

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Predicción y análisis experimental preliminar de la red de interacción
circRNAs-miRNAs y mRNAs de genes que codifican proteínas
desreguladas en la nefropatía diabética

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Magdalena Leticia Pérez Velázquez

DIRECTORA: Dra. Lilia López Canovas

CODIRECTORA: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga



Ciudad de México, Marzo, 2026

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

Presidente: Dra. Ángeles Tecalco Cruz, UACM

Secretario: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM

Vocal: Dra. Lilia López Canovas, UACM

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

Directora

Dra. Lilia López Canovas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirectora

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Ángeles Tecalco Cruz

Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Minerva Camacho Nuez

Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 3 del Posgrado en Ciencias Genómicas en el plantel del Valle de la UACM, bajo la dirección de la Dra. Lilia López Canovas, en codirección con la Dra. Elisa Irene Azuara Licega. Este proyecto contó con el apoyo del proyecto CF-2023-I-794 de la SECIHTI.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante este proceso. Su apoyo académico y emocional fueron claves para terminar este proyecto.

Quiero agradecer a la Dra. Lilia López-Cánovas y a la Dra. Elisa Azuara por su invaluable guía académica, paciencia, dirección, confianza, apoyo y sus enseñanzas.

De igual forma, extendiendo mis agradecimientos a mis asesores, la Dra. Patricia Cuellar Silva, la Dra. Ángeles Tecalco Cruz y al Dr. Jesús Valdéz, cuyas observaciones enriquecieron el trabajo realizado.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por brindarme las herramientas y espacios para mi formación académica y al Colegio Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico brindado con no. de becario 605663 durante el periodo comprendido entre 01/feb/2022 y el 31/ene/2024.

DEDICATORIA

A mi hijo Alexander, mi mayor motivación. A ti toda mi vida.

A mi amado Rodrigo, por su enorme apoyo en cada etapa. Gracias por enseñarme de paciencia, perseverancia, cariño y lealtad. Te amo desde siempre y para siempre

A mi Katarynita, mi alma gemela. Que orgullo saberme tu hermana. Gracias por existir y permitirme ser parte de tu camino

A mi padre, Óscar, a mi tía, Hilda y a la memoria de mi madre, Maura.

A los roomies, por darme tanta vida por tanto tiempo.

A Dante, Edson, Ismael, Valeria y Cristina. Gracias por ser parte de mi familia

A mis compañeros de laboratorio, Carlitos, Bere e Isaac, y en especial a la Dra. Lilia. Su colaboración, consejos y grata compañía hicieron de la experiencia en el laboratorio una experiencia muy amena que siempre atesoraré.

Y por supuesto, a Hertz, Heii, Nymeria, Diandian y Lidia, que también son parte de mi familia y me han acompañado de formas incomprensibles para un ser humano.

INDICE

INDICE	1
INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Diabetes mellitus	10
1.2 Epidemiología de la Diabetes mellitus	11
1.3 Diabetes mellitus tipo 2	12
1.4 Complicaciones de la DM2	13
1.4.1 Complicaciones macrovasculares	13
1.4.2 Complicaciones microvasculares	15
1.5 Nefropatía diabética	17
1.5.1 Fisiopatología de la nefropatía diabética	18
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	20
2.1 Vía AGE/RAGE	20
2.1.1 Productos finales de glicación avanzada.	21
2.1.2 Generación de AGEs	21
2.1.3 Receptores de productos finales de glicación avanzada	27
2.1.4 Eje AGE/RAGE en nefropatía	29
2.2 Proteínas desreguladas	30
2.3 Micro RNAs (miRNAs)	33
2.3.1 Biogénesis de los microRNAs	35
2.4 CircRNAs	38
2.4.1 Biogénesis de los circRNAs	39

2.4.2 Funciones de los circRNAs	43
2.5 La intersección: CircRNA, miRNA y proteínas desreguladas	44
3. JUSTIFICACIÓN	47
4. HIPÓTESIS	47
5. OBJETIVOS	47
5.1 OBJETIVO GENERAL	47
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	48
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	49
7. MATERIALES Y MÉTODOS	50
8. RESULTADOS	61
8.1 Identificación de proteínas desreguladas en ND	61
8.2 Construcción de la red de interacción circRNA-miRNA-mRNA de genes que codifican a JAK2 y STAT3	68
8.3 Selección del miRNA candidato	80
8.4 Selección de circRNAs candidatos	81
8.5 Análisis de la expresión de JAK2, STAT3, RAGE, y proteínas de la matriz extracelular	83
8.6 Análisis de la expresión del miRNA-375 en células de la línea celular AD293 sometidas a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina (CML)	86
8.7 La expresión de los circRNAs candidatos	88
8.8 Análisis de la abundancia de las proteínas JAK2 y RAGE en las diferentes condiciones experimentales ensayadas	90
9. DISCUSIÓN	93
10. CONCLUSIÓN	100
11. PERSPECTIVAS	102
11. REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de ejes de regulación circRNAs-miRNAs-mRNA que modulan proteínas desreguladas en ND	51
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para qRT-PCR	64
Tabla 3. Proteínas desreguladas en la ND identificadas en este trabajo que participan simultáneamente en los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia observados en esta patología y su función	71
Tabla 4. Interacciones potenciales entre circRNAs-miRNAs y el mRNA de <i>JAK2</i> o <i>STAT3</i> identificadas en este trabajo	76
Tabla 5. RNA circulares que interactúan potencialmente con el miRNA-375 y que sus genes parentales o ellos se expresan en tejido renal	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos y causas de la Diabetes.	20
Figura 2. Complicaciones de la Diabetes mellitus.	21
Figura 3. Complicaciones microvasculares en la DM.	23
Figura 4. Representación gráfica de la fisiopatología de la nefropatía diabética.	25
Figura 5. Esquema de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs).	30
Figura 6. Esquema de la vía de señalización AGE-RAGE.	32
Figura 7. Estructura del gen <i>AGER</i> y organización de dominios de la proteína RAGE.	35
Figura 8. Biogénesis de los miRNAs.	42
Figura 9. Proceso de <i>splicing</i> canónico y <i>backsplicing</i> .	48
Figura 10. Diagrama del proceso de selección de proteínas desreguladas en nefropatía diabética.	69
Figura 11. Enriquecimiento funcional de los genes que codifican las 59 proteínas identificadas como desreguladas en nefropatía diabética.	70
Figura 12. Funciones moleculares, vías y procesos biológicos enriquecidos en el grupo de proteínas identificadas.	70
Figura 13. Agrupación de proteínas desreguladas en la nefropatía diabética, identificadas en la revisión sistemática, por los procesos patológicos que ocurren en esta enfermedad.	71
Figura 14. Expresión de las proteínas seleccionadas en este trabajo, que participan en los tres procesos claves de la nefropatía diabética en tejido renal sano y con la patología.	73
Figura 15. Identificación y validación de miRNAs reguladores de <i>JAK2</i> y <i>STAT3</i> .	75
Figura 16. Red de interacción circRNA-miRNA-mRNA de los genes que codifican a <i>JAK2</i> y <i>STAT3</i> .	84

Figura 17. Red de interacción miRNA-mRNA de los genes que codifican proteínas, identificadas en este trabajo, que participan simultáneamente en los procesos de fibrosis, inflamación e hipertrofia que ocurren en la ND.	85
Figura 18. Expresión del miRNA-375 en riñón humano.	86
Figura 19. Expresión renal de los circRNAs que interactúan con el miRNA-375	88
Figura 20. Análisis de la expresión relativa respecto a la condición control (glucosa 5.5 mM) de <i>AGER</i> , <i>Fibronectina 1</i> , <i>JAK2</i> , <i>STAT3</i> y <i>Colágeno IV</i> en células AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 2, 24 ó 48 horas.	90
Figura 21. Análisis de la expresión relativa del miRNA-375 en células de la línea celular AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 48 horas.	93
Figura 22. Análisis de la expresión relativa de diferentes RNAs circulares en células de la línea celular AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 48 horas.	96
Figura 23. Efecto de las altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina sobre los niveles de JAK2 y RAGE en la línea celular AD293.	98

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
AD293	Línea celular derivada de la HEK293
AGE	Producto de glicación avanzada
AGER	Gen que codifica a RAGE
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados Celsius
CML	Nε -(carboximetil) lisina
circRNA	RNA circular
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés Deoxyribonucleic acid
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
GLP-1	Péptido Similar al Glucagón-1, del inglés Glucacon-Like Peptide 1
HDL	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés High Density Lipoprotein
HEK293	Línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés horseradish peroxidase
IL-6	interleucina-6
IL-18	interleucina-18
JAK/STAT	Vía de señalización Janus Cinasa/Transductor de Señales y Activador de la Transcripción
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteínas de baja densidad, del inglés Low Density Lipoprotein
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensajero
miRNAs	Micro RNAs
mM	Milimolar

M	Molar
μl	Microlitros
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
ncRNAs	RNAs no codificantes
Nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTMs	Modificaciones postraduccionales, del inglés post-translational modification
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos, del inglés phosphate buffered saline
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction
PKC	proteína quinasa C
qPCR	PCR cuantitativa, del inglés Real-time polymerase chain reaction
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés Ribonucleic acid
RAGE	Receptor de Productos Finales de Glicación Avanzada
RPM	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Geles desnaturalizantes de poliacrilamida, del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
tRNA	RNA de transferencia
WB	Inmunodetección del inglés, Western Blot
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular del inglés Vascular Endothelial Growth Factor

RESUMEN

Las complicaciones de la Diabetes mellitus reducen la calidad y esperanza de vida de los individuos. Una de las más frecuentes es la nefropatía diabética (ND), la cual es la principal causa de muerte de los pacientes diabéticos. En este trabajo se propuso identificar, mediante una búsqueda sistemática en la literatura y bases de datos genómicos y proteómicos, las proteínas desreguladas a nivel renal en la ND. Se hipotetizó que esta desregulación podría estar mediada por la interacción circRNA-miRNA-mRNA de los genes que codifican estas proteínas, por lo que se identificaron los RNA no codificantes que interactúan potencialmente con esas moléculas. Se identificaron 59 proteínas desreguladas, participando la mayor parte de ellas en la vía AGE-RAGE. Once de esas proteínas (STAT3, PFN2, TJP1, TGFB1, SERPINE1, MMP9, MMP1, JUN, JAK1, JAK2 y RAGE) están involucradas simultáneamente en los procesos de inflamación, hipertrofia y fibrosis renal presentes en la ND. Se construyó una red potencial de interacción circRNA-miRNA-mRNA de los genes que codifican las 59 proteínas utilizando la información encontrada en los servidores CircInteractome, CircBase, CircAtlas, miRDB, mirTarbase y TargetScan. Se determinó mediante RT-PCR cuantitativa que en las células AD293 expuestas a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y AGEs de lisina (50 ug/ml) la expresión de *AGER*, *Colágeno IV* y *Fibronectina 1* se incrementó a las 48h de exposición sugiriendo la activación de la vía AGE-RAGE y sus efectos sobre las proteínas de la matriz extracelular. La cantidad de los transcritos de *JAK2* y *STAT3* también se incrementó en las condiciones experimentales ensayadas, mientras que la del miRNA-375, el cual interactúa con *JAK2*, se reprimió. Se predijo la interacción de los circRNAs 0025868 y 0039350 con el miRNA-375 y se verificó su sobreexpresión en nuestro modelo celular. El incremento de la expresión de estos circRNAs sugirió que ellos podrían estar secuestrando al miRNA-375, bloqueando así su capacidad para modular la expresión de *JAK2*. Los resultados de este trabajo contribuirán a la comprensión del rol de la interacción circRNA-miRNA en la regulación de las proteínas involucradas en la ND y podrían ampliar la oportunidad de desarrollar mejores enfoques terapéuticos y estrategias diagnósticas de esta patología.

ABSTRACT

The complications of Diabetes mellitus reduce both quality and life expectancy. One of the most frequent complications is diabetic nephropathy (DN), which represents a major cause of morbidity and mortality among diabetic patients. This study aimed to identify proteins dysregulated at the renal level in DN through a systematic search of the literature and the analysis of genomic and proteomic databases. We hypothesized that this dysregulation could be mediated by the circRNA-miRNA-mRNA interaction of the genes that encode these proteins; therefore, non-coding RNAs that potentially interact with these molecules were identified. Fifty-nine dysregulated proteins were identified, most of which participate in the AGE-RAGE pathway. Eleven of these proteins (STAT3, PFN2, TJP1, TGFB1, SERPINE1, MMP9, MMP1, JUN, JAK1, JAK2, and RAGE) are simultaneously involved in the processes of inflammation, hypertrophy, and renal fibrosis key processes in DN. A potential circRNA-miRNA-mRNA interaction network of the genes encoding the 59 proteins was constructed using information found on the CircInteractome, CircBase, CircAtlas, miRDB, mirTarbase, and TargetScan servers. Quantitative RT-PCR revealed that in AD293 cells exposed to high concentrations of glucose (30 mM) and lysine AGEs (50 µg/ml), the expression of *AGER*, *Collagen IV*, and *Fibronectin 1* increased after 48 hours of exposure, suggesting activation of the AGE-RAGE pathway and its effects on extracellular matrix proteins. The levels of JAK2 and STAT3 transcripts also increased under the experimental conditions, while the expression of miRNA-375, which interacts with JAK2, was repressed. The interaction of circRNAs 0025868 and 0039350 with miRNA-375 was predicted, and their overexpression was confirmed in our cell model. The increased expression of these circRNAs suggested that they may be sequestering miRNA-375, thus blocking its ability to modulate *JAK2* expression. Overall, these findings contribute to a better understanding of the role of circRNA-miRNA mediated regulation of key proteins involved in DN and could expand the opportunity to develop better therapeutic approaches and diagnostic strategies for this pathology.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, metabólica y compleja, que se manifiesta debido a una síntesis inadecuada de insulina por parte del páncreas o a una utilización ineficaz de esa hormona por parte del organismo. La producción y acción insuficientes de la insulina, la hormona encargada de regular el metabolismo de la glucosa, conducen a la hiperglucemia. Dicha hiperglucemia provoca daños a largo plazo en los capilares sanguíneos y las terminaciones nerviosas, afectando la funcionalidad de diversos órganos y sistemas (ElSayed, *et al.*, 2023).

La presentación clínica de la DM abarca un conjunto de síntomas distintos, que incluyen poliuria, polidipsia, polifagia, cambios bruscos de peso, agotamiento, falta de concentración, vómitos, dolor de estómago, hormigueo o entumecimiento en manos y pies, visión borrosa, infecciones frecuentes y retraso en la cicatrización de heridas (Gutiérrez, 2016). Por lo mismo, controlar la DM es un desafío multifacético que se extiende más allá del control de la glucosa para abarcar la atención médica continua y las estrategias de reducción de riesgos. La educación y el apoyo continuos para el autocontrol de la diabetes desempeñan un papel fundamental para evitar complicaciones agudas y mitigar el riesgo de las complicaciones a largo plazo (Davies, *et al.*, 2022).

La Asociación Estadounidense de Diabetes (ADA) describe los "Estándares de atención para la diabetes". Estos estándares delinean los componentes de la atención, los objetivos generales del tratamiento y las herramientas para evaluar la calidad de la atención. Dentro de ellos también se presentan las clasificaciones de la enfermedad, que consisten en 4 grupos: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), Diabetes mellitus gestacional, y tipos específicos de diabetes monogénica (Fig. 1) (ElSayed, *et al.*, 2023).

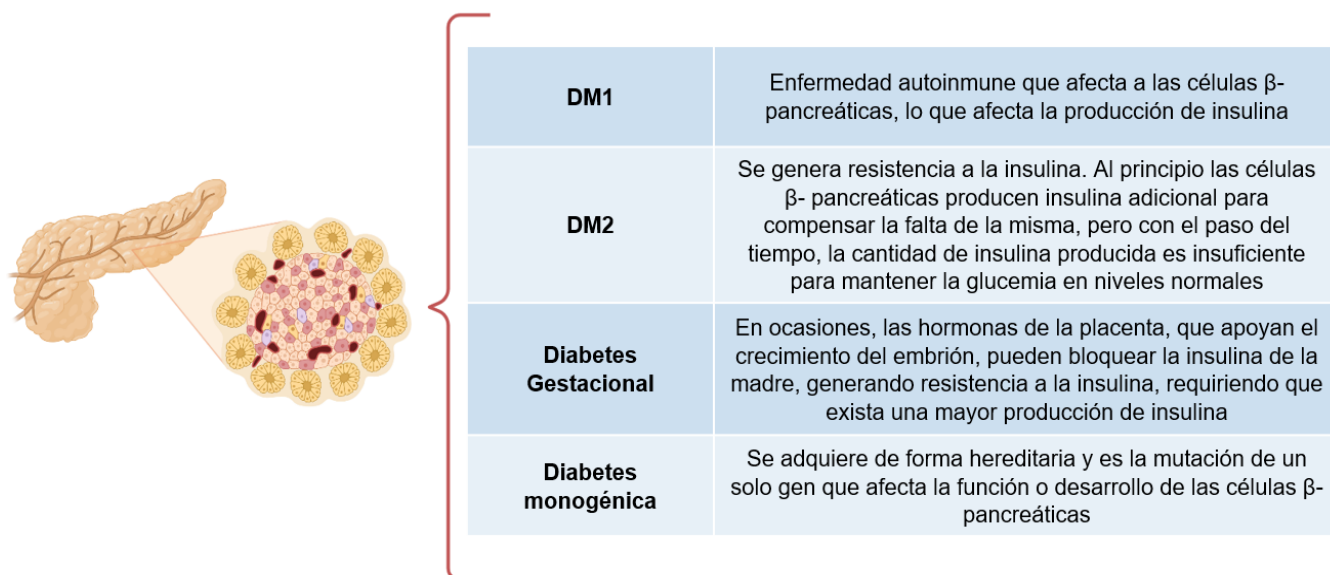


Figura 1: Tipos y causas de la Diabetes. La figura ilustra a partir de un páncreas normal los diferentes tipos de diabetes y los mecanismos fisiopatológicos de cada uno de ellos. (Tomado y modificado de ElSayed, *et al.*, 2023).

1.2 Epidemiología de la Diabetes mellitus

En el 2021 se estimó una prevalencia mundial de 537 millones de población adulta de entre 20-79 años con diabetes, cifra que se espera que aumente a 643 millones para el 2030, llegando hasta 783 millones para el 2045 (Davies, *et al.*, 2022; Forouhi, *et al.*, 2022).

Por su parte, en México, en 2022, la prevalencia de diabetes diagnosticada y no diagnosticada fue de 12.6% y 5.8%, respectivamente, para una prevalencia total del 18.3% (aproximadamente 14.6 millones de personas) (Basto-Abreu *et al.*, 2022), evidenciando que en el periodo de tiempo que comprende entre el año 2006 a 2022, la prevalencia de la DM ha aumentado paulatinamente de 14.4% a 18.3% (Villalpando, *et al.*, 2010).

De los diferentes tipos de DM, en México se destaca la DM2, que ocupa el segundo lugar entre las causas de muerte a nivel nacional en el año 2022 (INEGI, 2023).

1.3 Diabetes mellitus tipo 2

El desarrollo de DM2 a menudo se debe a la presencia de resistencia periférica a la insulina, deficiencia relativa de insulina o secreción insuficiente de insulina por parte de las células beta pancreáticas, o todas combinadas (Lotfy, *et al.*, 2017; Davies, *et al.*, 2022). La resistencia a la insulina aumenta los niveles de ácidos grasos libres y citocinas proinflamatorias en el plasma, reduce el transporte de glucosa a las células musculares, aumenta la producción hepática de glucosa y promueve la degradación de los ácidos grasos. Los síntomas reconocidos de la DM2 incluyen nicturia, poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, fatiga, dificultad para concentrarse, vómitos, dolor de estómago y visión borrosa (Carrera Boada, *et al.*, 2013).

