMP-response-element-binding protein). En conjunto, estos mecanismos evidencian la regulación recíproca entre NRF2 y NF- κ B como moduladores clave de la inflamación inducida por el estrés oxidativo (Ahmed et al., 2017; Samsu, 2021).

El incremento en la expresión de NRF2 observado en las CMs podría deberse a la exposición a alta glucosa. Aunque NRF2 ejerce una función citoprotectora, su activación excesiva se ha asociado con efectos proapoptóticos, como se ha reportado en células β pancreáticas, la sobreexpresión de Keap1 (que suprime NRF2) restaura

la proliferación y reduce la apoptosis (He et al., 2019), además se han reportado efectos pro-apoptóticos similares de NRF2 en células renales, mediados por interacciones con p53 y con las vías mitocondriales (Dai et al., 2023).

La tamsulosina indujo una disminución en la expresión de superóxido y NRF2, lo cual coincide con lo descrito por Sun et al. (2021) en células endoteliales, donde se observó que el fármaco disminuye la actividad de NF- κ B y por lo tanto, reduce los niveles de ROS, NF- κ B, IL-6 e IL-8, TGF- β 1 y Col I; de manera similar, en este trabajo se observó una reducción de NF- κ B y TGF- β en CMs tratadas con alta glucosa y/o NAd en combinación con tamsulosina, sugiriendo que, al igual que en las células endoteliales glomerulares, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio y antifibrótico (Sun et al., 2021).

Sin embargo, en condiciones de alta glucosa, la tamsulosina aumentó la expresión de IL-1 β a pesar de la reducción de NF- κ B, lo que podría explicarse por la activación de vías independientes de NF- κ B, como AP-1 o MAPKs (Sedor et al., 1992; Tak & Firestein, 2001). Estos resultados sugieren que, aunque la tamsulosina suprime mediadores clásicos de inflamación como NF- κ B e IL-17, la expresión de IL-1 β se mantiene mediante mecanismos transcripcionales alternativos, los cuales podrían modular las actividades contráctiles y proliferativas de estas células inducidas por alta glucosa. Dado que son pocos los estudios que han explorado las actividades antiinflamatorias y antifibrogénicas asociadas, se requieren investigaciones adicionales centradas en las vías de señalización implicadas.

Por otro lado, los efectos antiinflamatorios y antifibrogénicos de la pioglitazona han sido reportados previamente en modelos *in vivo* (Ko et al., 2008; Ueta et al., 2004). En el presente trabajo, también se corroboró que ejerce dichos efectos antiinflamatorios y antifibróticos en CMs; no obstante, se requieren estudios *in vitro* adicionales para comprender las vías de señalización involucradas.

En cuanto a la organización del citoesqueleto, se ha reportado que en líneas de fibroblastos la polimerización de F-actina disminuye, mientras que la expresión de α -SMA aumenta cuando estas células son estimuladas con TGF- β , lo que produce su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferenciación al fenotipo miofibroblástico (Maruri et al., 2022). De manera análoga, en este trabajo se observó un posible cambio fenotípico en el tipo de actina expresada por las CMs, lo que sugiere que existió un cambio al tipo miofibroblasto.

Al ser inducidas las CMs con el medio de alta glucosa, presentaron una disminución en la polimerización de G-actina a F-actina, acompañada por un incremento en la expresión génica y proteica de α -SMA. Además, la respuesta de los canales de calcio se incrementó en respuesta a este inductor, lo cual se correlaciona con un posible cambio fenotípico del citoesqueleto, aumentando la expresión de las fibras contráctiles. Estos resultados demuestran que las CMs fueron fuertemente activadas por el medio alta glucosa y NAd, corroborando los hallazgos previos relacionados con las respuestas proinflamatorias y profibrogénicas descritas en estas células (Stephenson et al., 1998a).

Adicionalmente, la presencia de F-actina y el aumento del área celular de las CMs proporcionan información sobre el estado de hipertrofia celular, lo cual se asocia con la desorganización del citoesqueleto (fibras de actina), el incremento del área celular y la disminución de F-actina (Dubus et al., 2003; Stephenson et al., 1998b; Z. X et al., 1997). Por lo tanto, se confirmó que la glucosa indujo hipertrofia celular, hallazgo que ya ha sido reportado previamente (Jh et al., 1998; W. X et al., 2015). No obstante, este estudio demuestra por primera vez que tanto la tamsulosina como la pioglitazona reducen la hipertrofia celular en CMs expuestas a alta glucosa.

En CMs no se han reportado estudios que evalúen la hipertrofia inducida por NAd. Sin embargo, en un estudio realizado en cardiomiocitos se observó que la NAd induce también hipertrofia celular (Simpson, 1983). Cabe destacar que los cardiomiocitos, al igual que las CMs, comparten características propias de células de músculo liso. Sin embargo, al combinar un medio alto en glucosa con NAd, no se observó una disminución ligera en la actividad de la F-actina en comparación con las células estimuladas únicamente con NAd o con alta glucosa. Este resultado sugiere la posible existencia de un mecanismo compensatorio cuando ambos inductores están presentes. Por lo tanto, se requieren experimentos adicionales que permitan esclarecer las bases de este fenómeno. Una posible hipótesis es la participación de

los β -AR en la regulación del metabolismo de la glucosa, lo que podría modular la respuesta celular observada.

Respecto a la actividad oxidante, inflamatoria y fibrogénica de las CMs activadas por NAd, no existen reportes previos en modelos *in vitro*. Sin embargo, en el presente estudio se observó que la NAd incrementó la síntesis de superóxido mitocondrial, lo que sugiere la inducción de estrés mitocondrial, acompañado de una sobreexpresión de NRF2. No obstante, se identificó nuevamente un patrón que sugiere la presencia de un mecanismo regulador en las CMs cuando son estimuladas simultáneamente con ambos inductores. Este fenómeno no ha sido descrito previamente en la literatura; por lo tanto, se requieren estudios adicionales que permitan esclarecer los mecanismos responsables de la ausencia de un efecto sumatorio o sinérgico en la expresión de estos marcadores.

En otras estirpes celulares, como en las CEH, se ha descrito que la exposición a NAd aumenta la actividad de marcadores inflamatorios (IL-8 y NF- κ B) y fibrogénicos (Col I) (Sancho-Bru et al., 2006; Tang et al., 2022). De manera similar, en las células SV40 MES 13 se observó un incremento en la expresión de los marcadores NF- κ B, IL-1 β , IL-17, TGF- β , α -SMA y Col I, lo cual confirma la activación de los AR en respuesta a la NAd.

Por otro lado, los tratamientos farmacológicos redujeron la transdiferenciación de las CMs inducida por alta glucosa. Estudios previos han reportado los efectos antifibróticos y antiinflamatorios de la tamsulosina en modelos de lesión hepática y pulmonar (Alabdali & Ibrahim, 2023; Medina-Pizaño et al., 2025); no obstante, su efecto sobre las CMs bajo condiciones de alta glucosa no había sido explorado con detalle. Los resultados de este trabajo demuestran que tanto la tamsulosina como la pioglitazona modulan la expresión de los AR, las citocinas proinflamatorias (IL-17, NF- κ B) y los marcadores fibrogénicos (α -SMA), sugiriendo su potencial papel en la reducción del estrés inducido por la hiperglucemia.

Cabe destacar que la tamsulosina no redujo significativamente la expresión de Col I en las CMs bajo condiciones de alta glucosa (alta glucosa: 5.04 veces; alta

glucosa y tamsulosina: 4.67 veces), lo que indica un impacto mínimo en comparación con el grupo alta glucosa. Esto podría reflejar la capacidad de las CMs para adoptar distintos fenotipos en respuesta a los estímulos: células quiescentes que mantienen la homeostasis glomerular, células activadas que expresan marcadores inflamatorios y fibrogénicos, y células inactivadas que conservan un estado semi-activado con expresión residual de α -SMA y Col I, pero sin un efecto patológico (Stephenson et al., 1998). La tamsulosina podría favorecer un cambio hacia este fenotipo inactivado bajo condiciones de alta glucosa, modulando la activación mesangial sin suprimir completamente la expresión de los marcadores fibrogénicos.

Asimismo, cuando las CMs fueron estimuladas con NAd junto con la tamsulosina, se observó una disminución en la expresión de Col I y una respuesta antiinflamatoria, lo que sugiere que el efecto se debe a su antagonismo competitivo sobre los α -AR, evitando la unión de la NAd (Pourmand et al., 2016). Aunque la tamsulosina mostró efectos antiinflamatorios y antifibrogénicos en ambos modelos de inducción, su eficacia fue mayor en un medio con alta glucosa que en el estimulado con NAd.

Además, se ha reportado previamente el efecto antiinflamatorio y antifibrogénico de la pioglitazona (Ko et al., 2008; Ueta et al., 2004). En otro estudio elaborado por Isshiki, et al. (2000), se demostró que la troglitazona ejerce efectos antifibrogénicos en el glomérulo (Isshiki et al., 2000); sin embargo, no existen trabajos previos sobre el efecto de la pioglitazona cuando las células son estimuladas con NAd. En el presente estudio también se observó que la pioglitazona posee efectos antiinflamatorios y antifibróticos; aunque su eficacia fue mayor bajo condiciones de alta glucosa.

Estos hallazgos coinciden con los resultados previos de Morones J. et al. (2024), quienes demostraron que ambos tratamientos disminuyen los marcadores histopatológicos de inflamación y fibrosis, confirmando un efecto renoprotector de ambos tratamientos en un modelo *in vivo* de ND (Morones et al., 2024).

Debido a la limitada evidencia sobre la liberación de Ca^{2+} citoplasmático en CMs estimuladas con NAd, se consideraron estudios realizados en células de músculo liso, las cuales comparten características funcionales con las CMs. En este sentido, Shogakiuchi, *et al.* (1986) demostraron que la activación de α -AR en células de músculo liso incrementa la liberación de Ca^{2+} citoplasmático de manera dosis-dependiente (Shogakiuchi et al., 1986). Este comportamiento es comparable con lo observado en las CMs en el presente estudio, donde también se registró un aumento en la liberación de Ca^{2+} . En contraste, los tratamientos evaluados redujeron la liberación de Ca^{2+} citoplasmático, lo que sugiere que estas intervenciones podrían atenuar el daño celular inducido por la alta glucosa y la NAd.

Conclusiones

Tanto la tamsulosina como la pioglitazona atenúan la activación de las CMs inducida por alta glucosa y NAd al reducir el estrés oxidativo, la proliferación y la hipertrofia celular. Cabe destacar que la pioglitazona mostró una eficacia superior a la tamsulosina, al disminuir de forma significativa la expresión génica y proteica de marcadores inflamatorios y fibrogénicos (TGF- β , α -SMA y Col I). En conjunto, estos resultados sugieren que ambos fármacos pueden actuar como agentes renoprotectores frente a la activación mesangial y al remodelamiento glomerular inducidos por la hiperglucemia y la hiperactividad del SNS.

Por otro lado, al combinar ambos inductores se observó un posible mecanismo regulatorio aún no descrito, lo que sugiere la participación de los receptores β -AR en esta respuesta. No obstante, se requieren estudios adicionales que permitan esclarecer los mecanismos responsables de esta regulación.

Referencias bibliográficas

- Abdullahi, A., Wang, V., Auger, C., Patsouris, D., Amini-Nik, S., & Jeschke, M. G. (2020). Catecholamines Induce Endoplasmic Reticulum Stress Via Both Alpha and Beta Receptors. *Shock (Augusta, Ga.)*, 53(4), 476-484. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001394>
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 585-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Akinaga, J., García-Sáinz, J. A., & S. Pupo, A. (2019). Updates in the function and regulation of α 1-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(14), 2343-2357. <https://doi.org/10.1111/bph.14617>
- Alabdali, H. H., & Ibrahim, M. A. (2023). STUDY THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF TAMSULOSIN BY THE EVALUATION OF INFLAMMATORY CELLS AND LUNG HISTOPATHOLOGY IN AN AIRWAY INFLAMMATION MODEL IN RATS. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University*, 46(1), 633-645. <https://doi.org/10.21608/bfsa.2023.301290>
- Alrasheed, N. M., Alammari, R. B., Alshammari, T. K., Alamin, M. A., Alharbi, A. O., Alonazi, A. S., Bin Dayel, A. F., & Alrasheed, N. M. (2023). α 1A Adrenoreceptor blockade attenuates myocardial infarction by modulating the integrin-linked kinase/TGF- β /Smad signaling pathways. *BMC Cardiovascular Disorders*, 23(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03188-w>