La prevalencia de DM2 ha aumentado en los últimos años, convirtiéndola en una de las enfermedades crónicas más comunes y constituyendo entre el 90-95% de todos los casos de DM (American Diabetes Association, 2020). Pese a que existen factores genéticos que pueden predisponer a ciertas poblaciones a ser más susceptibles a esta enfermedad, se cree que la principal razón de este aumento de prevalencia esté asociado con el cambio de los hábitos de vida modernos, como dietas ricas en calorías, estilos de vida sedentarios, cambios en la esperanza de vida, obesidad y acceso limitado a la atención médica, por lo mismo, el tratamiento en etapa temprana incluye cambios en el estilo de vida como ejercicio, cambios en la dieta y control del peso. Sin embargo, a pesar de estas medidas, la resistencia a la insulina puede persistir y requerir medidas especiales y uso de fármacos antidiabéticos. A diferencia de la DM1, la DM2 generalmente se desarrolla más tarde en la vida y se trata principalmente con medicamentos orales. (Farmaki *et al.*, 2020). Sin embargo, también se requiere de un enfoque de tratamiento integral que abarque intervenciones tanto conductuales como farmacológicas (como seguimiento atento de los niveles de glucosa en sangre, el peso, y los factores de riesgo cardiovascular), para prevenir, aminorar o aplazar el impacto de sus comorbilidades y complicaciones (Gudisa, 2022). La importancia de enfocarse en la prevención de las complicaciones de la DM2 se debe a que gran parte de la mortalidad derivada de esta enfermedad es consecuencia de sus complicaciones,

ya que la gravedad de ellas tiene consecuencias en diversos sistemas del organismo reduciendo significativamente la calidad de vida de los afectados.

1.4 Complicaciones de la DM2

Gran parte de la carga mundial de la morbilidad y mortalidad de la DM2 es consecuencia del desarrollo de sus complicaciones, y se estima que el 8.4% de las muertes son atribuibles a las mismas. La hiperglucemia característica de la DM2 ejerce efectos perjudiciales sobre diversos tejidos, deteriorando particularmente la estructura y función vascular. Las complicaciones vasculares inducidas por la diabetes se clasifican en complicaciones macrovasculares y microvasculares (Aikaeli, *et al.*, 2022; Fowler, 2008).

1.4.1 Complicaciones macrovasculares

Las complicaciones macrovasculares abarcan enfermedades arteriales coronarias y periféricas, lo que puede provocar cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, lo que frecuentemente produce una morbilidad y mortalidad significativas (Chawla, *et al.*, 2016).

Los daños en las células endoteliales son un factor fundamental en la etiopatogenia de las complicaciones macrovasculares, y son el resultado de los niveles elevados de glucosa y lípidos en sangre, la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) como el metilglioxal, y la liberación de moléculas que participan en la inflamación (Stitt, *et al.*, 2002) (Fig. 2). La DM2 se asocia con una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a la vasoconstricción, la peroxidación lipídica acelerada y reacciones inflamatorias que promueven la aterosclerosis. La aterosclerosis, la cual está caracterizada por un aumento del depósito de lípidos, especialmente lipoproteínas de baja densidad (LDL), en los vasos sanguíneos de gran calibre, ocurre con mayor frecuencia en personas con DM2 (Lotfy, *et al.*, 2017).

Las acciones protectoras antioxidantes y antiinflamatorias de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) están comprometidas en la DM2 debido a la liberación excesiva

de ROS, lo que provoca la oxidación de fosfolípidos y esteroides. Además, la DM aumenta la permeabilidad endotelial, lo que exacerba aún más las complicaciones vasculares. Las complicaciones macrovasculares involucran la calcificación y la formación de placas en el endotelio vascular, intensificando el riesgo de problemas vasculares graves (Lotfy, *et al.*, 2017; Yaribeygi, *et al.*, 2022).

La enfermedad arterial coronaria diabética también es una complicación macrovascular prevalente, junto con el accidente cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica. La miocardiopatía inducida por DM2, asociada con dislipidemia y aumento de la presión arterial, conduce a fibrosis cardíaca. El estrés oxidativo, impulsado por la sobreproducción de radicales libres, altera las células del miocardio, provocando una desregulación de la homeostasis del calcio, disfunción contráctil, remodelación del miocardio y posterior muerte de los cardiomiocitos (Chawla, *et al.*, 2016; Aikaeli, *et al.*, 2022) (Fig. 2).

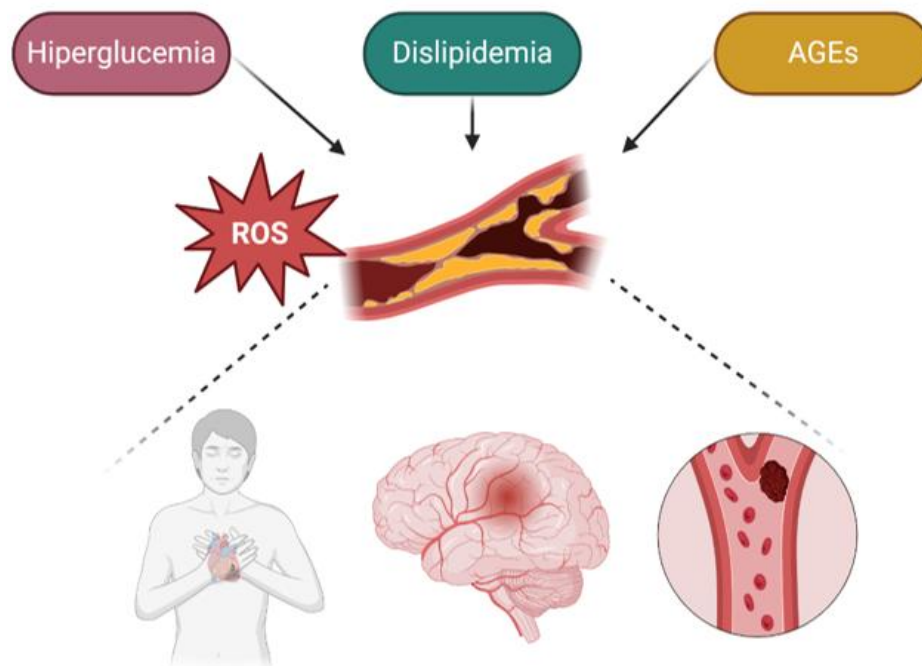


Figura 2. Complicaciones de la DM2. Los AGEs, la hiperglucemia y la dislipidemia generan un estado proinflamatorio y de estrés oxidativo que resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto sobre el endotelio vascular promueve la formación de la placa de ateroma, lo que desemboca en enfermedad arterial coronaria, enfermedad arterial periférica, accidente cardiovascular, accidente cerebrovascular y miocardiopatía diabética. Todo esto incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes com DM2. Tomada y modificada de Yaribeygi et al., 2022

1.4.2 Complicaciones microvasculares

Por su parte, las complicaciones microvasculares incluyen discapacidad visual (retinopatía), enfermedad renal (nefropatía), daño a los nervios (neuropatía) y pie diabético, que pueden provocar ceguera irreversible, enfermedad renal crónica y amputación no traumática de miembros inferiores, respectivamente (Silva, 2017; Gudisa, 2022).

Estas complicaciones dependen principalmente del deterioro de la permeabilidad vascular, lo que afecta a diversos tejidos y órganos, incluidos los riñones, la retina y los nervios. La hiperglucemia crónica y no tratada exacerba la permeabilidad vascular, alterando la estructura del glucocálix endotelial, provocando retención de agua y proteínas, culminando en un edema generalizado. Al mismo tiempo, la elevación de la proteína quinasa C (PKC) en la hiperglucemia induce un aumento de la permeabilidad vascular a través del incremento del líquido extracelular y la apoptosis de las células angiogénicas (Lotfy, *et al.*, 2017) (Fig. 3).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es crucial para la neogénesis tisular y vascular, desempeña un doble papel en las complicaciones microvasculares de la diabetes (Fig. 3). Si bien es vital para estos procesos, el VEGF tiene un papel destructivo iniciador, que influye directamente en la permeabilidad glomerular. La supresión del VEGF, aunque ralentiza la progresión de la retinopatía diabética proliferativa, constituye una paradoja. La inhibición de VEGF puede provocar un aumento de la hipertensión y la proteinuria glomerular en la diabetes, lo que dificulta la cicatrización de las heridas vasculares (Chawla, *et al.*, 2016; Aikaeli, *et al.*, 2022).

Una de las complicaciones microvasculares más importantes de la DM2 es la nefropatía diabética (ND), ya que aproximadamente un tercio de los pacientes diabéticos no controlados pueden progresar a diálisis renal debido a la susceptibilidad genética, liberación de citocinas, la acción de las especies reactivas de oxígeno o la generación de AGEs y su consiguiente interacción con su receptor (RAGE) (Lotfy, *et al.*, 2017).

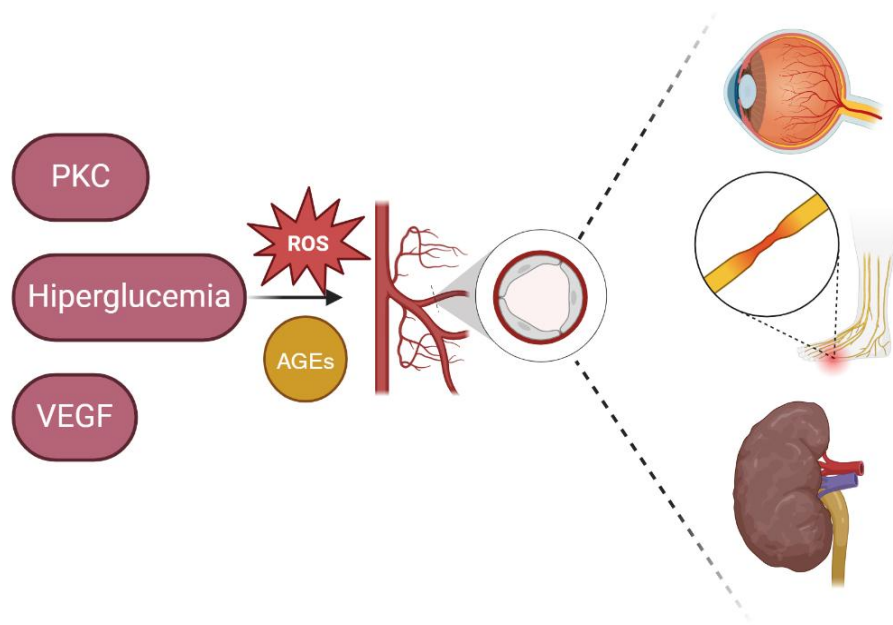


Figura 3. Complicaciones microvasculares en la DM. La hiperglucemia crónica deteriora la permeabilidad vascular y altera la estructura del glucocáliz, afectando órganos clave como los riñones, la retina y los nervios, conduciendo a retinopatía, nefropatía y neuropatía. La elevación de la PKC y el desequilibrio en el VEGF agravan la disfunción vascular, generando edema, apoptosis celular y complicaciones en la cicatrización, lo que es agravado por el estrés oxidativo, la generación de citocinas pro-inflamatorias y la formación de AGEs. Tomada y modificada de Yaribeygi, et al., 2022

1.5 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones microvasculares más frecuentes de la DM, que se produce debido a la presencia de alteraciones morfológicas en la barrera de células endoteliales glomerulares y la membrana basal glomerular, con la consecuente acumulación de matriz extracelular (MEC). Estas alteraciones elevan la filtración de proteínas en la orina, lo cual es un indicador temprano de daño renal en los pacientes diabéticos. La progresión del estrés oxidativo en la diabetes induce la expresión de angiotensinógeno, lo que contribuye al deterioro de la función renal.

La ND se define clínicamente por albuminuria persistente y una disminución progresiva de la función renal. Desde el punto de vista epidemiológico, la ND afecta hasta al 45% de los pacientes con DM1 y DM2, lo que la convierte en la principal causa de enfermedad renal terminal en el mundo occidental (Umanath, *et al.*, 2018). Asimismo, es una de las principales causas de enfermedad renal terminal a nivel mundial, asociada con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, convirtiéndola en una de las complicaciones microvasculares de mayor importancia para las personas con DM2 (Selby, *et al.*, 2020).

1.5.1 Fisiopatología de la Nefropatía Diabética

La fisiopatología de la ND está determinada por la interacción entre diferentes factores, entre los cuales se encuentran, la predisposición genética y los factores ambientales (Umanath, *et al.*, 2018) (Fig. 4).

Los niveles elevados de glucosa en sangre provocan la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que culmina en la generación de AGEs, siendo los riñones el principal sitio de liberación y metabolismo de los mismos (Busch, *et al.*, 2010) (Fig. 4). Los AGEs al interactuar con su receptor (RAGE), desencadenan una cascada de eventos como la activación de factores de transcripción, liberación de factores de crecimiento, así como diversas alteraciones hemodinámicas (Sinha, *et al.*, 2023). Estos cambios inducen la producción y acumulación de proteínas de la MEC, de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios, lo que resulta en hiperfiltración glomerular, hipertensión arterial, hipertrofia renal y alteración de la estructura glomerular (Fig. 4). A nivel histológico, los riñones sufren diversas modificaciones, que incluyen depósito de MEC, engrosamiento de la membrana basal glomerular, cambios proliferativos y atrofia tubular (Umanath, 2018). La presencia de algunos factores causales claves como los cambios metabólicos, hemodinámicos, y la presencia de factores hipertróficos, proinflamatorios y profibróticos inician y mantienen la progresión de la ND, lo que contribuye a las lesiones en diferentes compartimentos renales. En dicho proceso intervienen una

gran cantidad de moléculas, receptores, enzimas y factores de transcripción que, en última instancia, conducen a la enfermedad renal terminal (Agarwal, 2021).

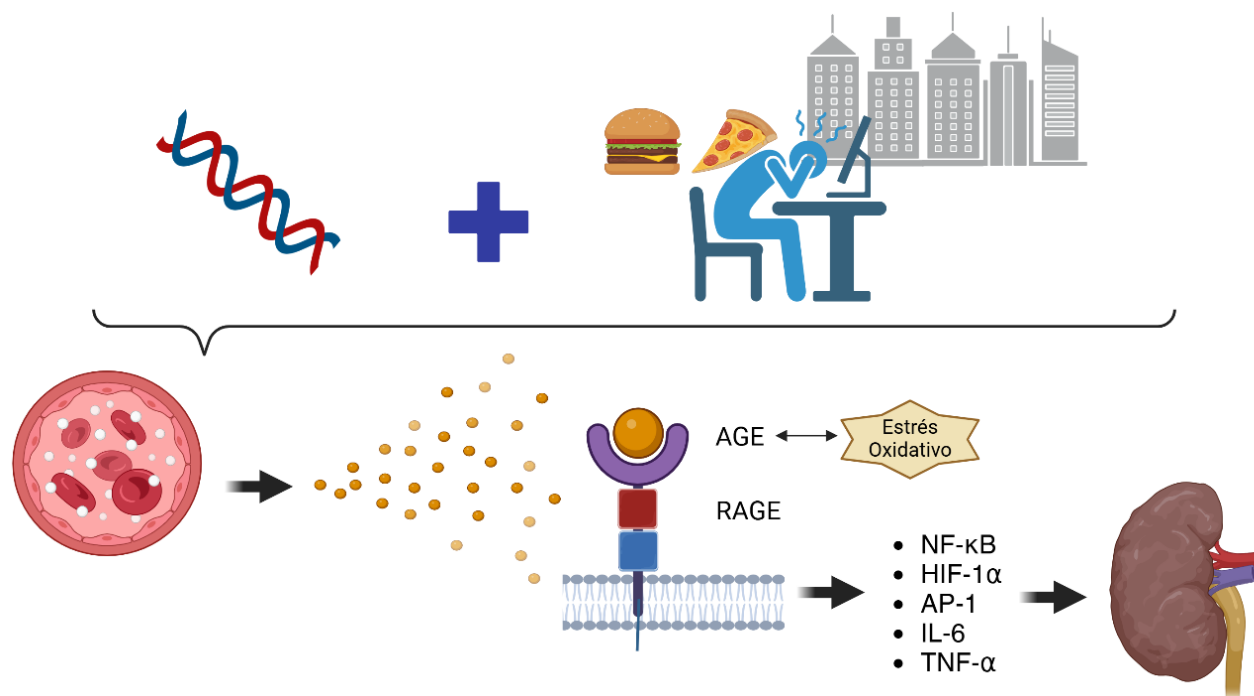


Figura 4. Fisiopatología de la nefropatía diabética. La interacción entre factores genéticos y ambientales, junto con la hiperglucemia, provoca la formación de AGEs que a su vez interactúan con RAGE, provocando eventos moleculares y celulares como la activación de factores de transcripción, liberación de factores de crecimiento, estrés oxidativo, inflamación y alteraciones hemodinámicas. Dichos procesos conducen a cambios estructurales y funcionales en el riñón incluyendo hiperfiltración glomerular, hipertensión, fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis, que culminan en la enfermedad renal terminal. Tomada y modificada de Patil, et al., 2022

Un indicador temprano de nefropatía diabética es el aumento de la excreción urinaria de albúmina, lo que marca un punto crucial para la detección e intervención oportunas en la progresión de esta complicación microvascular.

Es por lo mismo que, en la búsqueda de mejores resultados y una comprensión más profunda de la ND, las investigaciones más recientes tienen como objetivo identificar factores genéticos específicos, vías causales y objetivos terapéuticos. Esto ha permitido la identificación de diferentes blancos terapéuticos y desarrollo de estrategias nuevas de tratamiento como la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona, inhibidores del cotransportador 2 de sodio y glucosa, y el desarrollo de agonistas del péptido Glucacon-Like Peptide 1 (GLP1) y del polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) (Davies, *et al.*, 2022). Sin embargo, todavía las estrategias de tratamiento son limitadas, y tampoco existen biomarcadores eficientes de la enfermedad que permitan hacer un diagnóstico temprano, por lo que es preciso identificar nuevas alternativas que permitan facilitar el diagnóstico y el tratamiento oportuno de la enfermedad, por lo que se han desarrollado investigaciones para identificar marcadores potenciales de diagnóstico (Li C. *et al.*, 2021).

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Vía AGE-RAGE

Dentro de las vías de señalización más importantes en la ND destaca la vía AGE-RAGE, la cual se activa por la interacción de los AGEs con su receptor (RAGE). Dicha vía juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Piperi, *et al.*, 2015; Regazzi, 2018). Los AGEs se forman en altas concentraciones en personas con hiperglucemia crónica debido a la diabetes, siendo los riñones la principal vía por la que se eliminan y metabolizan estas moléculas (Busch, *et al.*, 2010). La formación y acumulación de AGEs en el endotelio vascular se consideran el principal mecanismo por el cual se desarrollan las complicaciones de la diabetes (Pal, *et al.*, 2023).

2.1.1 Productos finales de glicación avanzada.

Los AGEs desempeñan un papel fundamental en la disfunción celular, particularmente en respuesta a la hiperglucemia, alterando la estructura terciaria de las proteínas e interrumpiendo su función. Además, actúan como ligandos de receptores presentes en diferentes células, modulando numerosas vías intracelulares (Gutowska, *et al.*, 2023).

Los AGEs se forman de diversas fuentes y se incrementan en diferentes afecciones. Factores como el envejecimiento, la inflamación, la insuficiencia renal y el aumento del estrés intracelular y extracelular contribuyen a su producción. Los hábitos dietéticos también desempeñan un papel crucial, ya que los alimentos procesados con alto contenido de grasas y los alimentos ricos en proteínas tratados térmicamente son fuentes importantes de AGEs debido a su contenido de ácidos grasos saturados y azúcares. Las opciones de estilo de vida, como fumar cigarrillos y el consumo crónico de alcohol, exacerban aún más la formación de AGEs. Además, la vía de los polioles y la peroxidación lipídica contribuyen a la generación de AGEs endógenos, destacando la naturaleza multifacética de su formación (Asadipooya, *et al.*, 2019).

2.1.2 Generación de AGEs

Los AGEs, se forman mediante condensación no enzimática, un proceso catalizado por azúcares reductores que reaccionan con grupos amino libres de ácidos nucleicos, proteínas o lípidos (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022).

La génesis de los AGEs se amplifica en condiciones como la DM2, donde la hiperglucemia aumenta su producción mediante glicación no enzimática de algunas macromoléculas. Los altos niveles de estrés oxidativo exacerban aún más este proceso, lo que lleva a la modificación y daño de estas macromoléculas y, en última instancia, contribuye a la formación de AGEs (Dhodi, *et al.*, 2014).

Los AGEs se pueden clasificar en términos generales como endógenos, formados dentro del organismo, o exógenos, derivados de fuentes externas como la dieta o el

humo del cigarrillo y que contribuyen significativamente a su acumulación endógena (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022; Gutowska, *et al.*, 2023).

Los AGEs endógenos se generan mediante procesos metabólicos como la reacción de Maillard, la vía de los polioles y la peroxidación lipídica, y su acumulación se asocia con diversas enfermedades crónicas. El primer producto endógeno de glicación temprana observado, la hemoglobina glucosilada (HbA1c), se detectó en 1968 en un individuo con diabetes y actualmente es considerado un marcador del control de la glucosa a largo plazo. A partir del hallazgo de la HbA1c se ha puesto interés en la comprensión de los efectos de la presencia de estas moléculas en diferentes enfermedades (van Dongen, *et al.*, 2022; Twarda-Clapa, *et al.*, 2022).

La reacción de Maillard, por ejemplo, es un proceso no enzimático de glicación que se acelera en condiciones hiperglucémicas, como en la DM, y genera numerosos precursores carbonílicos intermedios de los AGEs, los cuales son altamente reactivos (Khalid, *et al.*, 2022).

En la etapa inicial de la reacción de Maillard, el grupo carbonilo de un azúcar reductor, como la glucosa (aldosa), reacciona reversiblemente con un grupo amino libre de las proteínas como las cadenas laterales de lisina o arginina, lo que da como resultado la formación de bases de Schiff inestables (Fig. 5). Estas bases de Schiff sufren un reordenamiento espontáneo, conocido como reordenamiento de Amadori, para formar productos más estables (van Dongen, *et al.*, 2022). Cuando ese mismo proceso ocurre teniendo como sustrato de la reacción de Maillard a una cetosa, por ejemplo, fructosa, la cual se puede formar por la activación de la vía de los polioles cuando hay exceso de glucosa, el producto que se forma a consecuencia del reordenamiento de la base de Schiff, es conocido como producto de Heyns (Fig. 5). A estos compuestos se le conocen como productos de glicación temprana (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022; Gutowska, *et al.*, 2023). Los productos de glicación temprana pueden reorganizarse a través de la vía de Hodge, que es una serie de reacciones que incluyen deshidratación, fragmentación, oxidación y ciclación. Además, estos productos de glicación temprana también pueden descomponerse a través de la vía de Namiki (degradación de aminoácidos o lípidos y escisión de compuestos

dicarbonílicos de aldiminas) en dicarbonilos reactivos. Entre ellos destacan el metilglioxal (MGO), glioxal (GO), y las 1 y 3-desoxiglucosona (DG) (van Dongen, *et al.*, 2022; Zhang C, *et al.*, 2022). Estos dicarbonilos, también conocidos como α -oxoaldehídos pueden reaccionar con grupos amino de proteínas para formar aductos y entrecruzamientos estables e irreversibles, formando finalmente los ya mencionados AGEs (Fig. 5) (Khalid, *et al.*, 2022; Zhang C, *et al.*, 2022).

Sin embargo, los carbonilos reactivos también pueden originarse a partir de otras diversas vías *in vivo*, por ejemplo, el metilglioxal y el gliceraldehído pueden generarse en el curso de la glucólisis y fructólisis (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022). Entre los productos de Amadori y AGEs más abundantes y más frecuentemente estudiados en los alimentos se encuentran la fructolisina (FL), que se forma a partir de glucosa y lisina, y la N ϵ -carboximetil lisina (CML) que se forma mediante reordenamiento de FL o mediante una reacción entre los residuos de lisina y el GO o la 3-desoxiglucosona (van Dongen, *et al.*, 2022; Zhang C, *et al.*, 2022). Del mismo modo, debido a su estabilidad ácida, la CML y la pentosidina son los AGEs que se miden con más frecuencia, además de haber recibido una mayor atención en la investigación debido a su papel en el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y neurológicas y el cáncer (Gutowska, *et al.*, 2023; Zhang C, *et al.*, 2022).

Otros AGEs reconocidos incluyen compuestos como pirralina, hidroximetilfurfural (HMF), S-carboximetil-cisteína (CMC), N ϵ -carboxietil-lisina (CEL) y N δ -(5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il)-ornitina (MG-H1) (van Dongen, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2022).

Por otra parte, los AGEs endógenos se pueden denominar con respecto a su precursor con prefijos que indican su origen, por ejemplo, derivados de glioxal (GO-AGE), derivados de metilglioxal (MGO-AGE), o derivados de gliceraldehído (Glycer-AGE), derivados de glicolaldehído (Glycol -AGE). Asimismo, también se pueden clasificar según su peso molecular en bajo peso molecular (LMW) y AGEs de alto peso molecular (HMW). Los LMW-AGEs son proteínas cuya masa no supera los 12 kDa, como la CML; mientras que las proteínas restantes se agrupan como HMW-

AGEs. Se cree que estas últimas son proteínas de unión, mientras que los LMW-AGEs son proteínas libres o moléculas unidas a péptidos que pueden ser el resultado de una degradación incompleta de proteínas (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022).

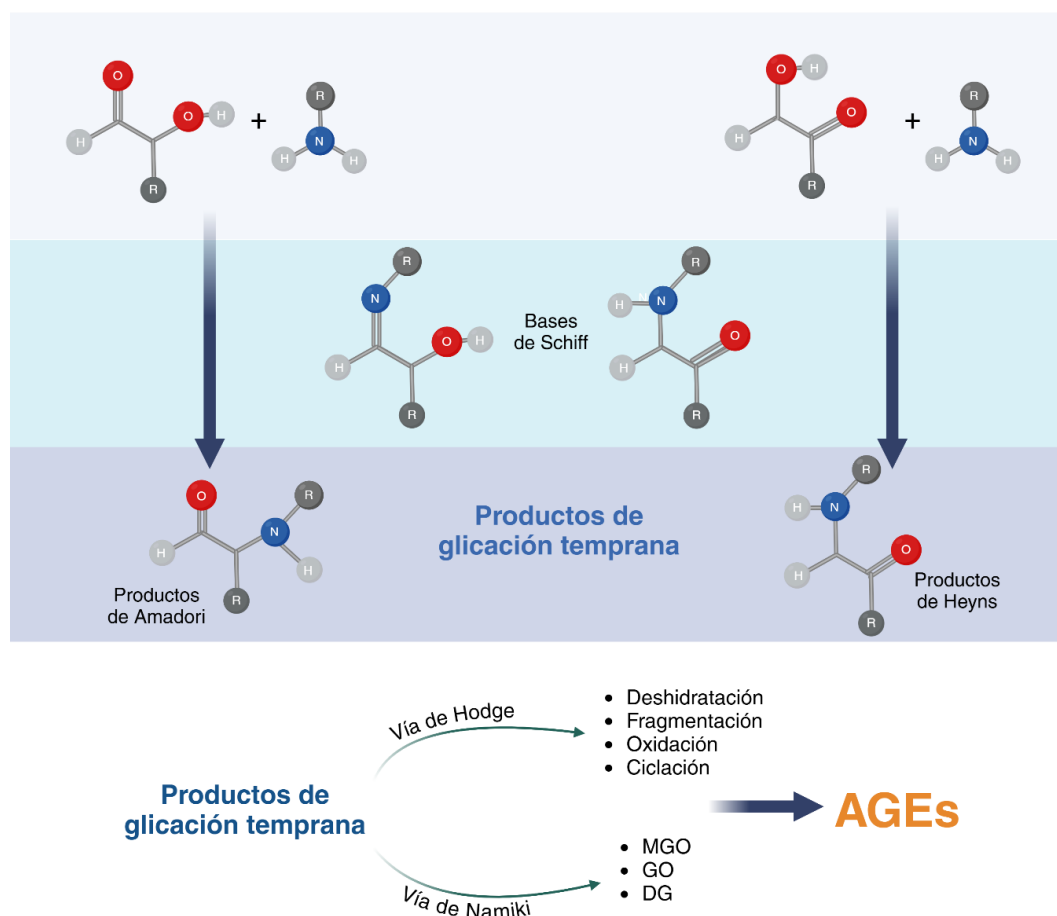


Figura 5. Esquema de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs). En la reacción de Maillard, un azúcar reductor reacciona de manera no enzimática con grupos amino libres de proteínas como las cadenas laterales de lisina o arginina para formar bases de Schiff inestables, que se reorganizan en productos de Amadori más estables. En la vía de los polioles, la autooxidación de monosacáridos produce carbonilos intermedios como los productos de Heyns. Dichos productos de glicación temprana pueden transformarse mediante la vía de Hodge por medio de procesos como deshidratación, fragmentación, oxidación y ciclación; o mediante la vía de Namiki en dicarbonilos reactivos como metilglioxal (MGO), glioxal (GO) y 1,3-desoxiglucosona (DG). Finalmente, estos procesos forman los AGEs. Tomada y modificada de Twarda-Clapa, *et al.*, 2022

Debido a su tamaño, los HMW-AGEs requieren de péptidos para ser transportados a través del epitelio intestinal, mientras que los LMW-AGEs pueden ser absorbidos mediante difusión simple, lo que, aunado a factores como el entorno intestinal y la dieta, les permite distribuirse fácilmente por todo el organismo, acumulándose fundamentalmente en el hígado, riñones, pulmones, bazo y corazón. (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022; Poulsen, *et al.*, 2016).

Los AGEs participan en el desencadenamiento del daño renal en la DM a través de sus interacciones con su receptor. RAGE, es un receptor de superficie celular, que se expresa en diferentes tipos de células, incluidas las células renales. Cuando los AGEs se unen a RAGE, activan vías de señalización intracelular que conducen a la inflamación, la acumulación de MEC, el estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento (Fig. 6). Estas respuestas son las que contribuyen al desarrollo de inflamación, fibrosis, daño tisular e hipertrofia renal (Piperi, *et al.*, 2015; Regazzi, *et al.*, 2018).

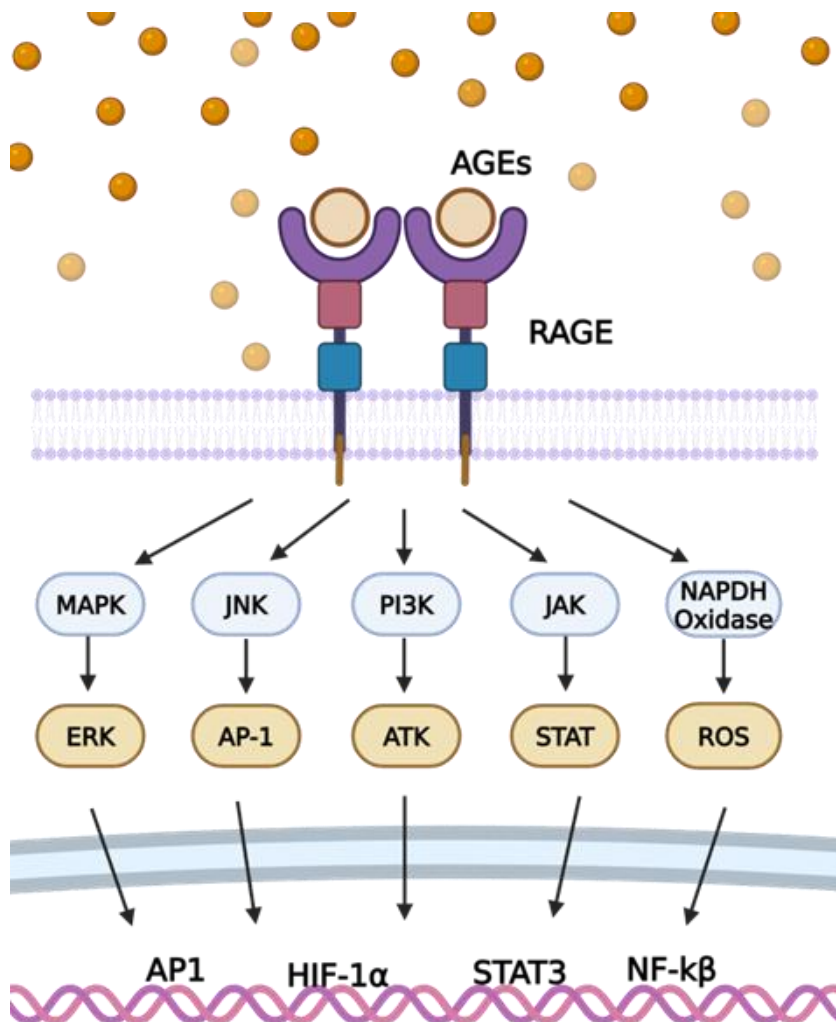


Figura 6. Esquema de la vía de señalización AGE-RAGE La formación de productos avanzados de glicación (AGEs) aumenta en pacientes con hiperglucemia crónica, contribuyendo al daño renal. Los AGEs se unen al receptor RAGE, presente en varias células, incluidas las renales, lo que activa una cascada de señalización intracelular que incluye diversas vías como MAPK, NADPH Oxidasa, PI3K, JNK, ERK1/2 y JAK/STAT. Esta activación promueve la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis y la hipertrofia renal, elementos claves en el desarrollo de las complicaciones diabéticas (Piperi, *et al.*, 2015).

La activación de RAGE por ligandos como AGEs desencadena una cascada de eventos de señalización intracelular que involucra diversas vías y una variedad de efectores posteriores, incluyendo la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), p38, SAPK/JNK, quinasa regulada por señal extracelular mediada por Ras

(ERK1/2) y la vía JAK/STAT, que a su vez conducen a algunos factores de transcripción a activar a *NF-κB*, *STAT3*, *HIF-1α* y *AP-1* (Khalid, *et al.*, 2022; Kay, 2016) (Fig. 6).

2.1.3 Receptores de productos finales de glicación avanzada

En la fisiopatología de la DM los AGEs ejercen sus efectos biológicos a través de 2 mecanismos principales: 1) no mediados por receptores, como consecuencia de atrapar y entrecruzar proteínas; 2) mecanismos mediados por receptores, uniéndose a sus receptores de las superficies celulares, principalmente a RAGE (Asadipooya, *et al.*, 2019; Khalid, *et al.*, 2022).

RAGE, es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que inicialmente fue identificado por su capacidad para que se le unan los AGEs. Sin embargo, se ha descubierto que RAGE también reconoce otros ligandos endógenos y exógenos, como las proteínas S100, el péptido β-amiloide y las proteínas de choque térmico, esto debido a que RAGE reconoce estructuras tridimensionales en lugar de secuencias de aminoácidos específicas. Este receptor multiligando se considera un receptor de reconocimiento de patrones debido a su capacidad para identificar la estructura de los sitios de reconocimiento de ligandos, siendo esta misma capacidad la razón por la que sea considerado como el principal receptor de AGEs (Asadipooya, *et al.*, 2019; Khalid, *et al.*, 2022). Aunado a lo anterior, la expresión de RAGE se ha detectado en una variedad de células, incluidas células inflamatorias (monocitos, macrófagos y linfocitos), células endoteliales, células del músculo liso, células neuronales, osteoblastos y osteoclastos, células mesangiales renales, y podocitos; lo que sugiere su importante papel en diversas enfermedades, incluida la diabetes y sus complicaciones. Asimismo, también se ha visto su expresión en muchas células formadoras de tejido adiposo, tales como los adipocitos, sus precursores, células estromales y algunos macrófagos.

La primera descripción de RAGE fue ofrecida por Neeper et al en 1992, y desde entonces se ha estudiado por su participación en diversos procesos patológicos (Ramasamy, *et al.*, 2005; Neeper, *et al.*, 1992). El gen *AGER* (que codifica para RAGE) se encuentra en el cromosoma 6 cerca del complejo mayor de histocompatibilidad III (MHC clase III), lo que indica su participación en las respuestas inmunes, y posee 11 exones que codifican para los diferentes dominios de la proteína RAGE (Fig. 7). El mRNA transcrito resultante de *AGER* se traduce en una proteína de 404 aminoácidos con una masa de entre 45 a 55 kDa (Fig. 7). Esta proteína transmembranal consta de tres dominios extracelulares tipo Ig (dominio V, y C2), un dominio transmembranal (TM) y un dominio citoplasmático (Asadipooya, *et al.*, 2019; Khalid, *et al.*, 2022). El dominio V-C1 es crítico para la interacción con ligandos, incluidos los AGEs. Además de su forma de longitud completa (fl-RAGE), se han descrito isoformas solubles de RAGE (sRAGE) derivadas de empalme alternativo y proteólisis (Twarda-Clapa, *et al.*, 2022) (Fig. 7). Las vías de señalización secundarias a las interacciones con RAGE contribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno, la producción de factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias, así como al estrés oxidativo y la inflamación asociada con diversas enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, cáncer y complicaciones diabéticas. Como ya se mencionó anteriormente, la hiperglucemia característica de la DM aumenta los niveles de AGEs en la sangre, y estos al interactuar con RAGE desencadenan dichos eventos de señalización. La sobreexpresión de RAGE también estimula la síntesis de NF- κ B, lo que conduce directamente a la resistencia a la insulina al inhibir la transcripción de GLUT4, la proteína transportadora de glucosa codificada por el gen *Slc2a4* en el músculo esquelético, convirtiéndose en un ciclo vicioso patológico, empeorando así todavía más las complicaciones del paciente con DM (Khalid M, *et al.*, 2022).

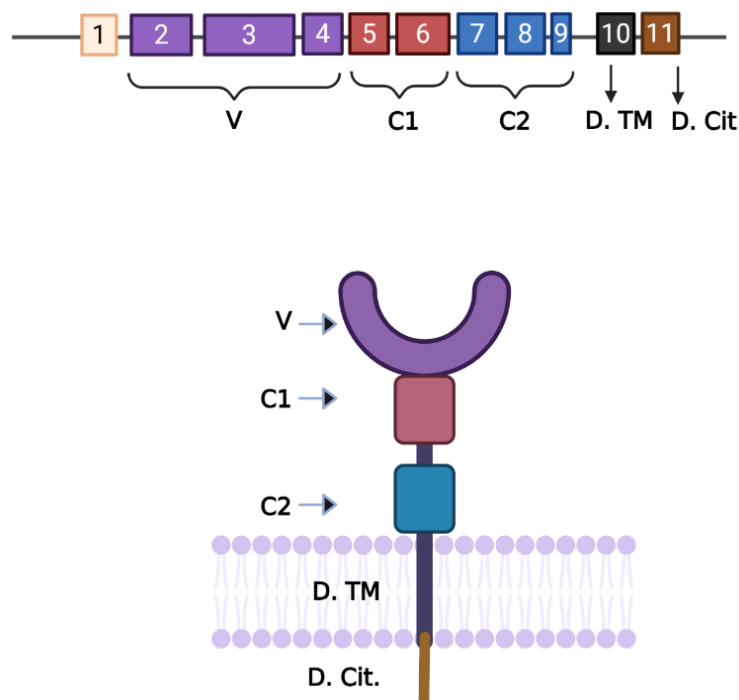


Figura 7. Estructura del gen *AGER* y organización de dominios de la proteína RAGE. En la imagen se observa la organización de los exones del gen *AGER*, en la cual los exones se representan según el dominio que codifican (amarillo: secuencia líder; morado: dominio V, exones 2-4; guinda: dominio C1, exones 5 y 6; azules: dominio C2, exones 7-9; negro: dominio transmembranal, exón 10; y café: dominio citoplásmico (D.Cit). Siguiendo el mismo código de colores se representa en la parte inferior la estructura de la proteína RAGE completa anclada a la membrana plasmática. Tomada y modificada de Kalea, *et al.*, 2011.