- Amirati, A. L. (2020). Chronic Kidney Disease. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 66(suppl 1), s03-s09. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.s1.3>
- Ausiello, D. A., Kreisberg, J. I., Roy, C., & Karnovsky, M. J. (1980). Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *The Journal of Clinical Investigation*, 65(3), 754-760. <https://doi.org/10.1172/JCI109723>
- Avraham, S., Korin, B., Chung, J.-J., Oxburgh, L., & Shaw, A. S. (2021). The Mesangial cell—The glomerular stromal cell. *Nature Reviews Nephrology*, 17(12), 855-864. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00474-8>
- Ballermann, B. J., Hoover, R. L., Karnovsky, M. J., & Brenner, B. M. (1985). Physiologic regulation of atrial natriuretic peptide receptors in rat renal glomeruli. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(6), 2049-2056. <https://doi.org/10.1172/JCI112207>
- Becker, C. G. (1972). Demonstration of actomyosin in mesangial cells of the renal glomerulus. *The American Journal of Pathology*, 66(1), 97-110.
- Benkirane, K., Viel, E. C., Amiri, F., & Schiffrin, E. L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels in vivo. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 47(1), 102-108. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000196728.05488.c3>
- Boivin, V., Jahns, R., Gambaryan, S., Ness, W., Boege, F., & Lohse, M. J. (2001). Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney International*, 59(2), 515-531. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.059002515.x>

- Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R. G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Francalanci, M., Serio, M., Laffi, G., Pinzani, M., Gentilini, P., & Marra, F. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: Activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9945-9954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010303200>
- Bonventre, J. V. (1996). Calcium and calcium-related signalling pathways in glomerular mesangial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 23(1), 65-70.
- Broeders, N., & Abramowicz, D. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney International*, 61(1), 354-355. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00129.x>
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615-1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- Bülow, R. D., & Boor, P. (2019). Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 67(9), 643-661. <https://doi.org/10.1369/0022155419849388>
- Carrier, G. O., & White, R. E. (1985). Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232(3), 682-687.
- Chadban, S. J., Tesch, G. H., Foti, R., Lan, H. Y., Atkins, R. C., & Nikolic-Paterson, D. J. (1998). Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by

- mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology*, 94(1), 72-78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00487.x>
- Chapple, C., & Andersson, K.-E. (2002). Tamsulosin: An overview. *World Journal of Urology*, 19(6), 397-404. <https://doi.org/10.1007/s00345-002-0246-7>
- Charles, C., & Ferris, A. H. (2020). Chronic Kidney Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 47(4), 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.001>
- Chen, F., Wei, G., Xu, J., Ma, X., & Wang, Q. (2018). Naringin ameliorates the high glucose-induced rat mesangial cell inflammatory reaction by modulating the NLRP3 Inflammasome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 192. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2257-y>
- Cobo, G., Lindholm, B., & Stenvinkel, P. (2018). Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 33(suppl_3), iii35-iii40. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy175>
- Dai, C., Li, M., Liu, Y., Tran, D. H., Jiang, H., Tang, S., & Shen, J. (2023). Involvement of the inhibition of mitochondrial apoptotic, p53, NF-κB pathways and the activation of Nrf2/HO-1 pathway in the protective effects of curcumin against copper sulfate-induced nephrotoxicity in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114480. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114480>
- Ding, T., Chen, W., Li, J., Ding, J., Mei, X., & Hu, H. (2017). High Glucose Induces Mouse Mesangial Cell Overproliferation via Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis in a TLR-4-Dependent Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(3), 1035-1043. <https://doi.org/10.1159/000461483>

- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. *Annual Review of Pathology*, 1, 405-434. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218>
- Doshi, S. M., & Friedman, A. N. (2017). Diagnosis and Management of Type 2 Diabetic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(8), 1366. <https://doi.org/10.2215/CJN.11111016>
- Dubus, I., L'Azou, B., Gordien, M., Delmas, Y., Labouyrie, J.-P., Bonnet, J., & Combe, C. (2003). Cytoskeletal reorganization by mycophenolic acid alters mesangial cell migration and contractility. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(5), 956-961. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000097806.45034.45>
- Efrati, S., Berman, S., Ilgiyev, E., Averbukh, Z., & Weissgarten, J. (2007). PPAR- γ Activation Inhibits Angiotensin II Synthesis, Apoptosis, and Proliferation of Mesangial Cells from Spontaneously Hypertensive Rats. *Nephron Experimental Nephrology*, 106(4), e107-e112. <https://doi.org/10.1159/000104834>
- Esler, M., Jennings, G., & Lambert, G. (1989). Noradrenaline release and the pathophysiology of primary human hypertension. *American Journal of Hypertension*, 2(3 Pt 2), 140S-146S. <https://doi.org/10.1093/ajh/2.3.140s>
- Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(1), 18-25.
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1962). FUNCTIONAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF A THIRD CELL TYPE IN THE RENAL GLOMERULUS. *Journal of Cell Biology*, 13(1), 55-87. <https://doi.org/10.1083/jcb.13.1.55>
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update

- on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627-1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Fu, R.-G., Wu, J.-J., Xue, R.-L., Zhang, T., Wang, L., Wu, X.-L., Duan, Z.-Y., Jia, L.-N., Ma, L.-Q., Du, Y., & Wei, L.-T. (2013). Premature senescence and cellular phenotype transformation of mesangial cells induced by TGF-B1. *Renal Failure*, 35(8), 1142-1145. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2013.817279>
- Gao, J., Wu, L., Wang, S., & Chen, X. (2020). Role of Chemokine (C–X–C Motif) Ligand 10 (CXCL10) in Renal Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2020, 6194864. <https://doi.org/10.1155/2020/6194864>
- Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*, 7(2), 193-203. <https://doi.org/10.1242/dmm.012062>
- Gómez-Guerrero, C., Hernández-Vargas, P., López-Franco, O., Ortiz-Muñoz, G., & Egado, J. (2005). Mesangial Cells and Glomerular Inflammation: From the Pathogenesis to Novel Therapeutic Approaches. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy*, 4(3), 341-351. <https://doi.org/10.2174/1568010054022169>
- Goormaghtigh, N. (1942). La doctrine de la cellule musculaire afibrillaire endocrine en pathologie humaine: Le rein de l'eclampsie puerpérale. *Bull Acad R Med Belg*, 7, 194-217.
- Guijarro, C., Kim, Y., Kasiske, B. L., Massy, Z. A., O'Donnell, M. P., Kashtan, C. E., & Keane, W. F. (1997). Central role of the transcription factor nuclear factor-kappa B in mesangial cell production of chemokines. *Contributions to Nephrology*, 120, 210-218. <https://doi.org/10.1159/000059839>

Hadad, S. J., Ferreira, A. T., Oshiro, M. E., Neri, R., & Schor, N. (1997). Alteration of cytosolic calcium induced by angiotensin II and norepinephrine in mesangial cells from diabetic rats. *Kidney International*, 51(1), 87-93.
<https://doi.org/10.1038/ki.1997.11>

Haneda, M., Koya, D., Isono, M., & Kikkawa, R. (2003). Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(5), 1374-1382.
<https://doi.org/10.1097/01.asn.0000064500.89551.76>

He, J., Zhang, X., Lian, C., Wu, J., Fang, Y., & Ye, X. (2019). KEAP1/NRF2 axis regulates H₂O₂-induced apoptosis of pancreatic β -cells. *Gene*, 691, 8-17.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.100>

Herrera, G. A. (2006). Plasticity of mesangial cells: A basis for understanding pathological alterations. *Ultrastructural Pathology*, 30(6), 471-479.
<https://doi.org/10.1080/01913120600932594>

Hu, S., Kim, H. S., Lappe, R. W., & Webb, R. L. (1993). Coupling of endothelin receptors to ion channels in rat glomerular mesangial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22 Suppl 8, S149-153.
<https://doi.org/10.1097/00005344-199322008-00040>

Ikeda, M., Minota, S., & Kano, S. (1997). Regulation of MHC class I expression by inflammatory cytokines in rat mesangial cells. *Nephron*, 76(1), 90-95.
<https://doi.org/10.1159/000190146>

INEGI. (2022). *Estadísticas de defunciones registradas 2021* (Preliminar No. 378/22). INEGI.

ISSEA. (2022). *Reporte anual «Enfermedad renal crónica en Aguascalientes, México, 2022»*. ISSEA. https://www.issea.gob.mx/docs/ERC_RepAnual2022.pdf

Isshiki, K., Haneda, M., Koya, D., Maeda, S., Sugimoto, T., & Kikkawa, R. (2000). Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes*, *49*(6), 1022-1032. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.1022>

Iyoda, M., Shibata, T., Kawaguchi, M., Hizawa, N., Yamaoka, T., Kokubu, F., & Akizawa, T. (2010). IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: Synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *298*(3), F779-787. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00198.2009>

Jasielec, J. J., Filipek, R., Dołowy, K., & Lewenstam, A. (2020). Precipitation of Inorganic Salts in Mitochondrial Matrix. *Membranes*, *10*(5), 81. <https://doi.org/10.3390/membranes10050081>

Jh, O., H, H., Mr, Y., & Hb, L. (1998). Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. *Kidney International*, *54*(6). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00193.x>

Jie, R., Zhu, P., Zhong, J., Zhang, Y., & Wu, H. (2020). LncRNA KCNQ1OT1 affects cell proliferation, apoptosis and fibrosis through regulating miR-18b-5p/SORBS2 axis and NF-κB pathway in diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *12*, 77. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00585-5>

Kamiar, A., Yousefi, K., Dunkley, J. C., Webster, K. A., & Shehadeh, L. A. (2021). B2-Adrenergic receptor agonism as a therapeutic strategy for kidney disease.

- American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 320(5), R575-R587. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00287.2020>
- Kang, B. P. S., Frencher, S., Reddy, V., Kessler, A., Malhotra, A., & Meggs, L. G. (2003). High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 284(3), F455-466. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00137.2002>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1388-D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Ko, G. J., Kang, Y. S., Han, S. Y., Lee, M. H., Song, H. K., Han, K. H., Kim, H. K., Han, J. Y., & Cha, D. R. (2008). Pioglitazone attenuates diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(9), 2750-2760. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn157>
- Kökény, G., Calvier, L., & Hansmann, G. (2021). PPAR γ and TGF β -Major Regulators of Metabolism, Inflammation, and Fibrosis in the Lungs and Kidneys. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10431. <https://doi.org/10.3390/ijms221910431>
- Kong, F., Ma, L., Zou, L., Meng, K., Ji, T., Zhang, L., Zhang, R., & Jiao, J. (2015). Alpha1-Adrenergic Receptor Activation Stimulates Calcium Entry and Proliferation via TRPC6 Channels in Cultured Human Mesangial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 36(5), 1928-1938. <https://doi.org/10.1159/000430161>

- Kostallari, E., & Shah, V. H. (2019). Pericytes in the liver. *Advances in experimental medicine and biology*, 1122, 153-167. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11093-2_9
- Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: An update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>
- Kurihara, H., & Sakai, T. (2017). Cell biology of mesangial cells: The third cell that maintains the glomerular capillary. *Anatomical Science International*, 92(2), 173-186. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0334-1>
- Lazzeri, E., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2002). Cytokines and chemokines in nephropathies and renal transplant. *Giornale Italiano Di Nefrologia: Organo Ufficiale Della Societa Italiana Di Nefrologia*, 19(6), 641-649.
- Leibovitz, E., & Schiffrin, E. L. (2007). PPAR activation: A new target for the treatment of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50(2), 120-125. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318062153b>
- MacKay, K., Striker, L. J., Stauffer, J. W., Doi, T., Agodoa, L. Y., & Striker, G. E. (1989). Transforming growth factor-beta. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(4), 1160-1167. <https://doi.org/10.1172/JCI113996>
- Maeda, A., Horikoshi, S., Gohda, T., Tsuge, T., Maeda, K., & Tomino, Y. (2005). Pioglitazone attenuates TGF- β -induction of fibronectin synthesis and its splicing variant in human mesangial cells via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ . *Cell Biology International*, 29(6), 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.01.005>