2.1.4 Eje AGE/RAGE en nefropatía

Se ha observado que la interacción AGE/RAGE produce múltiples efectos biológicos, incluidos complicaciones microvasculares y macrovasculares de la diabetes, como la neuropatía, nefropatía, retinopatía, miocardiopatía y aterosclerosis. A nivel renal, la unión AGE/RAGE conduce a una cascada de eventos que incluyen una mayor formación de especies reactivas de oxígeno citosólicas, estimulación de moléculas intracelulares como PKC y NF- κ B y

activación, así como expresión, de una serie de factores de crecimiento y citocinas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que están implicados en la patogénesis de la ND. Como resultado de la formación de AGEs en la nefropatía diabética ocurre un incremento anormal de la permeabilidad de la membrana basal glomerular a la albúmina. La unión de AGE/RAGE en las células mesangiales glomerulares también estimula la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que media la producción de colágeno tipo IV, laminina y proteoglicano de sulfato de heparina en las células mesangiales (Kay, 2016; Asadipooya, *et al.*, 2019).

La interacción AGE/RAGE puede afectar la función celular, la motilidad y el metabolismo, afectando directamente a las células y tejidos a través de daños inflamatorios y oxidantes. En humanos con diabetes, los AGEs de CML son los ligandos más frecuentes de RAGE (Asadipooya, *et al.*, 2019).

2.2 Proteínas Desreguladas en la Nefropatía Diabética

Se ha observado que uno de los elementos para el desarrollo y la progresión de la ND es la desregulación en la expresión de diferentes proteínas. Esto contribuye a que la inflamación, fibrosis e hipertrofia características de la ND se vean favorecidas, incrementando la progresión de la enfermedad. Entre dichas proteínas se encuentran incluidas varias citocinas, enzimas y factores de crecimiento cuya desregulación provoca cambios importantes en estructuras importantes como los glomérulos renales, la membrana basal glomerular (MBG), las células mesangiales, y la matriz mesangial contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad renal crónica en la diabetes (Thomas, *et al.*, 2015).

Por ejemplo, existen estudios que han sugerido que los niveles de apolipoproteína A-I, A-II y C-I podrían estar asociados con la enfermedad renal crónica progresiva. Sin embargo, aún no está claro qué papel juegan esas moléculas exactamente en la patogénesis de la ND (Thomas, *et al.*, 2015).

Asimismo, existen estudios que han demostrado que los podocitos y las células mesangiales y tubulares liberan moléculas como TGF- β 1, la angiotensina II (Ang II), la cual regula la presión capilar, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) y el receptor tipo 2 (AT2), VEGF, y algunas citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-18 (IL-18) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), las cuales generan cambios funcionales y estructurales en los glomérulos. Esas moléculas también pueden inducir cambios patogénicos ya sea elevando el estrés oxidativo a través de la activación de la NADPH oxidasa o activando la señalización de remodelación celular, lo que altera la MEC y contribuye al daño renal progresivo (Campion, *et al.*, 2017; Pérez-Morales, *et al.*, 2019).

Los AGEs también inducen respuestas celulares específicas, incluida la liberación de TGF- β 1, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y VEGF, relacionados con la progresión de la ND, y de hecho, se ha considerado a TGF- β 1 como marcador bioquímico para estimar la progresión de la enfermedad, además, en situaciones de estrés, tanto las células inmunitarias como las células renales producen citocinas inflamatorias que agravan el daño, incluidas TGF- β 1, IL-18 e IL-6 (Campion, *et al.*, 2017).

También se ha reportado que diversas citocinas, como la IL-1, IL-6, IL-18 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), pueden estar implicadas en la patogénesis de la ND. Por ejemplo, el incremento en los niveles de IL-1 está vinculado a una mayor permeabilidad de las células endoteliales vasculares (Pérez-Morales, *et al.*, 2019). De igual forma, los niveles en suero de IL-6 se correlacionan con la albuminuria y facilitan la infiltración de neutrófilos en el túbulo-intersticio renal, influyendo en la dinámica de la MEC y promoviendo la hipertrofia renal (Campion, *et al.*, 2017). La expresión de IL-18 en células epiteliales glomerulares y tubulares renales favorece la apoptosis celular y se relaciona con la macroalbuminuria, lo que sugiere que participa en el desarrollo de complicaciones renales microvasculares. Por su parte, TNF- α altera la hemodinámica glomerular y promueve el estrés oxidativo (Campion, *et al.*, 2017; Pérez-Morales, *et al.*, 2019).

Por otro lado, las quimiocinas, como MCP-1/CCL2 y CX3CL1, son cruciales para el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en el riñón. Estas moléculas, cuya expresión aumenta en respuesta a estímulos metabólicos y hemodinámicos, contribuyen al daño tisular en la ND. La Ang II regula positivamente la expresión de MCP-1/CCL2, y su bloqueo mediante inhibidores del sistema renina-angiotensina puede reducir sus niveles en la orina (Campion, *et al.*, 2017; Pérez-Morales, *et al.*, 2019; Oda, *et al.*, 2023).

De igual modo, se ha descrito que la expresión túbulo-intersticial de varias isoformas de JAK y STAT aumenta con la progresión de la enfermedad y se correlaciona inversamente con la del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (eGFR), así como con la sobreexpresión de la vía JAK/STAT en las células glomerulares de pacientes con enfermedad renal crónica temprana (Pérez-Morales, *et al.*, 2019).

Con respecto a proteínas cuya expresión se encuentra reprimida en la ND, una de las que ha sido estudiada es la proteína Sirt1, que se expresa normalmente en el riñón normal, y su expresión disminuye en ND. La pérdida de Sirt1 en los podocitos no solo agrava la lesión renal diabética, sino que también conduce a un agravamiento de la glomeruloesclerosis y la albuminuria inducidas por el envejecimiento. Este fenómeno se asocia con una activación reducida de los factores de transcripción a través de la desacetilación mediada por Sirt1 (Guo, *et al.*, 2020).

Otra proteína cuyo nivel de expresión se ve comprometido en la ND, reduciéndose significativamente, es la proteína Klotho, lo cual también se relaciona con una mayor excreción urinaria de calcio. También se ha demostrado que la inducción de la expresión de Klotho en ND puede atenuar la fibrosis, la hipertrofia, la albuminuria, la expansión mesangial glomerular, y reprimir la activación de NF- κ B, por lo que podría actuar como un modulador antiinflamatorio que regula negativamente la producción de proteínas inflamatorias vinculadas a NF- κ B (Guo, *et al.*, 2020).

También se ha reportado que los niveles séricos de Beclin-1, un regulador de la autofagia, están reducidos en pacientes con ND y que se correlacionan con el grado

de albuminuria, lo que indica inhibición de la autofagia en pacientes con lesiones renales diabéticas (Guo, *et al.*, 2020).

Por otra parte, se ha reportado que las modificaciones postraduccionales de histonas, tales como la acetilación, glicosilación, fosforilación, lactilación y metilación, entre otras, están involucradas en el desarrollo de la enfermedad renal y que su mecanismo puede estar relacionado con la regulación de las respuestas inflamatorias, el estrés oxidativo, la función mitocondrial, la autofagia y la apoptosis de las células renales. (Liu Z, *et al.*, 2023).

Un ejemplo de ello es la glicosilación del factor de transcripción SP1 que regula la expresión de la enzima ENTPD5, que a su vez media otro tipo de glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico, que a su vez promueve la proliferación y apoptosis de las células epiteliales tubulares y está involucrada en la progresión de la ND (Liu Z, *et al.*, 2023).

Otro ejemplo de ello en la ND podría ser la fosforilación de histonas, como la fosforilación de H3 en serina 10, que promueve la inflamación, o la fosforilación de MAP4 que es inducida por la señalización de p38/MAPK y que causa apoptosis de los podocitos y proteinuria, o incluso la fosforilación de FADD que está relacionada a inflamación y fibrosis. (Liu Z, *et al.*, 2023).

2.3 Micro RNAs (miRNAs)

En 1987, Fergunsson y cols., en el laboratorio de Hortitz, descubrieron que una mutación supresora en el gen *lin-14* era capaz de revertir el fenotipo de la mutación nula-*lin-4*, y para 1989, Victor Ambros trabajó con Gary Ruvkun, en el laboratorio de Horvitz, para clonar el gen *lin-14*. Sin embargo, a partir de sus investigaciones conjuntas, hallaron que *lin-4* no sólo no codificaba una proteína, sino que su tamaño era de apenas 22 nt y que sus transcritos eran complementarios a una secuencia repetida en la región 3' no traducida (UTR) de la molécula *lin-14*, identificándolo

como un pequeño RNA regulador (Almeida, *et al.*, 2011; Bartel, 2004; Pelletier, *et al.*, 2023).

De este modo, los RNAs *lin-4* y *let-7* fueron denominados RNA temporales pequeños (RNAst), y se predijo que otros RNAs reguladores de este tipo podrían estar presentes. Este hallazgo reveló un nuevo mecanismo de regulación génica sin la necesidad de codificar proteínas. Muchos de los RNAs no codificantes (ncRNAs) identificados se expresaban en distintas etapas de desarrollo, en distintos tipos de células y se conservaban evolutivamente. A partir de estos descubrimientos se comenzó a utilizar el término microRNA (miRNA) para referirse a todos los RNAs pequeños con características similares (Almeida, *et al.*, 2011; Lagos-Quintana, *et al.*, 2001). Los miRNAs se definieron como pequeñas moléculas de RNA no codificantes, conservadas evolutivamente que pueden interactuar con uno o más mRNAs, modulando, en dependencia del contexto, múltiples vías moleculares (Annese, *et al.*, 2020).

Desde entonces, se han identificado más de 2000 miRNAs en humanos y se cree que regulan aproximadamente un tercio de los genes del genoma (Hammond, 2015). Estos miRNAs juegan roles críticos en una variedad de procesos biológicos, desde el control del desarrollo hasta la proliferación celular y la diferenciación del linaje hematopoyético. Además, se ha demostrado que la disfunción de los miRNAs está asociada con diversas enfermedades humanas, incluyendo cáncer, trastornos del neurodesarrollo, diabetes, etc. (Bartel, 2004; Hammond, 2015).

En el caso de la ND, los miRNAs también funcionan como reguladores postranscripcionales y podrían influir en los procesos característicos de la enfermedad al modificar la expresión de proteínas clave en la patogénesis y progresión de la misma. Se ha encontrado que los niveles de ciertos miRNAs están desregulados en suero y orina de pacientes con diabetes. Estudios hechos en modelos *in vitro* e *in vivo* de ND han demostrado que varios miRNAs, como miR-192, miR-200b/c, miR-216a y miR-217, pueden estar relacionados en la regulación de la vía de señalización TGF- β /Smad, que está involucrada en la fibrosis renal y la remodelación glomerular. También se ha observado que la señalización por TGF-

β 1 regula positivamente la expresión de estos miRNAs en células mesangiales y glomérulos. Además, se ha demostrado que miR-192 regula la producción de MEC, promoviendo la expresión de genes fibróticos como *Col1a2* y *Col4a1*, así como la expresión de otros miRNAs, que posteriormente amplifican la vía de señalización TGF- β y la respuesta fibrótica (Campion, *et al.*, 2017).

2.3.1 Biogénesis de los microRNAs

Las zonas del genoma que se transcriben como miRNAs pueden ser regiones no codificantes cuyo único producto transcripcional es el miRNA, o bien, encontrarse dentro de un intrón o una región UTR de un gen codificante de proteína. La característica definitoria de todas las regiones que se transcriben como miRNAs es la estructura del RNA precursor de tallo-bucle, siendo una hebra del tallo (o a veces ambas) la fuente del miRNA maduro (Hammond, 2015).

Las dos RNA polimerasas candidatas para la transcripción de pri-miRNA son Pol II y Pol III. Pol II transcribe los mRNA y algunos RNA no codificantes, incluidos los RNA nucleolares pequeños (RNAsno) y cuatro de los RNA nucleares pequeños (RNAsn) del espliceosoma, mientras que la Pol III transcribe algunos de los RNA no codificantes más cortos, incluidos los tRNA, el RNA ribosomal 5S, y el RNAsn U6 (Bartel, 2004).

En la vía canónica de la biogénesis de los miRNAs, estos son transcritos por la RNA Pol II generando el pri-miRNA (Fig. 8). Los pri-miRNAs pueden ser bastante largos, más de 1 kb y a menudo tienen series internas de residuos de uridina (Annese, *et al.*, 2020; Bartel, 2004; Hammond, 2015).

Posteriormente, un complejo formado por la proteína de unión a RNA de la Región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8) y la endonucleasa Drosha RNase III, reconoce motivos específicos dentro del pri-miARN y escinde ambas hebras del tallo del pri-miRNA, liberando un intermediario de aproximadamente 60 a 70 nt, conocido como precursor del miRNA o pre-miRNA (Fig. 8). Dicha escisión inicial mediada por

Drosha determina el registro correcto de escisión dentro del precursor de miRNA y así define ambos extremos maduros del miRNA posteriormente (Annese, *et al.*, 2020; Bartel, 2004; Hammond, 2015).

Después del paso anterior, el pre-miRNA se transporta activamente desde el núcleo al citoplasma de manera dependiente de Ran-GTPasa mediante Exportina 5 (XPO5) (Annese, *et al.*, 2020; Bartel, 2004).

Ya en el citoplasma, la endonucleasa Dicer, la cual está asociada con la proteína de unión a RNA TRBP, reconoce la porción bicatenaria del pre-miRNA. Una vez que la reconoce, escinde los pares de bases terminales y el bucle del pre-miRNA, dejando un RNA dúplex de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud y posteriormente una hebra de este dúplex será cargada en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) (Fig. 8; Annese, *et al.*, 2020; Bartel, 2004; Hammond, *et al.*, 2015).

La denominación de las hebras está dada en función de su direccionalidad, si es la hebra del extremo 5' se denomina hebra "5p" (miRNA-5p) o hebra "3p" (miRNA-3p) si se origina en el extremo 3'. La hebra que quedará incorporada al RISC es la hebra activa y se denomina hebra guía, hebra conductora o miR* (Annese, *et al.*, 2020; Hammond, 2015).

Algunos miRNAs tienen sitios de escisión heterogéneos, lo que da lugar a múltiples "isomiR" del miRNA maduro, conduciendo a distintas actividades biológicas (Hammond, 2015).

El complejo RISC está formado por varias proteínas, incluyendo a SND1, AEG-1, FMR1, VIG, R2D2 y Armitage-RNA helicasa y una proteína Argonauta, siendo el componente catalítico principal Argonauta 2 (Ago2); este último será el encargado de dejar y/o eliminar una hebra del dúplex (Annese, *et al.*, 2020). Los nucleótidos 2 al 8 del extremo 5' del miRNA forman la "región semilla", que es crucial para el reconocimiento de la región 3' no traducida (3' UTR) del mRNA blanco (Gebert, *et al.*, 2018). La región semilla del miRNA también puede involucrar a los nucleótidos

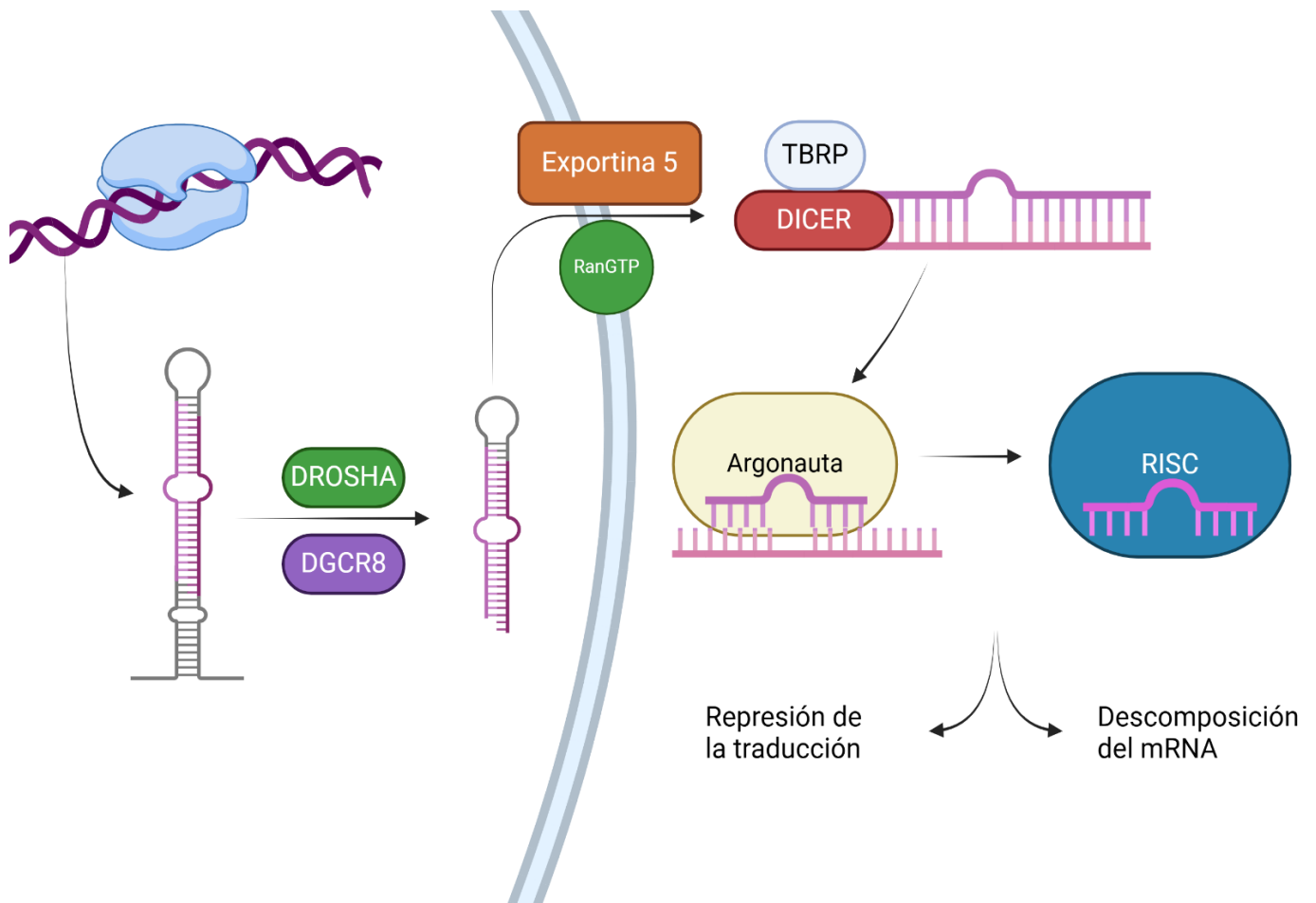


Figura 8. Biogénesis de los miRNAs. Los genes que se transcriben a miRNAs pueden ser no codificantes o estar dentro de intrones o regiones no traducidas (UTR) de genes codificantes. Estos genes producen un RNA precursor de tallo-bucle, que da origen al miRNA maduro. La transcripción de los miRNAs ocurre generalmente por la polimerasa II (Pol II), generando un pri-miRNA largo. Posteriormente, el complejo Drosha-DGCR8 escinde el pri-miRNA, generando un pre-miRNA de 60-70 nucleótidos. Este es transportado al citoplasma por la exportina 5 y es procesado por la endonucleasa Dicer, que lo transforma en un dúplex de aproximadamente 21 nucleótidos. Una de las hebras resultantes, la guía, se incorpora al complejo RISC (miRISC), donde interactúa principalmente con la proteína Argonauta 2 (Ago2), que realiza la degradación del mRNA objetivo o la represión de su traducción. Tomada y modificada de Bartel, 2004.

2-7 y 2-6 (Pabón-Martínez, 2011; Gebert, *et al.*, 2018). La complementariedad que los miRNAs tienen con la región semilla, es el criterio principal para la predicción de sitios objetivos en procesos experimentales (Gebert, *et al.*, 2018).

El complejo RISC unido al miRNA (miRISC) inhibe múltiples pasos de la síntesis de proteínas y afecta la estabilidad del mRNA diana por complementariedad de nucleótidos. Esto lo hace evitando la traducción del mRNA diana mediante la represión traduccional o mediante la degradación de proteínas (Annese, *et al.*, 2020; Pelletier, *et al.*, 2023).

La inhibición de la traducción se debe a la interferencia con la función de los factores de iniciación eucariotas 4A-I (eIF4A-I) y eIF4A-II. Se han sugerido múltiples mecanismos de inhibición de la traducción, pero la mayoría de los datos indican que el complejo miRISC induce la disociación de eIF4A-I y eIF4A-II de los mRNAs dianas, inhibiendo así el escaneo de ribosomas y el ensamblaje del complejo de iniciación de traducción eIF4F (Hammond, 2015; Pabón-Martínez, 2011; Gebert, *et al.*, 2018).

Por otro lado, la descomposición del mRNA implica el reclutamiento de GW182 por parte de AGO. GW182 interactúa con la proteína de unión a poliadenilato (PABPC), promoviendo así la deadenilación del mRNA mediante el reclutamiento de los complejos PAN2-PAN3 y CCR4-NOT (Hammond, 2015; Pabón-Martínez, 2011).

2.4 CircRNAs

En 1976, Sanger y cols. identificaron moléculas de RNA circular monocatenario en viroides, clasificándolas como una “rareza molecular”. Unos años más tarde, Hsu et al. descubrieron estructuras de RNA circular similares en ciertos virus, aunque inicialmente no prosiguieron con la investigación sobre estas estructuras debido a que se centraron principalmente en el RNA lineal. En consecuencia, los primeros conocimientos sobre los circRNAs a partir de fuentes endógenas no se obtuvieron hasta 1991 cuando los científicos observaron “exones desordenados” de genes específicos, sugiriendo que dichas estructuras surgieron de eventos de empalme no estándar. En 1993, los investigadores habían aclarado que dichas transcripciones eran de hecho RNAs circulares, que mostraban estabilidad, principalmente en el

citoplasma, incluso después del cultivo de las células durante un tiempo prolongado (Patop, *et al.*, 2019).

Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación y métodos de detección de RNA, en la década de 2010 se descubrió que las estructuras de circRNAs estaban altamente conservadas y presentes en diferentes especies y que podían desempeñar papeles funcionales más allá de ser solamente subproductos. Los descubrimientos incluyeron casos notables en los que los circRNAs se unen a microRNAs (por ejemplo, CDR1as), lo que sugiere una posible función reguladora de la expresión génica (Patop, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024; Yu, *et al.*, 2021). Con las investigaciones desarrolladas con el paso del tiempo se ha visto que los circRNAs tienen funciones específicas en diversos procesos celulares (Patop, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024).

2.4.1 Biogénesis de los circRNAs

Los circRNAs son RNAs circulares generados mediante un proceso de *backsplicing* (o empalme inverso). A diferencia del empalme lineal canónico, que une un sitio de empalme 5' donante con un sitio 3' aceptor de exones contiguos para producir un RNAm lineal, el *backsplicing* une covalentemente un sitio de empalme 5' cadena arriba a un sitio 3' cadena abajo del mRNA, mediante un enlace fosfodiéster 3'-5', formando una estructura cerrada estable. (Benítez, *et al.*, 2024; Patop, *et al.*, 2019; Kristensen, *et al.*, 2019).

En el splicing lineal, la maquinaria de empalme une exones contiguos mediante la escisión de intrones individuales, generando un mRNA lineal con su cap 5' y cola de poli-A. En cambio, en el *backsplicing* se inicia con el apareamiento de las secuencias complementarias invertidas (RCMs por sus siglas en inglés “Reverse Complementary Matched sequence”) y eso hace que se doble la molécula de RNA para acercar físicamente el sitio donador 5' del intrón cadena abajo con el sitio

aceptor 3' del intrón cadena arriba, lo que permite que la adenosina del punto de ramificación (BPA) ataque de manera inversa el sitio 5' distante, catalizando la reacción de *backsplicing* y eso resulta en la formación de un circRNA sin cola de poli-A (Ni L, *et al.*, 2024).

Este mecanismo de ciclización puede ser impulsado por diferentes fuerzas moleculares como el apareamiento de intrones flanqueantes con elementos complementarios inversos, como las repeticiones ALU; este apareamiento forma una estructura de horquilla mediante hibridación que acerca espacialmente los sitios de empalme y permite la formación de circRNAs que retienen intrones (ElciRNAs) o solo exones (EcircRNAs). También podrían intervenir proteínas de unión a RNA (RBPs) como QKI o MBL, las cuales reconocen secuencias específicas en los intrones y actúan como andamios moleculares para aproximar los exones distantes, facilitando el *backsplicing*. O bien, se puede realizar la formación de bucles intrónicos, donde secuencias ricas en guanina-uracilo (GU) cerca de un exón y citosina (C) cerca de otro favorecen la formación de un bucle que acerca los sitios de empalme donante y aceptor, facilitando la circularización (Fig. 9) (Benítez, *et al.*, 2024; Li C. *et al.*, 2021; Li J. *et al.*, 2023; Li X, Yang L, *et al.*, 2018).

Una vez transcritos, estos circRNAs adoptan diversas localizaciones dentro de la célula: algunos permanecen en el núcleo regulando la transcripción, otros migran al citoplasma para modular miRNAs o incluso se exportan al espacio extracelular a través de exosomas, donde participan en la comunicación intercelular (Benítez, *et al.*, 2024; Li C. *et al.*, 2021).

Es importante mencionar que estos circRNAs al no contar con colas de poli A son resistentes a la degradación por exonucleasas (Patop, *et al.*, 2019; Kristensen, *et al.*, 2019) y por tanto son más estables que los RNA mensajeros.

Según su composición, los circRNAs se clasifican en: circRNAs exónicos (EcircRNAs), localizados principalmente en el citoplasma; circRNAs intrónicos (ciRNAs), que permanecen en el núcleo; y circRNAs exón-intrón (ElciRNAs), también nucleares. Su localización depende del gen parental (intragénico o

intergénico) y de su estructura, lo que determina su participación en procesos como la regulación transcripcional, la interacción con miRNAs o la comunicación intercelular mediante exosomas (Benítez, *et al.*, 2024; Li C. *et al.*, 2021; Li J. *et al.*, 2023; Li X, Yang L, *et al.*, 2018)

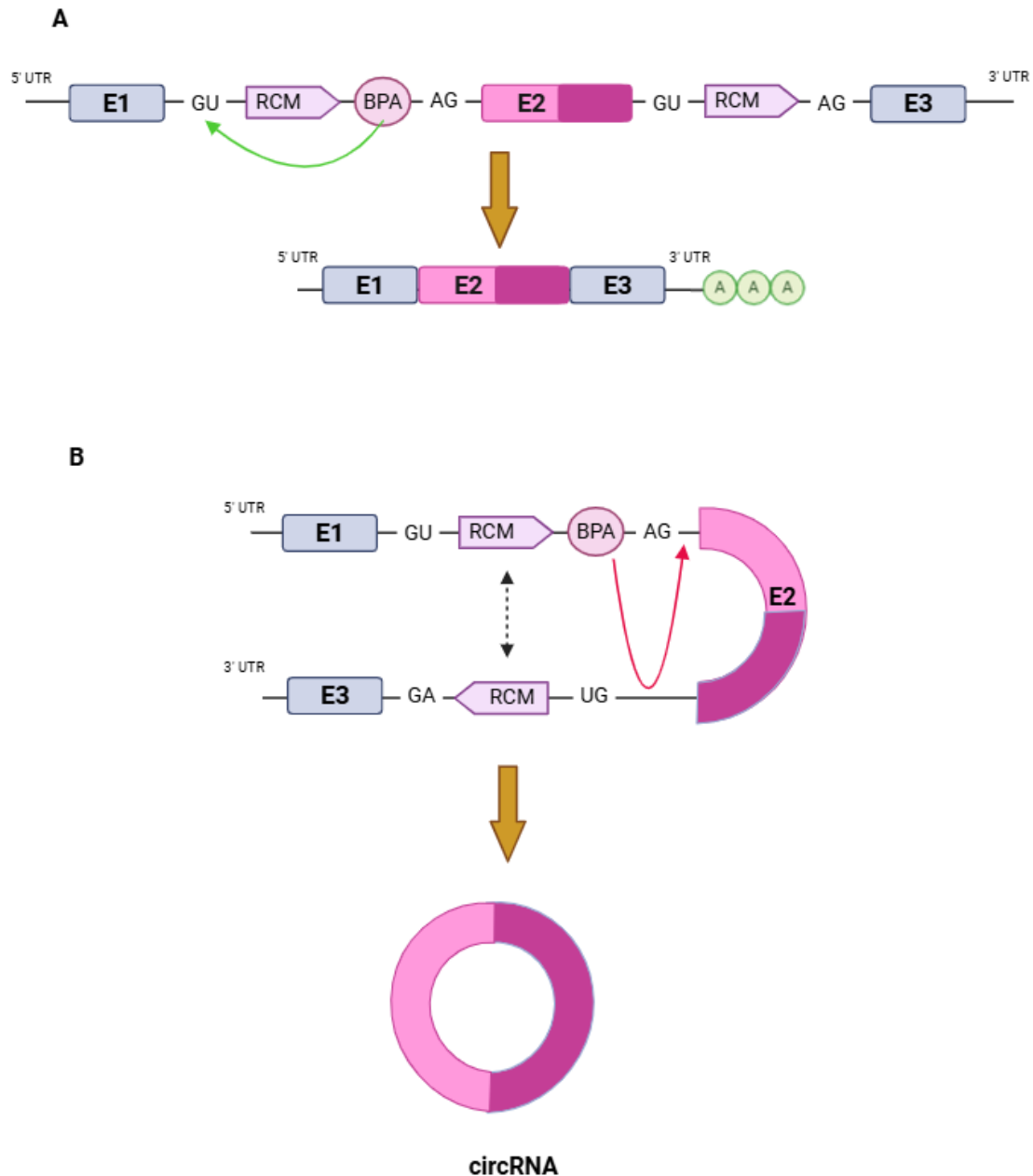


Figura 9. Proceso de Splicing Canónico y Backsplicing. A: Se muestra el transcrito primario de RNA, los exones (E1, E2 y E3) y los intrones (línea negra). Los sitios de empalme y el punto de ramificación (BPA) se indican en rosa. La flecha verde ilustra el splicing canónico, donde el grupo 2'-OH del BPA ataca el fosfodiéster del 5'ss de su propio intrón, resultando en la unión de exones consecutivos y un mRNA lineal maduro con su cola de poli-A. **B:** El transcrito primario contiene RCMs con flechas lilas en los intrones flanqueantes. Estos RCMs se aparean (línea punteada) y eso dobla la molécula, lo que acerca el sitio de empalme 5'ss del intrón

cadena abajo al BPA del intrón cadena arriba, resultando en la unión directa de los extremos del exón central (representado en dos tonos de rosa para destacar su circularización), lo cual resulta en un circRNA maduro que carece de cap 5' y cola de poli A. Imagen tomada y modificada de Ni, *et al.*, 2024

2.4.2 Funciones de los circRNAs

Los circRNAs son moléculas multifuncionales con roles críticos en la regulación génica y procesos patológicos. Algunos de ellos tienen capacidad para exportarse desde el núcleo hacia compartimentos celulares específicos, lo que les permite participar en la modulación de la síntesis proteica y la regulación génica (Patop, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024).

Estas moléculas ejercen su función a través de diversos mecanismos, uno de ellos es que actúan como esponjas de miRNAs. Varios estudios han demostrado que los circRNAs pueden competir con los mRNAs por la unión a los miRNAs ubicados en el citoplasma, regulando así la expresión de los mRNAs. Una vez que los circRNAs se unen a los miRNAs se reduce su disponibilidad y se sugiere que esto protege a los mRNAs diana de la degradación. Esto aumenta la traducción de los mRNAs, ya que los ribosomas pueden unirse más activamente a estos (Kristensen, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024). Dicha función de esponja se ha estudiado en trastornos neuropsiquiátricos, cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Kristensen, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024).

Otras funciones que tienen los circRNAs es que pueden interactuar con proteínas de unión a RNA (RBPs), formando complejos que regulan procesos como el empalme alternativo, la estabilización del RNA y la regulación transcripcional como en el caso de

circAmotl1, que facilita la fosforilación de AKT1 en cardiomiocitos (Kristensen, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024).

También, algunos circRNAs pueden iniciar la traducción de proteínas de forma independiente, traduciendo péptidos funcionales mediante sitios de entrada ribosómica interna (IRES), particularmente bajo condiciones de estrés o durante procesos de desarrollo y diferenciación celular. Esta traducción no canónica contribuye a la diversidad proteica y a respuestas celulares adaptativas (Kristensen, *et al.*, 2019; Zhou W. *et al.*, 2020).

Además, los circRNAs funcionan como plataformas moleculares que reclutan factores epigenéticos, como el circRNA FECR1 que dirige la enzima TET1 (ten-eleven translocation 1) a regiones promotoras específicas, induciendo desmetilación del DNA y activación transcripcional (Kristensen, *et al.*, 2019).

Por otra parte, ciertos circRNAs modulan respuestas antivirales mediante interacciones con proteínas como NF90/NF110 (factor nuclear 90 y su isoforma 110). Estas proteínas, codificadas por el gen ILF3, tienen un papel dual: en el núcleo, promueven la producción de circRNAs, y en el citoplasma, tras una infección viral, se liberan de los circRNAs para unirse al RNA viral e inhibir su replicación (Kristensen, *et al.*, 2019). Los circRNAs se han visto implicados en diversas enfermedades, como diversos trastornos neurológicos, cáncer, patologías cardiovasculares, diabetes y sus complicaciones (Ashwall-Fluss, *et al.*, 2014; Patop, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2024).

2.5 La intersección: circRNA, miRNA y proteínas desreguladas en la ND

Como ya fue explicado, durante la hiperglicemia en el curso de la DM se incrementa la formación y acumulación de AGEs que al unirse a RAGE activan vías proinflamatorias y profibróticas, así como también ocurre un desequilibrio entre la síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC), lo que lleva a la fibrosis glomerular y el estrés oxidativo observado en la ND (Benítez, *et al.*, 2024).

Se ha reportado que los RNAs no codificantes como circRNAs y miRNAs pueden modular la expresión de proteínas en diferentes enfermedades, incluida la ND, constituyendo ejes importantes de regulación (Kawaguchi, *et al.*, 2023; Sakshi, *et al.*, 2021). En particular, en la ND la interacción entre circRNAs, miRNAs y mRNAs de genes que codifican proteínas, que participan en el proceso fisiopatológico de la enfermedad, modula procesos críticos como la hipertrofia celular, la inflamación, la fibrosis y el estrés oxidativo. Estos ejes de regulación no son independientes, sino que forman redes entrelazadas que amplifican el daño renal (Sakshi, *et al.*, 2021).

Diferentes estudios han identificado 35 circRNAs desregulados en la ND, la mayoría sobreexpresados, como el circRNA_ACTR2 y circRNA_0037128, que actúan como esponjas de miRNAs (Tabla 1). Por ejemplo, el circRNA_ACTR2 secuestra el miR-205-5p, aumentando la expresión de HMGA2, un regulador de la vía AGE-RAGE, lo que promueve el estrés oxidativo y la fibrosis. Por otro lado, el circRNA_0037128 regula el miR-17-3p, elevando los niveles de AKT3, una quinasa asociada a fibrosis, y citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-6. En contraste, el circRNA_AKT3 está subexpresado en la ND, y su sobreexpresión inhibe la apoptosis y la acumulación de MEC a través de la vía miR-296-3p/E-cadherina. Otros circRNAs, como circRNA_LRP6 y circRNA_0000491, modulan vías como las de TGF- β 1 y p38 MAPK, vinculadas a inflamación y a la transición epitelio-mesenquimal (Benítez, *et al.*, 2024; Zhou, *et al.*, 2020).

Aunque menos explorados, algunos circRNAs interactúan directamente con proteínas en la ND. Por ejemplo, el circRNA_HIPK3 se une a FUS, promoviendo la apoptosis de podocitos mediante la activación de EDA2R. En otros contextos diabéticos, como en la diabetes tipo 1 y tipo 2, el circRNA_Amotl1 y el circRNA_ci-Ins2 regulan la supervivencia celular y la secreción de insulina a través de interacciones con AKT1 y TDP-43, respectivamente (Benítez, *et al.*, 2024).

Así mismo, se ha propuesto el potencial de los ejes circRNA-miRNA-mRNA, como circRNA/miR-205/HMGA2, como dianas terapéuticas para modular procesos clave en la ND, como la fibrosis, la inflamación y el estrés oxidativo.

Tabla 1. Ejemplos de ejes de regulación circRNAs/miRNAs que modulan proteínas desreguladas en ND				
circRNA	miRNA	Proteína desregulada	Efecto en ND	Referencia
circRNA_0037128	miR-17-3p	AKT3	Fibrosis, inflamación. ↑ TNF- α , IL-6	Wang, <i>et al.</i> , 2021
circRNA_HIPK3	miR-326	FUS/EDA2R	Apoptosis de podocitos	Liu F, <i>et al.</i> , 2022
circRNA_0003928	miR-506-3p	HDAC4	Activación mTOR, Hipertrofia	Liu Q, <i>et al.</i> , 2022
circRNA_ACTR2	miR-205-5p	HMGA2	↑TGF- β 1 y colágeno, fibrosis	Yun, <i>et al.</i> , 2021
circRNA_AKT3	miR-296-3p	E-cadherina	Protege contra ROS	Tang, <i>et al.</i> , 2020

3. Justificación

La diabetes es una enfermedad considerada como una de las emergencias sanitarias mundiales de más rápido crecimiento del siglo XXI. Esto es alarmante, ya que sus complicaciones reducen la calidad y esperanza de vida de los individuos. Dentro de dichas complicaciones destaca la nefropatía diabética, ya que no sólo es una de las más frecuentes, sino que es considerada una de las principales causas de muerte de los pacientes diabéticos

Comprender el rol de la interacción circRNA-miRNA en la regulación de las proteínas que intervienen en la nefropatía diabética podría ampliar la oportunidad de desarrollar mejores enfoques terapéuticos e identificar biomarcadores para el diagnóstico de esta patología.

4. Hipótesis

La interacción circRNA-miRNA-mRNA modula la expresión de proteínas involucradas en el proceso fisiopatológico de la nefropatía diabética.