- Majumder, S., Amin, M., Pushpakumar, S., & Sen, U. (2020). Collagen receptor- and metalloproteinase-dependent hypertensive stress response in mesangial and glomerular endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 466(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03680-y>
- Mani, I., Garg, R., & Pandey, K. N. (2016). Role of FQQI motif in the internalization, trafficking, and signaling of guanylyl-cyclase/natriuretic peptide receptor-A in cultured murine mesangial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 310(1), F68-84. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00205.2015>
- Mao, Z., & Ong, A. C. M. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in kidney disease—Future promise, present fears. *Nephron. Clinical Practice*, 112(4), c230-241. <https://doi.org/10.1159/000224789>
- Martínez Ginarte., G., Guerra Domínguez., E., Pérez Marín., D., Martínez Ginarte., G., Guerra Domínguez., E., & Pérez Marín., D. (2020). Enfermedad renal crónica, algunas consideraciones actuales. *Multimed*, 24(2), 464-469.
- Maruri, D. P., Iyer, K. S., Schmidtke, D. W., Petroll, W. M., & Varner, V. D. (2022). Signaling Downstream of Focal Adhesions Regulates Stiffness-Dependent Differences in the TGF- β 1-Mediated Myofibroblast Differentiation of Corneal Keratocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.886759>
- Medina Pizaño, M. Y., Loera Arias, M. de J., Montes de Oca Luna, R., Saucedo Cárdenas, O., Ventura Juárez, J., & Muñoz Ortega, M. H. (2023). Neuroimmunomodulation of adrenoblockers during liver cirrhosis: Modulation of hepatic stellate cell activity. *Annals of Medicine*, 55(1), 543-557. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2164047>

Medina-Pizaño, M. Y., Llanos-Angulo, L. A. G., Ventura-Juárez, J., Quintanar-Stephano, A., Saucedo-Cárdenas, O., de Oca-Luna, R. M., de Jesús Loera-Arias, M., & Muñoz-Ortega, M. H. (2025). Tamsulosin regulates antifibrotic effects in thioacetamide-induced liver damage and ameliorates portal hypertension. *Life Sciences*, 379, 123859. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123859>

Menè, P., & Stoppacciaro, A. (2009). Isolation and Propagation of Glomerular Mesangial Cells. En G. J. Becker & T. D. Hewitson (Eds.), *Kidney Research* (Vol. 466, pp. 1-15). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-352-3_1

Moore, K. L., Agur, A. M. R., & Dalley, A. F. (2018). *Clinically oriented anatomy* (Eighth edition). Wolters Kluwer.

Morones, J., Pérez, M., Muñoz, M., Sánchez, E., Ávila, M., Topete, J., Ventura, J., & Martínez, S. (2024). Evaluation of the Effect of an α -Adrenergic Blocker, a PPAR- γ Receptor Agonist, and a Glycemic Regulator on Chronic Kidney Disease in Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms252111372>

Nakai, K., Ito, C., Yumura, W., Horita, S., Nihei, H., Sugino, N., & Nagai, R. (1995). Difference of myosin heavy chain expression between mesangial cells and vascular smooth muscles. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 37(8), 428-435.

Nakamura, A., Imaizumi, A., Yanagawa, Y., Niimi, R., & Kohsaka, T. (2003). Suppression of tumor necrosis factor-alpha by beta2-adrenoceptor activation: Role of mitogen-activated protein kinases in renal mesangial cells. *Inflammation*

Research: *Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 52(1), 26-31. <https://doi.org/10.1007/s000110300010>

Nastase, M. V., Zeng-Brouwers, J., Wygrecka, M., & Schaefer, L. (2018). Targeting renal fibrosis: Mechanisms and drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129, 295-307. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.019>

National Institutes of Health. (2023). *USRDS Annual Data Report: Epidemiology of kidney disease in the United States*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://usrds-adr.niddk.nih.gov/>

Nie, P., Bai, X., Lou, Y., Zhu, Y., Jiang, S., Zhang, L., Tian, N., Luo, P., & Li, B. (2021). Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce oxidative damage and apoptosis in diabetic nephropathy by activating Nrf2. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 450. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02447-x>

Nobiling, R., & Bührle, C. P. (1987). The mesangial cell culture: A tool for the study of the electrophysiological and pharmacological properties of the glomerular mesangial cell. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 36(1), 47-56. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1987.tb00180.x>

Okuda, T., Yamashita, N., & Kurokawa, K. (1986). Angiotensin II and vasopressin stimulate calcium-activated chloride conductance in rat mesangial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 78(6), 1443-1448. <https://doi.org/10.1172/JCI112734>

Papay, R. S., & Perez, D. M. (2021). A1-Adrenergic receptors increase glucose oxidation under normal and ischemic conditions in adult mouse cardiomyocytes. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 41(2), 138-144. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1799291>

Paquissi, F. C., & Abensur, H. (2021). The Th17/IL-17 Axis and Kidney Diseases, With Focus on Lupus Nephritis. *Frontiers in Medicine*, 8, 654912. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.654912>

Pawluczyk, I. Z. A., Patel, S. R., & Harris, K. P. G. (2006). The role of the alpha-1 adrenoceptor in modulating human mesangial cell matrix production. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(9), 2417-2424. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl230>

Pfeilschifter, J. (2002). Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(3), 347-348. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.3.347>

Pistrosch, F., Passauer, J., Herbrig, K., Schwanebeck, U., Gross, P., & Bornstein, S. R. (2012). Effect of thiazolidinedione treatment on proteinuria and renal hemodynamic in type 2 diabetic patients with overt nephropathy. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 44(12), 914-918. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1314836>

Pourmand, A., Nadendla, R., Mazer-Amirshahi, M., & O'Connell, F. (2016). Tamsulosin for urolithiasis: A review of the recent literature and current controversies. *The American Journal of Emergency Medicine*, 34(11), 2217-2221. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.09.009>

Qiao, S., Liu, R., Lv, C., Miao, Y., Yue, M., Tao, Y., Wei, Z., Xia, Y., & Dai, Y. (2019). Bergenin impedes the generation of extracellular matrix in glomerular mesangial

cells and ameliorates diabetic nephropathy in mice by inhibiting oxidative stress via the mTOR/ β -TrcP/Nrf2 pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 145, 118-135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.003>

Rangan, G., Wang, Y., & Harris, D. (2009). NF-kappaB signalling in chronic kidney disease. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(9), 3496-3522. <https://doi.org/10.2741/3467>

Ren, H., Zuo, S., Hou, Y., Shang, W., Liu, N., & Yin, Z. (2020). Inhibition of α 1-adrenoceptor reduces TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and attenuates UO-induced renal fibrosis in mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(11), 14892-14904. <https://doi.org/10.1096/fj.202000737RRR>

Rodriguez-Diez, R. R., Tejera-Muñoz, A., Orejudo, M., Marquez-Exposito, L., Santos-Sanchez, L., Rayego-Mateos, S., Cantero-Navarro, E., Tejedor-Santamaria, L., Marchant, V., Ortiz, A., Egido, J., Mezzano, S., Selgas, R., Navarro-González, J. F., Valdivielso, J. M., Lavoz, C., & Ruiz-Ortega, M. (2021). Interleukin-17A: Potential mediator and therapeutic target in hypertension. *Nefrologia*, 41(3), 244-257. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2021.06.003>

Rodríguez Pérez, J. C., Rodríguez Esparragón, F., & Nóvoa, J. (2007). PPAR-gamma, arterial hypertension and the kidney. *Nefrologia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola Nefrologia*, 27(1), 6-11.