5. Objetivos

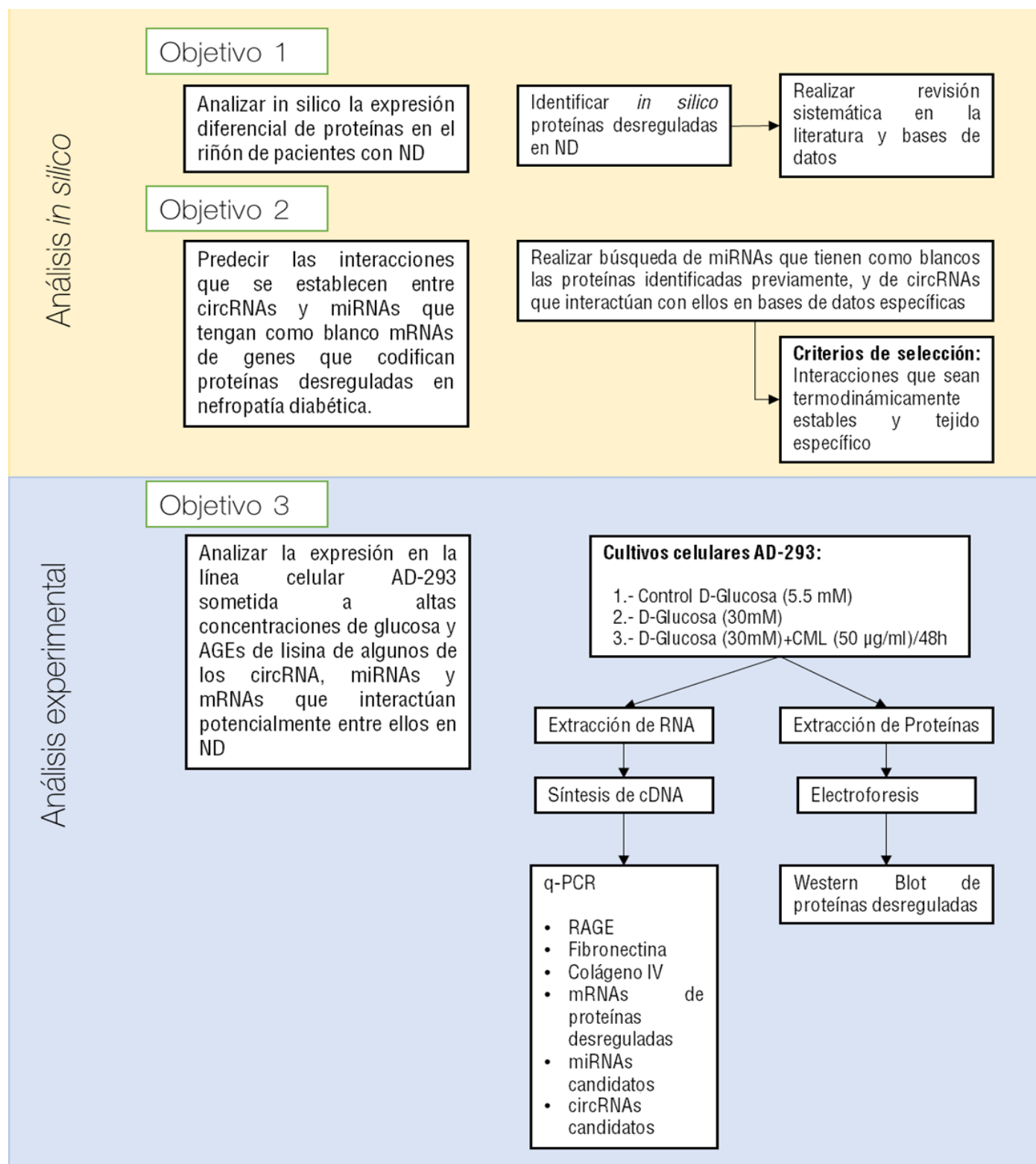
5.1 Objetivo General

Establecer una red de interacciones potenciales circRNA-miRNA-mRNA de genes que codifican proteínas implicadas en el proceso fisiopatológico de la nefropatía diabética.

5.2 Objetivos Específicos

- Analizar *in silico* la expresión diferencial de proteínas en el riñón de pacientes con nefropatía diabética.
- Predecir las interacciones que se establecen entre circRNAs y miRNAs que tengan como blanco mRNAs de genes que codifican proteínas desreguladas en nefropatía diabética.
- Analizar la expresión de algunos de los circRNAs, miRNAs y mRNAs que interactúan potencialmente entre ellos, en la línea celular AD293 sometida a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina.
- Determinar la abundancia de algunas de las proteínas desreguladas en nefropatía diabética en la línea celular AD293 sometida a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina.

6. Estrategia Experimental



7. Metodología

Análisis *in silico* de la expresión diferencial de proteínas en el riñón de pacientes con ND

Se realizó una búsqueda sistemática de la bibliografía publicada sobre las proteínas desreguladas en ND. Las búsquedas se realizaron en las bases de datos Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), SpringerLink (<https://link.springer.com>) y ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>) y el criterio de búsqueda fueron las palabras claves: “Diabetic nephropathy and Gene expresión”, “Diabetic Nephropathy and Deregulated proteins”, y “Diabetes Nephropathy and Rage Pathway”.

Se eliminó la bibliografía redundante y se seleccionaron aquellos artículos que brindaran información sobre las proteínas desreguladas utilizando los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Información sobre genes/proteínas diferencialmente expresadas en la ND
- Proteínas desreguladas en tejido renal humano
- Estudios realizados en individuos ≥ 18 años
- Estudios realizados en pacientes que cursen con ND como consecuencia de DM (DM1 o DM2)

Criterios de exclusión:

- Estudios duplicados o redundantes identificados a través de las diferentes bases de datos consultadas
- Investigación realizada en modelos animales o *in vitro*
- Artículos publicados en idiomas diferentes al inglés o al español.

Asimismo, se buscaron datos de expresión génica que estuvieran relacionados con la ND en la base de datos Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) usando como palabras clave “Diabetic

Nephropathy and human and gene expression”; y en la base de datos NextProt, usando como palabras clave: “Proteins associated with diabetic nephropathy”.

Al grupo de proteínas identificadas se les realizó un análisis ontológico en el servidor Panther (<https://pantherdb.org/>) para determinar qué funciones moleculares estaban enriquecidas en ese grupo, así como los componentes celulares donde se encontraban y los procesos biológicos en que participaban. Se analizó también, en cuáles de los procesos que ocurren en la ND podrían participar las proteínas identificadas.

Predicción de los miRNAs que tienen como blanco mRNAs de genes que codifican proteínas desreguladas en nefropatía diabética

Una vez identificadas algunas de las proteínas desreguladas en nefropatía diabética se buscaron en las bases de datos miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/search.php), miRDB (<http://www.mirdb.org>) y TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) los miRNAs que tenían como blanco los mRNA de los genes que codifican a dichas proteínas identificadas. Se verificó la energía libre mínima de las interacciones y la energía libre de unión en los servidores RNAup (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAup.cgi>) y RNAhybrid (https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission) Se seleccionaron para la construcción de la red de interacción aquellos miRNAs que tuvieran como blancos predichos los mRNA de interés en al menos dos bases de datos, que presentaran sitios de interacción canónicos (8mer, 7mer-m8 y 7mer-A1), que la energía libre mínima de las interacciones y la energía libre de unión fuera menor a -10 kcal/mol, y a -4 kcal/mol, respectivamente, que se expresaran en tejido renal y que tuvieran un ‘context score percentil’ mayor a 93, 90 y 60, en las bases de datos TargetScan, miRTarBase y miRDB, respectivamente.

Por último, se verificó mediante el análisis de la base de datos Tarbase v8 (https://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) si las interacciones identificadas habían sido validadas experimentalmente.

Predicción de los circRNAs capaces de interactuar con los miRNAs que tengan como blanco mRNAs de genes que codifican proteínas desreguladas en nefropatía diabética

A continuación, se buscaron en las bases de datos CircBase (<http://www.circbase.org>), CircBank (<http://www.circbank.cn>), CircPedia_v2 (<https://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia>) y CircAtlas (<https://ngdc.cncb.ac.cn/circatlas/>) los circRNAs que tuvieran como blanco los miRNAs que a su vez tenían como blanco las proteínas desreguladas que fueron seleccionadas para continuar el estudio.

La expresión en células renales, en condiciones fisiológicas y en ND, de las proteínas blanco y de los pares circRNA/miRNA identificados se analizó utilizando los servidores The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), Human miRNATissue Atlas (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas2/>) y circAtlas(https://ngdc.cncb.ac.cn/circatlas/search_s.php).

Las redes de interacción entre los miRNAs-mRNAs y circRNA-miRNA-mRNA se construyeron utilizando el software Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), al cual se le proporcionaron, como datos de entrada, los pares de circRNA-miRNA y miRNA-mRNA que interactúan de acuerdo con los resultados de las predicciones realizadas.

Análisis de la expresión, en la línea celular AD293 sometida a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina, de algunos de los circRNAs, miRNAs y mRNAs que interactúan potencialmente entre ellos en la nefropatía diabética

Para determinar la expresión de algunas de las moléculas predichas, se cultivaron células de la línea AD293, las cuales son células embrionarias de riñón humano derivadas de la línea HEK293.

Mantenimiento celular

Las células AD293 se sembraron en cajas de cultivo celular T-25 con 5 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), bajo en glucosa (5.5 mM), con L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 44 mM, suplementado con 10% [v/v] de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

Cuando las células confluyeron, se sembraron en cajas de cultivo celular más grandes (T-75) para su posterior propagación. Posteriormente, las células AD293 se pasaron a placas de 6 pocillos a una densidad de 10⁵ células por pozo y se cultivaron en las mismas condiciones antes descritas. Al alcanzar aproximadamente el 80-90% de confluencia, el medio de cultivo se aspiró cuidadosamente y luego, las células se lavaron con PBS IX para asegurar la eliminación completa del medio. Posteriormente, se añadió a las células medio fresco libre de suero y se incubó por 16h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Tratamientos con glucosa y AGEs de lisina (CML)

Las células se sometieron a tres tratamientos diferentes, en medio D-MEM suplementado con 1% de suero fetal, durante 2, 24 y 48h de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%:

- 1.- Control D-Glucosa (5.5 mM)
- 2.- D-Glucosa (30mM)
- 3.- D-Glucosa (30 mM) + CML (CarboxiMetil-Lisina, 50µg/mL)

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total de dichas células se utilizó el tratamiento con Trizol de acuerdo con lo descrito (Pahlevan, 2014). Específicamente, a cada pozo se le añadió 1 mL de Trizol, se homogenizó el lisado celular mediante pipeteo y finalmente se colectó en viales de 1.5 mL. Posteriormente, el lisado celular se incubó por 5 minutos para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. A continuación, se añadió 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol y se incubó por 2-3 minutos. Una vez terminado este periodo de tiempo las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 12, 000 g a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se añadió 500 µL de isopropanol y se incubó durante 10 minutos. El RNA precipitado se colectó por centrifugación durante 10 minutos a 12,000 g a 4°C y se lavó con etanol al 75%. Después de eliminado el etanol al 75% la muestra de RNA se dejó secar al aire por 10-15 minutos y se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNAsas.

El RNA resultante se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Del mismo modo se verificó su pureza midiendo las relaciones de absorbancia a 230 y 280 nM para descartar una posible contaminación por compuestos orgánicos y proteínas, respectivamente. Así mismo se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X.

Extracción de Proteínas

Para la extracción de proteínas se empleó un protocolo que utiliza tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA; Tritón X-100 1%, Desoxicolato de sodio

1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Tris-HCL pH 7.4 10 mM; PMSF 1 mM). Para ello, las células cultivadas en las diferentes condiciones ensayadas se lisaron con buffer de lisis que contenía SDS 2% (v/v) e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Previamente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos tres veces con PBS 1x frío. Posteriormente, se añadió el buffer de lisis (Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), SDS 2%, glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (cóctel Complete 1X, Roche), inhibidores de fosfatasa (cóctel PhosSTOP 1X, Roche), y los inhibidores específicos NaF (25 mM) y ortovanadato de sodio (1 mM). El proceso de lisado se realizó manteniendo todo el tiempo la placa sobre hielo.

A continuación, las células se rasparon con una espátula y el lisado se recolectó en tubos eppendorf. Posteriormente, para asegurar la lisis completa, las muestras se sonicaron 3 veces a una amplitud de 40% por 10 segundos. Todo el tiempo las muestras se mantuvieron en hielo para evitar calentamiento de las mismas.

Por último, el lisado de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) para lo cual se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), con el fin de garantizar una determinación precisa de la concentración de proteínas para los análisis posteriores.

Tratamiento con DNasa

Posterior a la extracción del RNA, el RNA total se trató con DNasa (Promega) para eliminar cualquier contaminación por DNA genómico, siguiendo las indicaciones del fabricante. Entonces, se preparó una mezcla que contenía 8 μ L de RNA, 1 μ L de Buffer RQ1 10x, 1 μ L de DNasa RQ1 (1 U/ μ L) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 10 μ L. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para inactivar la enzima, se añadió 1 μ L de solución RQ1 Stop Solution y se incubó a 65 °C durante 10 minutos más. Posteriormente el RNA tratado se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Síntesis de cDNA para medir la expresión de mRNAs y circRNAs

La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific, USA). Para cada reacción, se utilizaron 500 ng de RNA tratado con DNasa. En un tubo, se mezcló el RNA con 2 μ L de random primers (50 μ M), 4 μ L de dNTPs (10 mM) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 24 μ L, se incubó a 65 °C durante 5 minutos y se colocó en hielo para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNAm. Luego se dividió la mezcla en dos alícuotas de 12 μ L cada una: una para la reacción de transcripción reversa (RT+) y otra para el control negativo sin transcriptasa reversa (RT-). A cada alícuota de 12 μ L se le añadieron:

4 μ L de Buffer 5x para síntesis de cDNA.

1 μ L de DTT (0.1 M).

1 μ L de inhibidor de RNAsa (40 U/ μ L).

Posteriormente, se añadió a la muestra RT+ 1 μ L de la enzima SuperScript IV (200 U/ μ L), y a la muestra RT- se añadieron 2 μ L de agua libre de nucleasas para equilibrar los volúmenes. El programa de incubación fue: 25 °C durante 10 minutos, 50 °C durante 50 minutos y se inactivó la enzima a 85 °C durante 5 minutos. El cDNA sintetizado se almacenó a -20 °C.

Síntesis de cDNA para medir la expresión de miRNAs

Para evaluar la expresión de miRNAs, se sintetizó cDNA a partir del RNA total utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diseño de los oligonucleótidos

Para los genes *AGER*, *Fibronectina 1* y *GAPDH* (control endógeno), se utilizaron los pares de oligonucleótidos previamente diseñados y validados en el laboratorio (Pérez, 2022). Para el resto de los genes diana y los circRNAs seleccionados en el análisis *in silico*, se diseñaron los oligonucleótidos para su amplificación mediante qRT-PCR (Tabla 2). Para la amplificación del miRNA, se utilizaron las sondas específicas recomendadas por el fabricante en el kit TaqMan (Assay ID 001973, Thermo Fisher Scientific), y como control endógeno se utilizó el RNAsn U6.

Diseño de oligonucleótidos divergentes

Para el diseño de los primers de los circRNAs seleccionados se usó la base de datos CircInteractome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) para identificar las secuencias maduras de los circRNAs candidatos. La construcción de la plantilla del amplicón de PCR se realizó uniendo el extremo 3' de los últimos 100 nucleótidos de la secuencia del circRNA con el extremo 5' de los primeros 100 nucleótidos.

El diseño de estos primers se realizó mediante la utilización del servidor Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), asegurando que los primers de PCR flanquean la región de unión de los extremos 3' y 5' del transcrito maduro del circRNA (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para qRT-PCR		
Gen/circRNA	SECUENCIA 5' A 3' F	SECUENCIA 5' A 3' R
<i>JAK2</i>	CCGATCTGTGTAGCCGGTTT	GTAAGGCAGGCCATTCCCAT
<i>STAT3</i>	ATTCTGGCTTCCTTCCTGCC	GCTGAGGCAAGGTGGTTTTG
<i>GAPDH</i>	ACAGTCAGCCGCATCTTC	CCAATACGACCAAATCCGTTG

<i>FN1</i>	CTGGCCAGTCCTACAACCAG	CATGAAGCACTCAATTGGGCA
<i>AGER</i>	GCCACTGGTGCTGAAGTGTA	GGAGACAGGACCTTCCAAGC
<i>COLÁGENO IV</i>	TTCTGGCTCACAACGGTGAA	CTGATTTTCTGGCGTTGGGC
hsa_circ_0014186	GGCAGTCGATGATGTGAAGA	ACGTGGTTCCATGACCATT
hsa_circ_0001392	AGCTGTTCCCAAATTATGGC TT	TCACACGGTCTTTCTTGGTAG C
hsa_circ_0004576	GCAGAAATTCGAGTACGAGAT GC	ACATAAGGATCTGAAAGCCCG T
hsa_circ_0032969	AAGGTTCCAACGATCTGCCA	TAGGTCCGTGCTGGGATGAA
hsa_circ_0078465	CTCTCGTGCAGGTGAGTGAT	AGACCCAACCAGGACAAACC
hsa_circ_0002568	GAGGGCAGTCACAATTCAACG	CTTGAATGCTTGCCATACTGG A
hsa_circ_0039350	GATGCTGATGAAGCCAACAGA	TGTGGCTCTGATCCTCACTGG
hsa_circ_0036032	ACTCTTGGTCATGGCAACGG	TCCCGATATCGTATGTCTTGTT CA
hsa_circ_0085076	TATTGGAAGTGCCCCCTTGG	AAGTACAGCACCTGTTACCGT

RT-PCR cuantitativa

Para realizar la RT-PCR cuantitativa de los circRNAs y genes seleccionados, se utilizó 100 ng del cDNA del blanco correspondiente y se amplificó con 5 µL de SYBR-Green PCR MasterMix (ThermoFischer Scientific), 1 µL de oligonucleótidos a una concentración de 1 µM y agua grado PCR cbp 10 µL. La reacción de PCR se realizó en un Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Se incubó la mezcla de reacción a 95°C por 10 minutos, luego se aplicaron 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C por 30 segundos.

Para analizar la expresión del miRNA seleccionado en el análisis *in silico* se utilizó el ensayo TaqMan MicroRNA (Applied Biosystem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control se incluyó en cada

ensayo de cada gen, circRNA o miRNA blanco y condición experimental diferente una reacción RT-.

Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Se fraccionaron 25 µg del extracto totales de proteínas mediante SDS-PAGE en un sistema discontinuo donde el gel separador (pH 8.8) tenía una concentración del 8-12 %, en dependencia de tamaño de las proteínas a analizar y el gel concentrador del 5% (pH 6.7), utilizando buffer Tris-Glicina pH 8.3 y aplicando 110 V durante 2h. Los patrones en el gel se visualizaron mediante tinción con Azul de Coomasie. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador Dual Color (Bio-Rad). Para la realización de los experimentos de Western blot los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando 350 mA durante 90min en buffer de transferencia, la cual posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5 % en PBS 1X. A continuación, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios contra tubulina (1:5000), RAGE (1:1000, sc-365154), y contra la proteína seleccionada en los análisis *in silico*, durante toda la noche a 4°C, seguido por la incubación por 2h con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (m-IgG BP-HRP: sc-525409). Para revelar la señal se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y la detección de la misma se realizó en el equipo ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System.

Análisis estadístico

Para la estimación de la cantidad inicial de mRNA de los ensayos de RT-PCR, el ajuste de la curva de regresión de la región lineal del logaritmo de los datos de fluorescencia vs el número de ciclos de amplificación se realizó mediante el método de los mínimos cuadrados seleccionando la recta de menor error residual y mejor ajuste al modelo, y la cantidad inicial de cDNA se calculó como $10^{\text{intercepto}}$. Se normalizaron los datos contra la cantidad inicial de moléculas de GAPDH o U6 en cada caso correspondiente y se calculó la expresión relativa de cada gen estudiado

en cada condición experimental con respecto a la condición control. Los datos se mostraron como media y error estándar. Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Brown-Forsythe. La comparación de los grupos de datos se realizó mediante las pruebas de ANOVA de una vía o Kruskal Wallis, según correspondiera. Para realizar las comparaciones múltiples se utilizó la corrección de Benjamini, Krieger y Yekutieli para controlar el “false Discovery rate”. Para comparar si existía diferencia entre la expresión de cada gen estudiado en cada condición de tratamiento analizada se comparó la media de la expresión contra 1 mediante una prueba de T de Student para una sola muestra. Todos los análisis se realizaron a un nivel de significación de 0.05. Para la realización de estos análisis se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.