Rodriguez-Barbero, A., L'Azou, B., Cambar, J., & López-Novoa, J. M. (2000). Potential use of isolated glomeruli and cultured mesangial cells as in vitro models to assess nephrotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 16(3), 145-153. <https://doi.org/10.1023/a:1007683320660>

- Romagnani, P., Remuzzi, G., Glassock, R., Levin, A., Jager, K. J., Tonelli, M., Massy, Z., Wanner, C., & Anders, H.-J. (2017). Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>
- Romano-Lozano, V., Cruz-Avelar, A., & Peralta Pedrero, M. L. (2022). Factor nuclear eritroide similar al factor 2 en el vitíligo. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 113(7), 705-711. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2022.02.025>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2020). *Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology* (Eighth edition). Wolters Kluwer.
- Ruiz-Ortega, M., Rayego-Mateos, S., Lamas, S., Ortiz, A., & Rodrigues-Diez, R. R. (2020). Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 16(5), 269-288. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0248-y>
- Safi, S. Z., Qvist, R., Yan, G. O. S., & Ismail, I. S. B. (2014). Differential expression and role of hyperglycemia induced oxidative stress in epigenetic regulation of $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ -adrenergic receptors in retinal endothelial cells. *BMC Medical Genomics*, 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-29>
- Sakai, T., & Kriz, W. (1987). The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. *Anatomy and Embryology*, 176(3), 373-386. <https://doi.org/10.1007/BF00310191>
- Salanova Villanueva, L., Santos Sánchez-Rey, B., & Sanz Sainz, M. (2018). Mecanismos inflamatorios y fibróticos en la enfermedad renal. Protagonistas y terapéutica. *Revista del Laboratorio Clínico*, 11(4), 227-237. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.11.004>
- Saleh, H., Schlatter, E., Lang, D., Pauels, H.-G., & Heidenreich, S. (2000). Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca^{2+} signals.

Kidney International, 58(5), 1876-1884. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00359.x>

Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Research International*, 2021, 1497449. <https://doi.org/10.1155/2021/1497449>

Sancho-Bru, P., Bataller, R., Colmenero, J., Gasull, X., Moreno, M., Arroyo, V., Brenner, D. A., & Ginès, P. (2006). Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(5), G877-G884. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00537.2005>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. En *Nature Methods* (Vol. 9, Número 7, pp. 676-682). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schlöndorff, D., & Banas, B. (2009). The mesangial cell revisited: No cell is an island. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(6), 1179-1187. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050549>

Schnaper, H. W., Hayashida, T., Hubchak, S. C., & Poncelet, A.-C. (2003). TGF- β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(2), F243-F252. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00300.2002>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sedor, J. R., Nakazato, Y., & Konieczkowski, M. (1992). Interleukin-1 and the mesangial cell. *Kidney International*, 41(3), 595-599. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.89>

Shogakiuchi, Y., Kanaide, H., Kobayashi, S., Nishimura, J., & Nakamura, M. (1986). Intracellular free calcium transients induced by norepinephrine in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(1), 9-15. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90935-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90935-6)

Shultz, P. J., Archer, S. L., & Rosenberg, M. E. (1994). Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney International*, 46(3), 683-689. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.321>

Sigala, B., McKee, C., Soeda, J., Paziienza, V., Morgan, M., Lin, C.-I., Selden, C., Vander Borgh, S., Mazzoccoli, G., Roskams, T., Vinciguerra, M., & Oben, J. A. (2013). Sympathetic nervous system catecholamines and neuropeptide Y neurotransmitters are upregulated in human NAFLD and modulate the fibrogenic function of hepatic stellate cells. *PloS One*, 8(9), e72928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072928>

Simpson, P. (1983). Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(2), 732-738. <https://doi.org/10.1172/JCI111023>

Skorecki, K., Chertow, G. M., Marsden, P. A., Taal, M. W., & Yu, A. S. L. (Eds.). (2016). *Brenner & Rector's the kidney* (10th edition). Elsevier.

Song, M.-K., Lee, J.-H., Ryoo, I.-G., Lee, S.-H., Ku, S.-K., & Kwak, M.-K. (2019). Bardoxolone ameliorates TGF- β 1-associated renal fibrosis through Nrf2/Smad7

elevation. *Free Radical Biology & Medicine*, 138, 33-42.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.033>

Stephenson, L. A., Haney, L. B., Hussaini, I. M., Karns, L. R., & Glass, W. F. (1998a). Regulation of smooth muscle alpha-actin expression and hypertrophy in cultured mesangial cells. *Kidney International*, 54(4), 1175-1187.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00101.x>

Stephenson, L. A., Haney, L. B., Hussaini, I. M., Karns, L. R., & Glass, W. F. (1998b). Regulation of smooth muscle alpha-actin expression and hypertrophy in cultured mesangial cells. *Kidney International*, 54(4), 1175-1187.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00101.x>

Sterzel, R. B., Schulze-Lohoff, E., & Marx, M. (1993). Cytokines and mesangial cells. *Kidney International. Supplement*, 39, S26-31.

Stockand, J. D., & Sansom, S. C. (1998). Glomerular Mesangial Cells: Electrophysiology and Regulation of Contraction. *Physiological Reviews*, 78(3), 723-744. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.723>

Sun, L., Sun, C., Zhou, S., Zhang, L., & Hu, W. (2021). Tamsulosin attenuates high glucose- induced injury in glomerular endothelial cells. *Bioengineered*, 12(1), 5184-5194. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1955527>

Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Suzuki, T., Yatsu, T., & Shibasaki, M. (2008). Vasopressin stimulates the production of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(5-6), 586-593. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04852.x>

Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Yatsu, T., & Shibasaki, M. (2008). Vasopressin increases type IV collagen production through the induction of transforming

growth factor-beta secretion in rat mesangial cells. *Pharmacological Research*, 57(2), 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.01.003>

Taherkhani, A., Farrokhi Yekta, R., Mohseni, M., Saidijam, M., & Arefi Oskouie, A. (2019). Chronic kidney disease: A review of proteomic and metabolomic approaches to membranous glomerulonephritis, focal segmental glomerulosclerosis, and IgA nephropathy biomarkers. *Proteome Science*, 17, 7. <https://doi.org/10.1186/s12953-019-0155-y>

Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: A key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7-11. <https://doi.org/10.1172/JCI11830>

Tang, W.-C., Chang, Y.-W., Che, M., Wang, M.-H., Lai, K. K., Fueger, P. T., Huang, W., Lin, S.-B., & Lai, K. K. Y. (2022). Thioacetamide-Induced Norepinephrine Production by Hepatocytes is Associated with Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Current Molecular Pharmacology*, 15(2), 454-461.

Thomas, H. Y., & Ford Versypt, A. N. (2022). Pathophysiology of mesangial expansion in diabetic nephropathy: Mesangial structure, glomerular biomechanics, and biochemical signaling and regulation. *Journal of Biological Engineering*, 16(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00299-4>

Tomooka, S., Border, W. A., Marshall, B. C., & Noble, N. A. (1992). Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney International*, 42(6), 1462-1469. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.442>

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología* (15.^a ed.). Panamericana.

- Trachtman, H. (2020). Emerging drugs for treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 25(3), 367-375. <https://doi.org/10.1080/14728214.2020.1803276>
- Tsai, T. J., Lin, R. H., Chang, C. C., Chen, Y. M., Chen, C. F., Ko, F. N., & Teng, C. M. (1995). Vasodilator agents modulate rat glomerular mesangial cell growth and collagen synthesis. *Nephron*, 70(1), 91-99. <https://doi.org/10.1159/000188550>
- Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O. M., & Panzer, U. (2010). The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney International*, 77(12), 1070-1075. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.102>
- Ueta, M., Wakisaka, M., Ago, T., Kitazono, T., Nakamura, U., Yoshinari, M., Iwase, M., & Iida, M. (2004). PPAR γ ligands attenuate mesangial contractile dysfunction in high glucose. *Kidney International*, 65(3), 961-971. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00474.x>
- Veis, J. H. (1993). An overview of mesangial cell biology. *Contributions to Nephrology*, 104, 115-126. <https://doi.org/10.1159/000422404>
- Wang, S., Ye, S., Sun, W., & Hu, Y. (2014). Pioglitazone Inhibits the Expressions of p22^{phox} and p47^{phox} in Rat Mesangial Cells *In Vitro*. *ISRN Endocrinology*, 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/601352>
- Wang, W., Ma, B., Xu, C., & Zhou, X. (2020). Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*, 69, 153185. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153185>
- Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, 389(10075), 1238-1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)

Weissgarten, J., Berman, S., Efrati, S., Rapoport, M., Averbukh, Z., & Feldman, L. (2006). Apoptosis and proliferation of cultured mesangial cells isolated from kidneys of rosiglitazone-treated pregnant diabetic rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(5), 1198-1204. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfk084>

Wilson, H. M., & Stewart, K. N. (2012). Glomerular epithelial and mesangial cell culture and characterization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 806, 187-201. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_13

Wineski, L. E., & Snell, R. S. (2019). *Snell's clinical anatomy by regions* (Tenth edition). Wolters Kluwer.

Wörnle, M., Schmid, H., Merkle, M., & Banas, B. (2004). Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. *BMC Nephrology*, 5, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-5-8>

X, W., E, S., Y, W., Z, J., D, G., D, C., T, C., & N, W. (2015). MiR-196a Regulates High Glucose-Induced Mesangial Cell Hypertrophy by Targeting p27kip1. *Journal of Laboratory Automation*, 20(4). <https://doi.org/10.1177/2211068215569055>

X, Z., C, L., J, D., J, K.-D., S, M., & C, W. (1997). Mesangial cell actin disassembly in high glucose mediated by protein kinase C and the polyol pathway. *Kidney International*, 51(6). <https://doi.org/10.1038/ki.1997.247>

Xin, X., Li, X.-H., Wu, J.-Z., Chen, K.-H., Liu, Y., Nie, C.-J., Hu, Y., & Jin, M.-W. (2013). Pentamethylquercetin ameliorates fibrosis in diabetic Goto-Kakizaki rat kidneys and mesangial cells with suppression of TGF- β /Smads signaling. *European*

Journal of Pharmacology, 713(1-3), 6-15.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.045>

Yao, H., Zhang, W., Yang, F., Ai, F., Du, D., & Li, Y. (2022). Discovery of caffeoylisocitric acid as a Keap1-dependent Nrf2 activator and its effects in mesangial cells under high glucose. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 178-188. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1998025>