8. Resultados

8.1 Identificación de proteínas desreguladas en ND

Se realizó una búsqueda sistemática de la bibliografía publicada sobre las proteínas desreguladas en la ND. Las bases de datos que se usaron fueron Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), SpringerLink (<https://link.springer.com>) y ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>) con las palabras claves: “Diabetic nephropathy and Gene expresión”, “Diabetic Nephropathy and Deregulated proteins”, y “Diabetes Nephropathy and Rage Pathway”. Asimismo, se buscaron datos de expresión génica que estuvieran relacionados con la ND en la base de datos Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) usando como palabras claves “Diabetic Nephropathy and Human Gene Expression”; y en la base de datos NextProt, usando como palabras clave: “Proteins associated with diabetic nephropathy” (Fig. 10).

La búsqueda identificó un total de 5784 registros, de los cuales el 86.5% correspondía a revistas científicas. Se eliminó la bibliografía duplicada, la que contenía información redundante, la no accesible o en idiomas diferentes al inglés o el español y se seleccionaron aquellos artículos que brindaran información sobre las proteínas desreguladas en ND siguiendo las recomendaciones de las guías Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Urrutia & Bonfill, 2010) (Fig. 10). Después de dicho análisis se recuperaron 39 registros que cumplían con los criterios de elegibilidad (inclusión) de interés definidos en este trabajo. Como resultado, se identificaron 59 proteínas desreguladas a nivel renal en la ND.

El análisis de ontología génica (Go) y de enriquecimiento de las vías biológicas de los genes que codifican a las 59 proteínas, realizado en PANTHER, reveló que las proteínas identificadas se agrupaban mayoritariamente en la *“vía de señalización AGE-RAGE en las complicaciones diabéticas”* (Fig. 11), lo que validó el modelo

celular que se propone en este trabajo (línea celular de células renales tratadas con altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina) para realizar las comprobaciones experimentales de las predicciones obtenidas *in silico*.

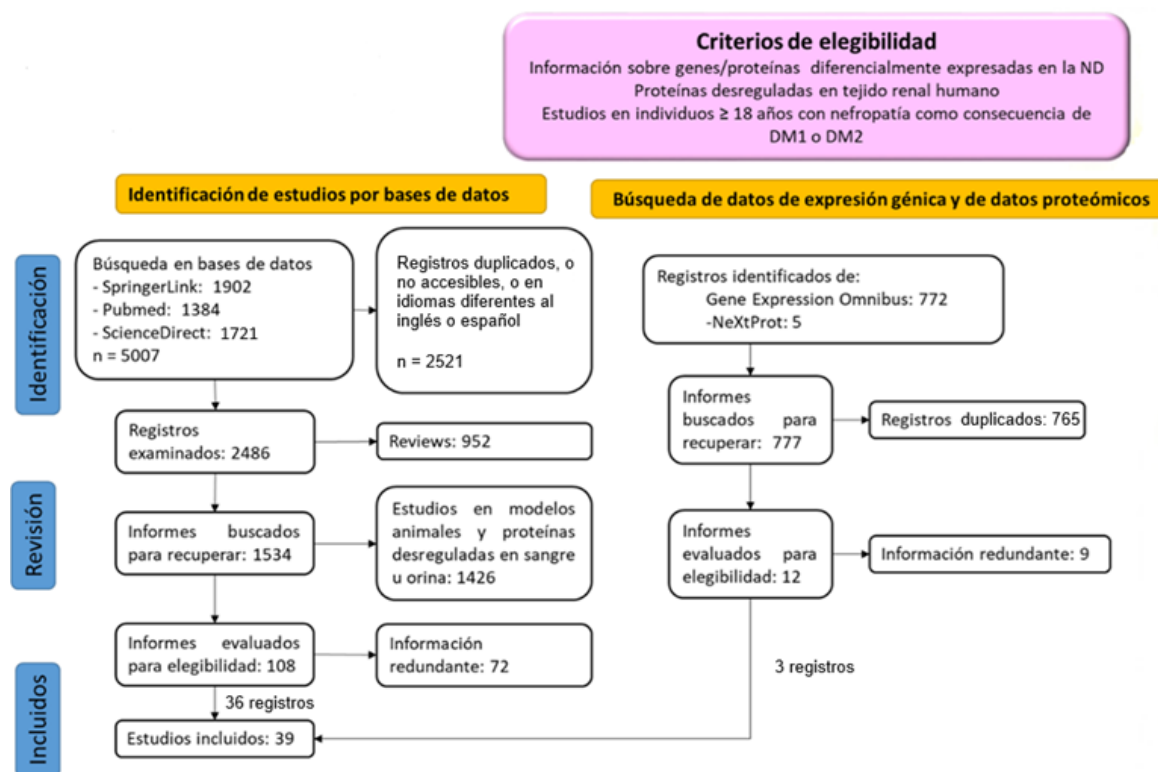


Figura 10. Diagrama del proceso de selección de proteínas desreguladas en nefropatía diabética.

Se encontró que los procesos biológicos en los que participan más frecuentemente las 59 proteínas fueron la unión a filamentos de queratina, la autofagia selectiva y de mitocondrias, y la formación de MEC conteniendo colágeno (Fig. 12). Los componentes celulares donde están enriquecidas las 59 proteínas fueron regiones de unión a proteasas, de regulación positiva de los procesos biosintéticos de macromoléculas y de organización de la MEC. Por último, se predijo que las funciones moleculares de las proteínas seleccionadas están relacionadas con la unión a estructura secundaria del DNA, regulación de la migración celular y unión a proteínas cinasas, entre otras (Fig. 12).

Por otra parte, al analizar en cuáles de los procesos que ocurren en la ND (inflamación, fibrosis e hipertrofia; Zhang, *et al.*, 2025) podrían participar las proteínas identificadas se encontró que 12 de ellas participaban solamente en el proceso inflamatorio que caracteriza a la ND, mientras que 7 en fibrosis y 3 en el proceso hipertrófico (Fig. 13). Doce de las proteínas identificadas participan simultáneamente en hipertrofia/fibrosis, 9 de ellas en inflamación/fibrosis y sólo 5 proteínas en hipertrofia/inflamación. Por último, 11 (Tabla 3) de las 59 proteínas seleccionadas participan simultáneamente en los 3 procesos que caracterizan a la ND (Fig. 13) por lo que se eligieron como candidatas para continuar el estudio.

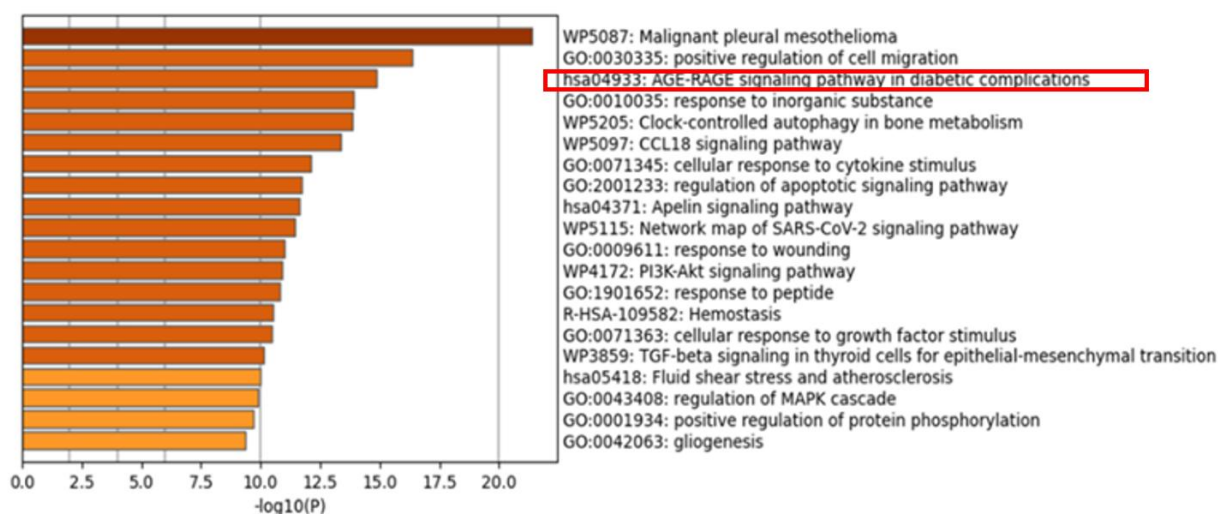


Figura 11. Enriquecimiento funcional de los genes que codifican las 59 proteínas identificadas como desreguladas en nefropatía diabética. En el recuadro rojo se destaca la vía de señalización AGE-RAGE en complicaciones diabéticas ($p < 0.05$).

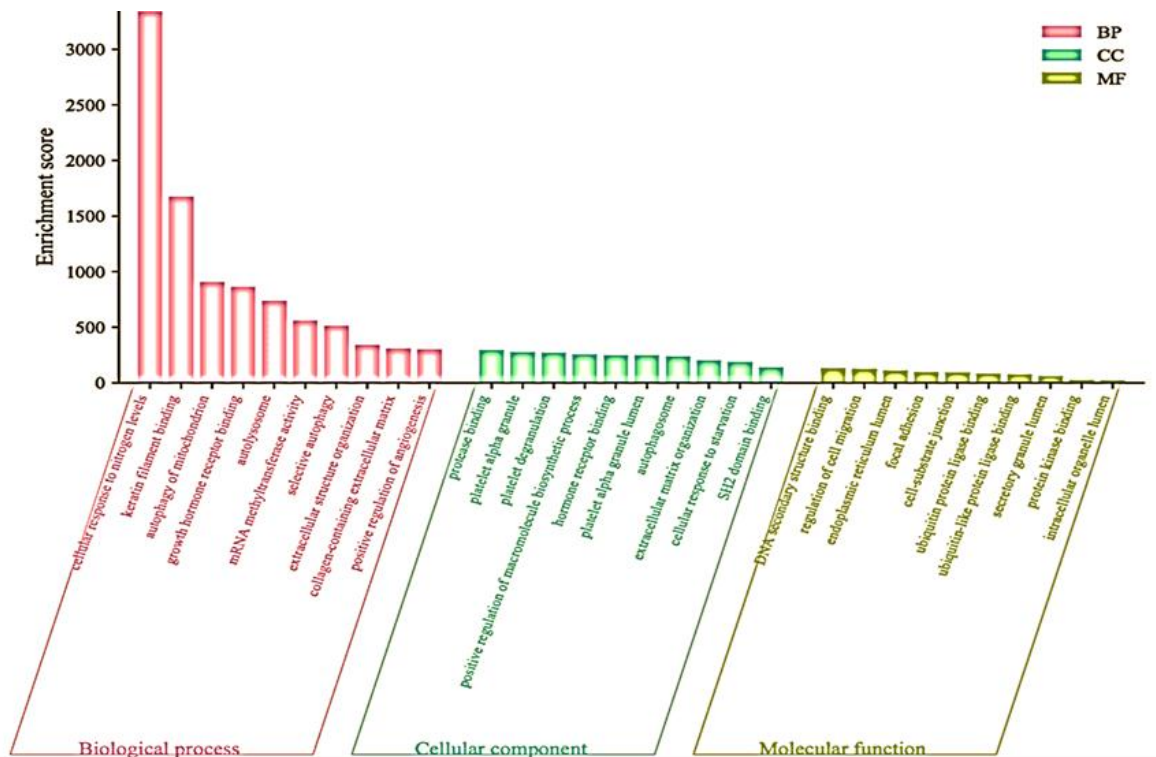


Figura 12. Funciones moleculares, vías y procesos biológicos enriquecidos en el grupo de proteínas identificadas.



Figura 13. Agrupación de proteínas desreguladas en la nefropatía diabética, identificadas en la revisión sistemática, por los procesos patológicos que ocurren en esta enfermedad. En el diagrama de Venn se señalan la cantidad de

las proteínas desreguladas identificadas que se encuentran asociadas a los diferentes procesos característicos de la ND.

Tabla 3. Proteínas desreguladas en ND, identificadas en este trabajo, que participan simultáneamente en los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia observados en esta patología y su función.			
Gen	Proteína	Clasificación	Función
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	Factor de transcripción	Transductor de señales y activador de la transcripción de interleucinas y factores de crecimiento.
<i>PFN2</i>	Profilin-2	Proteína estructural	Se une a actina y afecta la estructura del citoesqueleto.
<i>TJP1</i>	Tight junction protein ZO-1	Adhesión celular	Se une a las proteínas transmembranales que componen las uniones estrechas.
<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta-1 proprotein	Citocina	Regula el crecimiento y la diferenciación de diferentes tipos celulares y participa en procesos como el desarrollo y la función inmune.
<i>SERPINE1</i>	Plasminogen activator inhibitor 1	Coagulación sanguínea	Inhibidor de proteasas de serina.

<i>MMP9</i>	Matrix metalloproteinase -9	Hidrolasa	Proteólisis local de la MEC y en la migración leucocitaria.
<i>MMP2</i>	72 kDa type IV collagenase	Metaloproteasa	Remodelación vascular, angiogénesis, reparación tisular, invasión tumoral, inflamación, ruptura de placas ateroscleróticas y degradación de MEC.
<i>Jun</i>	Transcription factor Jun	Factor de transcripción	Factor de transcripción que forma un heterodímero con Fos y reconoce y se une a AP-1.
<i>JAK1</i>	Tyrosine-protein kinase JAK1	Transferasa	Involucrada en la vía de señalización IFN-alfa/beta/gamma.
<i>JAK2</i>	Tyrosine-protein kinase JAK2	Transferasa	Involucrada en procesos de crecimiento celular, desarrollo, diferenciación o modificación de histonas.
<i>AGER</i>	Advanced glycosylation end product-specific receptor	Transporte y señalización celular	Receptor de superficie celular que sensa señales de estrés endógeno y posee diferentes ligandos, ej., AGEs, proteínas S100 y HGMB1, beta amiloide, ácidos nucleicos, etc.

De los resultados anteriores se infirió que estas 11 proteínas que participaban simultáneamente en los principales procesos de la ND eran blancos potenciales de la enfermedad. A continuación, se realizó un mapa de calor comparando la desregulación de su expresión con la expresión en el riñón sano (Fig 14). La mayoría de las proteínas desreguladas que participan en los tres procesos (inflamación/fibrosis/hipertrofia) se sobreexpresan en la ND a excepción de TJP1, que se encuentra reprimida (Fig 14). Las metaloproteasas MMP2 y MMP9 exhiben un patrón de regulación inconsistente entre diferentes estudios (Krochmal, *et al.*, 2017; Nakatani, *et al.*, 2012), lo que refleja su compleja función en las alteraciones de la MEC durante la progresión de la enfermedad. Entre las proteínas desreguladas también se identificó a la proteína Janus cinasa 2 (JAK2) y al transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Fig. 14). Se ha demostrado la sobreexpresión de los genes JAK-STAT en el glomérulo renal y otras células del riñón en la fase temprana y durante la progresión de la ND, por lo que JAK2 ha sido evaluada como blanco terapéutico por diferentes autores (Brosius, *et al.*, 2016). En consecuencia, nos propusimos también estudiar si JAK2 y STAT3 podrían ser regulados a través de interacciones con circRNAs-miRNAs y de esta manera identificar nuevas moléculas con potencial terapéutico.

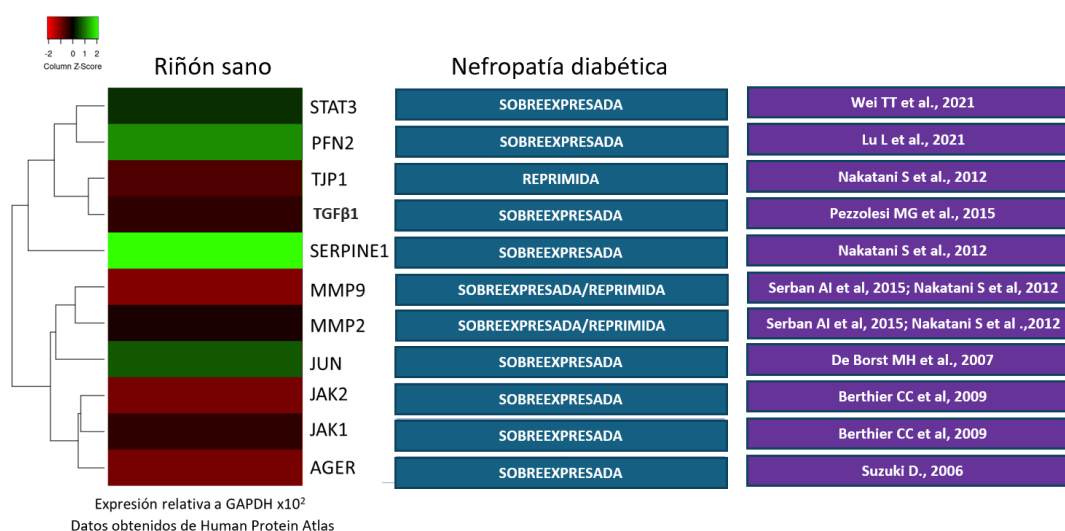


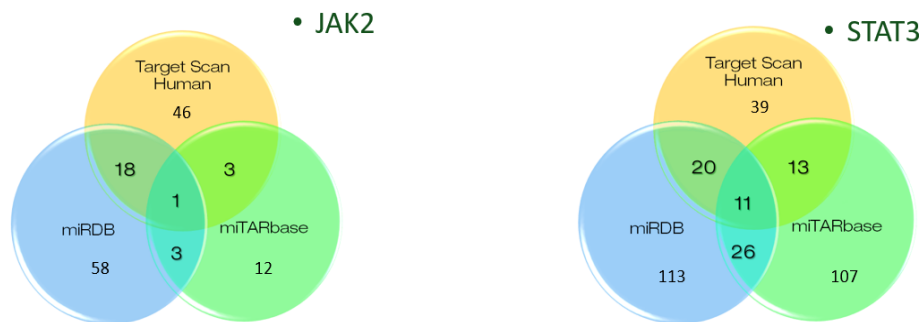
Figura 14. Expresión de las proteínas seleccionadas en este trabajo, que participan en los tres procesos claves de la nefropatía diabética en tejido renal

sano y con la patología. El mapa de calor compara los niveles de expresión de cada proteína en tejido renal sano (izquierda, basado en datos de The Human Protein Atlas) contra su estado de regulación en la ND (derecha). La expresión relativa se normalizó con respecto a GAPDH ($\times 10^2$).

8.2 Construcción de la red de interacción circRNA-miRNA-mRNA de genes que codifican a *JAK2* y *STAT3*

Una vez establecido que se iba a estudiar la modulación de la expresión de *JAK2* y *STAT3*, se construyó una red de interacción entre los miRNAs que se expresan en tejido renal y que tienen como blancos potenciales los mRNAs de *JAK2* y *STAT3*, así como los circRNAs que pudieran secuestrar esos miRNAs.

Para ello, primero se identificaron los miRNAs que se unen a los mRNAs de *JAK2* y *STAT3* mediante el análisis de 3 bases de datos específicas: TargetScan Human, miRDB y miRTarbase. Con el fin de garantizar la fiabilidad de la construcción de una red de interacción miRNA-mRNA y un mayor grado de confianza en los resultados, se seleccionaron inicialmente todos los miRNAs que interactuaban con el mRNA de *JAK2* y *STAT3* que habían sido reportados en al menos dos de las tres bases de datos analizadas (Fig. 15).