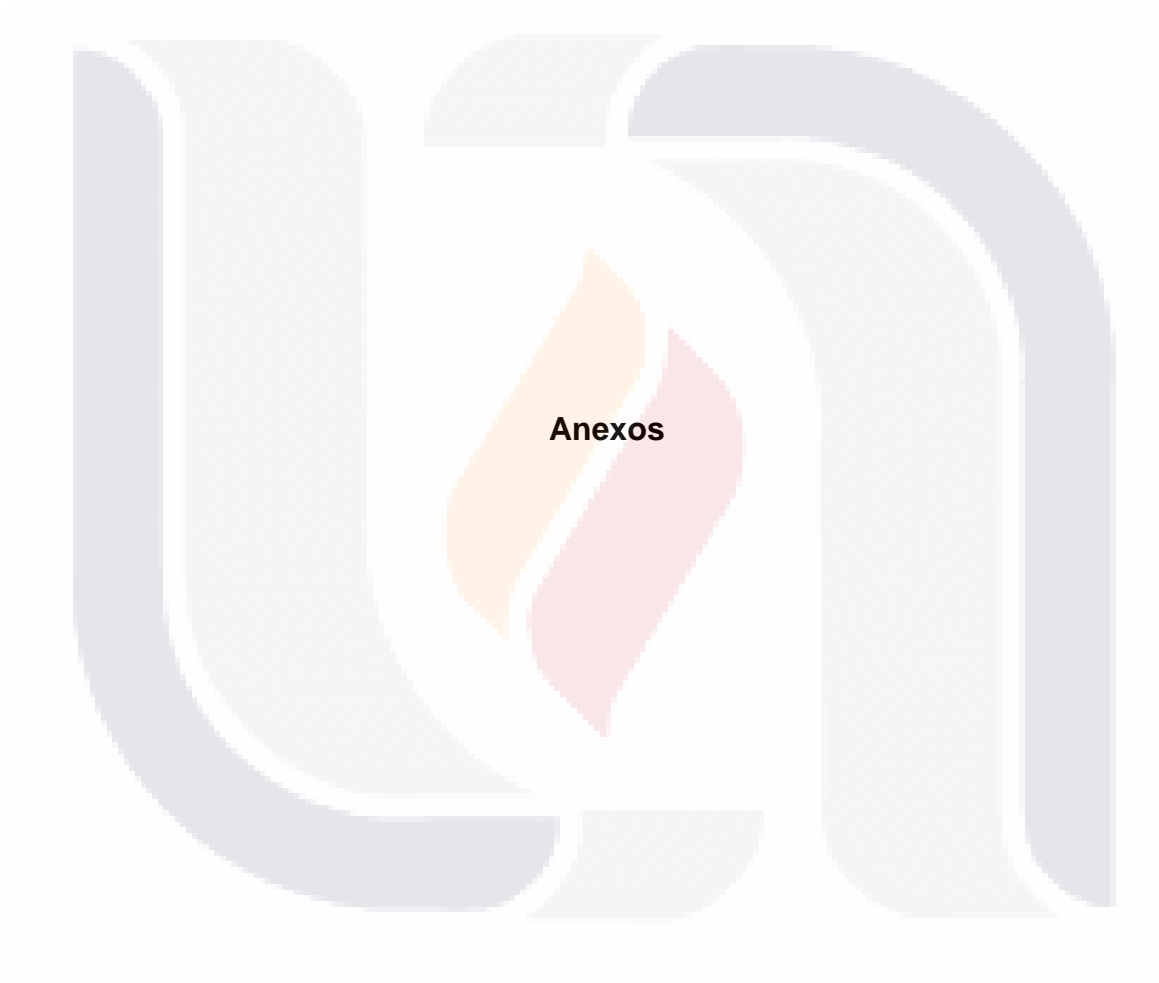
Zhang, Y., Yan, X., Zhao, T., Xu, Q., Peng, Q., Hu, R., Quan, S., Zhou, Y., & Xing, G. (2017). Targeting C3a/C5a receptors inhibits human mesangial cell proliferation and alleviates immunoglobulin A nephropathy in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 189(1), 60-70. <https://doi.org/10.1111/cei.12961>

Zhao, D., Guo, J., Liu, L., & Huang, Y. (2021). Rosiglitazone attenuates high glucose-induced proliferation, inflammation, oxidative stress and extracellular matrix accumulation in mouse mesangial cells through the Gm26917/miR-185-5p pathway. *Endocrine Journal*, 68(7), 751-762. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ20-0783>

Zhao, J.-H. (2019). Mesangial Cells and Renal Fibrosis. En B.-C. Liu, H.-Y. Lan, & L.-L. Lv (Eds.), *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies* (Vol. 1165, pp. 165-194). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_9

Zhao, Y., Li, Q., Ouyang, Q., Wu, L., & Chen, X. (2021). Activated mesangial cells acquire the function of antigen presentation. *Cellular Immunology*, 361, 104279. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104279>

Zimmerman, K. (1933). Über den Bau des Glomerulus der Slugerniere. *Ztschr. f. mik-anat.*, 32, 176-177.



Anexo A

Reactivo	Molaridad	gramos
Cloruro de Calcio dihidratado	0.0018	0.26
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.00081	0.2
Cloruro de Potasio	0.005	0.4
Bicarbonato de sodio	0.026	2.2
Cloruro de Sodio	0.117	6.8
Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado	0.001	0.14
D-glucosa	0.006	1
Rojo fenol	0.00003	0.01

Tabla 2. Preparación del buffer Earle's Balanced Salt Solution (EBSS).

Nota: Aforar a 1L, el pH debe ajustarse a 7.0.

Anexo B

Antibiótico-Antimicótico (penicilina / estreptomina)	2X (20µL/1mL)
Suero Fetal Bovino	20% al inicio del cultivo primario, 10% en los siguientes pases
Aforar con RPMI 1640	50mL

Tabla 3. Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado.

Nota: Aforar a 50mL.

Anexo C

Cloruro de sodio (NaCl)	80.0 g
Fosfato de Potasio Monobásico (KH₂PO₄)	2 g
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado (Na₂HPO₄)	29 g
Cloruro de potasio (KCl)	2 g
Agua destilada	

Tabla 4. PBS.

Nota: Aforar a 1 L, el pH debe ajustarse a 7.0.

Anexo D

Gel 12% separador (1 gel)		Gel 4% concentrador (2 geles)	
Agua destilada	1.87 mL	Agua destilada	3 mL
Acrilamida	2.2 mL	Acrilamida	650 µL
Tris 1.5 M pH 8.8	1.43 mL	Tris 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
SDS 10%	55 µL	SDS 10%	50 µL
PSA 10%	55 µL	PSA 10%	40 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL

Tabla 5. Preparación geles para Western blot.

Anexo E

10X		1X	
Buffer de corrida			
Tris base 250 mM	30 g	Buffer de corrida 10X	100 mL
Glicina 1.92 M	144.13 g	Agua destilada	900 mL
SDS 1%	10 g		1.25 mL
Buffer de transferencia			
Tris base 250 Mm	30 g	Buffer de transferencia 10X	100 mL
Glicina 1.92 M	144.13 g	Metanol	200 mL
		Agua destilada	700 mL
TBS, ajustar pH 7.6			
Tris base 200 Mm	24.3 g	TBS 10 X	100 mL
Cloruro de sodio (NaCl)	80 g	Agua destilada	900 mL
TBS-T			
		TBS 10X	100 mL
		Tween-20	500 µL
		Aforar con agua destilada	

Tabla 6. Buffers utilizados para la técnica de Western blot.

Anexo F

Glicina	7.5 g
Acetato de magnesio tetrahidratado (Mg(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O)	4.3 g
Cloruro de Potasio (KCl)	3.7 g
Agua destilada	800 mL

Tabla 7. Buffer glicina ácida.

Nota: Aforar a 1L, ajustar el pH debe ajustarse a 2.2.