Energía Libre de unión < -10 kcal/mol
Regiones semillas 7 y 8 mers

Figura 15. Identificación y validación de miRNAs reguladores de *JAK2* y *STAT3*. Los diagramas de Venn representan la intersección de miRNAs predichos para *JAK2* y *STAT3* a partir de las bases de datos TargetScan Human, miRDB y miRTarBase. El análisis reveló un miRNA consenso (en las tres bases de datos) para *JAK2* y 11 miRNAs consensos para *STAT3*. Se seleccionaron solamente los miRNAs que cumplieron con los criterios de estabilidad termodinámica (Energía libre de unión < -10 kcal/mol) y presencia de regiones semilla 7mer u 8mer en su interacción con el mRNA blanco.

Se verificó mediante los servidores RNAUp y RNAHybrid que el grupo de interacciones seleccionadas tuviera una energía libre de unión igual o menor a -10 kcal/mol y que además los miRNAs tuvieran regiones semilla de tipo 7mer u 8mer (Fig. 15).

Las interacciones predichas es necesario comprobarlas experimentalmente, pero si tenemos en cuenta lo infrecuente que es encontrar polimorfismos de un solo nucleótido en las regiones semilla de los miRNAs (Saunders, *et al.*, 2007) la mayoría de las interacciones predichas deben ser funcionales y ocurrir *in vitro*. No obstante, si es necesario tener en cuenta las posibles variaciones que se pueden encontrar en los elementos de respuesta a miRNAs (MREs), localizados en la región 3'UTR

de los mRNAs, que sí ocurren con mayor frecuencia, y aportan diversidad a la regulación de la expresión génica *in vivo* mediante miRNAs (Saunders, *et al.*, 2007).

Tabla 4. Interacciones potenciales entre circRNAs-miRNAs y el mRNA de *JAK2* o *STAT3* identificadas en este trabajo

mRNA	miRNA	circRNAs		
JAK2	hsa-miR-6848-3p	hsa_circ_0000075	hsa_circ_0083891	hsa_circ_0000906
		hsa_circ_0018911	hsa_circ_0068843	hsa_circ_0001651
		hsa_circ_0080151	hsa_circ_0062607	hsa_circ_0005566
		hsa_circ_0057831	hsa_circ_0050803	hsa_circ_0006375
		hsa_circ_0053933	hsa_circ_0047870	hsa_circ_0006633
		hsa_circ_0005354	hsa_circ_0032676	hsa_circ_0023182
		hsa_circ_0021371	hsa_circ_0004104	hsa_circ_0017361
		hsa_circ_0025939	hsa_circ_0003600	hsa_circ_0008475
		hsa_circ_0032673	hsa_circ_0003433	hsa_circ_0005252
		hsa_circ_0047323	hsa_circ_0001559	hsa_circ_0004575
		hsa_circ_0047869	hsa_circ_0000886	hsa_circ_0108756
		hsa_circ_0075522	hsa_circ_0000557	hsa_circ_0113719
		hsa_circ_0085321	hsa_circ_0100480	hsa_circ_0091024
JAK2	hsa-miR-6843-3p	hsa_circ_0021371	hsa_circ_0005354	hsa_circ_0012792
		hsa_circ_0023879	hsa_circ_0000530	hsa_circ_0079149
		hsa_circ_0025939	hsa_circ_0000906	hsa_circ_0000075
		hsa_circ_0045202	hsa_circ_0001651	hsa_circ_0018911
		hsa_circ_0047323	hsa_circ_0003144	hsa_circ_0058698
		hsa_circ_0047869	hsa_circ_0003343	hsa_circ_0087641
		hsa_circ_0065908	hsa_circ_0004166	hsa_circ_0080151
		hsa_circ_0075522	hsa_circ_0005399	hsa_circ_0078059
		hsa_circ_0077983	hsa_circ_0005566	hsa_circ_0056893
		hsa_circ_0083826	hsa_circ_0006375	hsa_circ_0008706
		hsa_circ_0094768	hsa_circ_0006633	hsa_circ_0008702
		hsa_circ_0109925	hsa_circ_0006856	hsa_circ_0094964
		hsa_circ_0120090	hsa_circ_0007337	hsa_circ_0106606
		hsa_circ_0120922	hsa_circ_0008145	hsa_circ_0107113
		hsa_circ_0122966	hsa_circ_0008823	hsa_circ_0109396
		hsa_circ_0123501	hsa_circ_0015798	hsa_circ_0106826
		hsa_circ_0123502	hsa_circ_0015800	hsa_circ_0098713
		hsa_circ_0125215	hsa_circ_0083891	hsa_circ_0097896
		hsa_circ_0135813	hsa_circ_0077978	hsa_circ_0095226
		hsa_circ_0134065	hsa_circ_0077976	hsa_circ_0094769
		hsa_circ_0130795	hsa_circ_0074639	hsa_circ_0094493
		hsa_circ_0130792	hsa_circ_0073241	hsa_circ_0115539
		hsa_circ_0120925	hsa_circ_0068843	hsa_circ_0114081
		hsa_circ_0108473	hsa_circ_0066737	hsa_circ_0109788
		hsa_circ_0108132	hsa_circ_0065912	hsa_circ_0042979
		hsa_circ_0053375	hsa_circ_0062607	hsa_circ_0042421
		hsa_circ_0050803	hsa_circ_0060898	hsa_circ_0042231
		hsa_circ_0047870	hsa_circ_0056612	hsa_circ_0108756
		hsa_circ_0046429	hsa_circ_0004104	hsa_circ_0124474
		hsa_circ_0043346	hsa_circ_0003600	hsa_circ_0095047
		hsa_circ_0041190	hsa_circ_0003433	hsa_circ_0000997

		hsa_circ_0040008 hsa_circ_0037744 hsa_circ_0005786	hsa_circ_0003079 hsa_circ_0002629	hsa_circ_0001559 hsa_circ_0005252
JAK2	hsa-miR-642b-5p	hsa_circ_0006894 hsa_circ_0009089 hsa_circ_0068103 hsa_circ_0003044	hsa_circ_0081182 hsa_circ_0068517 hsa_circ_0057831 hsa_circ_0006863	hsa_circ_0003776 hsa_circ_0054263 hsa_circ_0002878
JAK2	hsa-miR-100-3p	hsa_circ_0019144 hsa_circ_0020133 hsa_circ_0025498 hsa_circ_0025696 hsa_circ_0025939 hsa_circ_0030535 hsa_circ_0032118 hsa_circ_0034883 hsa_circ_0077506 hsa_circ_0032624 hsa_circ_0110396 hsa_circ_0006323 hsa_circ_0113535	hsa_circ_0118712 hsa_circ_0126751 hsa_circ_0136332 hsa_circ_0035443 hsa_circ_0005115 hsa_circ_0132923 hsa_circ_0000019 hsa_circ_0000190 hsa_circ_0002608 hsa_circ_0004100 hsa_circ_0005321 hsa_circ_0005469 hsa_circ_0006375	hsa_circ_0006552 hsa_circ_0006982 hsa_circ_0008841 hsa_circ_0010051 hsa_circ_0010059 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0041418 hsa_circ_0099950 hsa_circ_0024402 hsa_circ_0029703 hsa_circ_0095486
JAK2	hsa-miR-2054	hsa_circ_0006532 hsa_circ_0008618 hsa_circ_0013442 hsa_circ_0013761 hsa_circ_0027364 hsa_circ_0027373 hsa_circ_0036462 hsa_circ_0039262 hsa_circ_0056112	hsa_circ_0031517 hsa_circ_0005171 hsa_circ_0002092 hsa_circ_0030067 hsa_circ_0002680 hsa_circ_0004393 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0057518	hsa_circ_0071174 hsa_circ_0071186 hsa_circ_0090808 hsa_circ_0092908 hsa_circ_0057179 hsa_circ_0071363 hsa_circ_0088551 hsa_circ_0071082 hsa_circ_0056113
JAK2	hsa-miR-211-5p	hsa_circ_0117423 hsa_circ_0131120 hsa_circ_0071087 hsa_circ_0055851 hsa_circ_0040405 hsa_circ_0032969 hsa_circ_0023930 hsa_circ_0023922 hsa_circ_0023919 hsa_circ_0023895 hsa_circ_0021204	hsa_circ_0003600 hsa_circ_0003026 hsa_circ_0002669 hsa_circ_0002513 hsa_circ_0000665 hsa_circ_0023921 hsa_circ_0121187 hsa_circ_0119721 hsa_circ_0100067 hsa_circ_0094324 hsa_circ_0092656	hsa_circ_0008115 hsa_circ_0007630 hsa_circ_0006969 hsa_circ_0004442 hsa_circ_0004102 hsa_circ_0019072 hsa_circ_0010850 hsa_circ_0010150 hsa_circ_0094307 hsa_circ_0020524
JAK2	hsa-miR-380-3p	hsa_circ_0031319 hsa_circ_0114043 hsa_circ_0031517 hsa_circ_0007728 hsa_circ_0008666 hsa_circ_0034867 hsa_circ_0064515 hsa_circ_0035366	hsa_circ_0053439 hsa_circ_0053440 hsa_circ_0056526 hsa_circ_0058686 hsa_circ_0059935 hsa_circ_0063614 hsa_circ_0032940 hsa_circ_0035365	hsa_circ_0002501 hsa_circ_0000096 hsa_circ_0018343 hsa_circ_0040784 hsa_circ_0044952 hsa_circ_0047301
JAK2	hsa-miR-5580-5p	hsa_circ_0093061 hsa_circ_0133551 hsa_circ_0127263 hsa_circ_0127261 hsa_circ_0122715 hsa_circ_0122389 hsa_circ_0122358 hsa_circ_0121561	hsa_circ_0018003 hsa_circ_0029384 hsa_circ_0035392 hsa_circ_0037773 hsa_circ_0042432 hsa_circ_0042434 hsa_circ_0132437 hsa_circ_0138267	hsa_circ_0090178 hsa_circ_0090308 hsa_circ_0090614 hsa_circ_0092558 hsa_circ_0092902 hsa_circ_0083107 hsa_circ_0092656 hsa_circ_0092655

		hsa_circ_0112588 hsa_circ_0105836 hsa_circ_0005609 hsa_circ_0035442 hsa_circ_0035032 hsa_circ_0030604 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0017701 hsa_circ_0016470 hsa_circ_0012754	hsa_circ_0121236 hsa_circ_0076080 hsa_circ_0082141 hsa_circ_0082150 hsa_circ_0082151 hsa_circ_0083501 hsa_circ_0085258 hsa_circ_0085264 hsa_circ_0088804 hsa_circ_0088865	hsa_circ_0004470 hsa_circ_0132439 hsa_circ_0138001 hsa_circ_0118612 hsa_circ_0116329 hsa_circ_0116328 hsa_circ_0070753 hsa_circ_0112926
JAK2	hsa-miR-548aw	hsa_circ_0011542 hsa_circ_0011543 hsa_circ_0094167 hsa_circ_0096733 hsa_circ_0091586 hsa_circ_0091587 hsa_circ_0091630 hsa_circ_0093731 hsa_circ_0094147 hsa_circ_0094148 hsa_circ_0094150 hsa_circ_0097870 hsa_circ_0101390 hsa_circ_0107811 hsa_circ_0111575	hsa_circ_0008618 hsa_circ_0007282 hsa_circ_0007581 hsa_circ_0018881 hsa_circ_0029398 hsa_circ_0040652 hsa_circ_0041412 hsa_circ_0046849 hsa_circ_0052695 hsa_circ_0052940 hsa_circ_0075797 hsa_circ_0079894 hsa_circ_0081884 hsa_circ_0091585 hsa_circ_0122027	hsa_circ_0114507 hsa_circ_0116578 hsa_circ_0116579 hsa_circ_0117067 hsa_circ_0134829 hsa_circ_0135900 hsa_circ_0133750 hsa_circ_0125501 hsa_circ_0125502 hsa_circ_0126969 hsa_circ_0129069 hsa_circ_0130853 hsa_circ_0132965
JAK2	hsa-miR-135a-5p	hsa_circ_0005804 hsa_circ_0005505 hsa_circ_0003304 hsa_circ_0002048 hsa_circ_0001966 hsa_circ_0001403 hsa_circ_0012836 hsa_circ_0013163 hsa_circ_0117083 hsa_circ_0007303 hsa_circ_0007817 hsa_circ_0017158 hsa_circ_0017635 hsa_circ_0018178 hsa_circ_0008706 hsa_circ_0068247 hsa_circ_0047398	hsa_circ_0006952 hsa_circ_0034661 hsa_circ_0005469 hsa_circ_0053393 hsa_circ_0061726 hsa_circ_0075650 hsa_circ_0075657 hsa_circ_0056178 hsa_circ_0006877 hsa_circ_0006888 hsa_circ_0007191 hsa_circ_0090223 hsa_circ_0091203 hsa_circ_0072490 hsa_circ_0072430 hsa_circ_0072003 hsa_circ_0024096	hsa_circ_0020460 hsa_circ_0029839 hsa_circ_0035431 hsa_circ_0058182 hsa_circ_0060065 hsa_circ_0061279 hsa_circ_0077789 hsa_circ_0079943 hsa_circ_0083063 hsa_circ_0007083 hsa_circ_0048019 hsa_circ_0000190 hsa_circ_0000847 hsa_circ_0004982 hsa_circ_0004994 hsa_circ_0018180
JAK2	hsa-miR-135b-5p	hsa_circ_0029839 hsa_circ_0035431 hsa_circ_0058182 hsa_circ_0060065 hsa_circ_0061279 hsa_circ_0091203 hsa_circ_0072490 hsa_circ_0072430 hsa_circ_0072003 hsa_circ_0068247 hsa_circ_0047398 hsa_circ_0024096 hsa_circ_0018180 hsa_circ_0008706 hsa_circ_0007083 hsa_circ_0005804 hsa_circ_0003304	hsa_circ_0004982 hsa_circ_0004994 hsa_circ_0006877 hsa_circ_0006888 hsa_circ_0007191 hsa_circ_0007303 hsa_circ_0077789 hsa_circ_0079943 hsa_circ_0083063 hsa_circ_0090223 hsa_circ_0001403 hsa_circ_0012836 hsa_circ_0013163 hsa_circ_0117083 hsa_circ_0002048 hsa_circ_0001966 hsa_circ_0005505	hsa_circ_0006952 hsa_circ_0034661 hsa_circ_0005469 hsa_circ_0053393 hsa_circ_0007817 hsa_circ_0017158 hsa_circ_0017635 hsa_circ_0018178 hsa_circ_0020460 hsa_circ_0061726 hsa_circ_0075650 hsa_circ_0075657 hsa_circ_0056178 hsa_circ_0048019 hsa_circ_0000190 hsa_circ_0000847

JAK2	hsa-miR-4468	hsa_circ_0015026 hsa_circ_0015027 hsa_circ_0015989 hsa_circ_0024981 hsa_circ_0024994 hsa_circ_0031655 hsa_circ_0084552	hsa_circ_0054139 hsa_circ_0038613 hsa_circ_0013663 hsa_circ_0115262 hsa_circ_0113001 hsa_circ_0103652 hsa_circ_0092911	hsa_circ_0006302 hsa_circ_0007767 hsa_circ_0007853 hsa_circ_0065336 hsa_circ_0060491 hsa_circ_0057884 hsa_circ_0002153
JAK2	hsa-miR-1468-3p	hsa_circ_0126765 hsa_circ_0128904 hsa_circ_0130502 hsa_circ_0130503 hsa_circ_0130511 hsa_circ_0137363 hsa_circ_0138379 hsa_circ_0130510 hsa_circ_0077746 hsa_circ_0077776 hsa_circ_0078139 hsa_circ_0079894	hsa_circ_0091586 hsa_circ_0113338 hsa_circ_0114367 hsa_circ_0115096 hsa_circ_0116080 hsa_circ_0118753 hsa_circ_0122027 hsa_circ_0122914 hsa_circ_0125818 hsa_circ_0125820 hsa_circ_0073547 hsa_circ_0081884	hsa_circ_0140158 hsa_circ_0032438 hsa_circ_0021801 hsa_circ_0029874 hsa_circ_0091587 hsa_circ_0099201 hsa_circ_0100800 hsa_circ_0105947 hsa_circ_0127403 hsa_circ_0091585
JAK2	hsa-miR-197-3p	hsa_circ_0088246 hsa_circ_0002702 hsa_circ_0015433 hsa_circ_0015434 hsa_circ_0036462 hsa_circ_0048687 hsa_circ_0054894	hsa_circ_0120835 hsa_circ_0124247 hsa_circ_0109146 hsa_circ_0106689 hsa_circ_0105718 hsa_circ_0076080 hsa_circ_0039326	hsa_circ_0090259 hsa_circ_0097680 hsa_circ_0105616 hsa_circ_0006028 hsa_circ_0004888 hsa_circ_0008170 hsa_circ_0116088
JAK2	hsa-miR-6826-3p	hsa_circ_0132965 hsa_circ_0133316 hsa_circ_0133317 hsa_circ_0137576 hsa_circ_0139262 hsa_circ_0136350 hsa_circ_0135386 hsa_circ_0108973 hsa_circ_0104926 hsa_circ_0091281 hsa_circ_0062435 hsa_circ_0024281 hsa_circ_0008967 hsa_circ_0007808 hsa_circ_0136351	hsa_circ_0074136 hsa_circ_0078128 hsa_circ_0079836 hsa_circ_0081890 hsa_circ_0087888 hsa_circ_0093061 hsa_circ_0093992 hsa_circ_0095882 hsa_circ_0125685 hsa_circ_0129797 hsa_circ_0129798 hsa_circ_0130922 hsa_circ_0130917 hsa_circ_0116251 hsa_circ_0108977	hsa_circ_0105998 hsa_circ_0106606 hsa_circ_0111566 hsa_circ_0111888 hsa_circ_0115837 hsa_circ_0118543 hsa_circ_0120540 hsa_circ_0123300 hsa_circ_0130923 hsa_circ_0098670 hsa_circ_0098671 hsa_circ_0105988 hsa_circ_0124095
JAK2	hsa-miR-5582-3p	hsa_circ_0010049 hsa_circ_0007442 hsa_circ_0005505 hsa_circ_0002043 hsa_circ_0020285 hsa_circ_0112998 hsa_circ_0111817 hsa_circ_0112441 hsa_circ_0113003 hsa_circ_0114399 hsa_circ_0117042 hsa_circ_0126289 hsa_circ_0127497 hsa_circ_0127498 hsa_circ_0127560 hsa_circ_0128319 hsa_circ_0128320	hsa_circ_0006086 hsa_circ_0011542 hsa_circ_0031678 hsa_circ_0061878 hsa_circ_0072725 hsa_circ_0089939 hsa_circ_0095695 hsa_circ_0103604 hsa_circ_0103762 hsa_circ_0125513 hsa_circ_0130153 hsa_circ_0132623 hsa_circ_0135500 hsa_circ_0077292 hsa_circ_0077079 hsa_circ_0119572 hsa_circ_0119578	hsa_circ_0066230 hsa_circ_0053064 hsa_circ_0053046 hsa_circ_0044898 hsa_circ_0042421 hsa_circ_0030372 hsa_circ_0025493 hsa_circ_0021781 hsa_circ_0020524 hsa_circ_0019774 hsa_circ_0010808 hsa_circ_0010052 hsa_circ_0065174 hsa_circ_0065172 hsa_circ_0074472 hsa_circ_0112476 hsa_circ_0084464

		hsa_circ_0128321 hsa_circ_0128904 hsa_circ_0131185 hsa_circ_0134826 hsa_circ_0120368	hsa_circ_0119579 hsa_circ_0122575 hsa_circ_0122576 hsa_circ_0123431 hsa_circ_0132606	hsa_circ_0072305 hsa_circ_0039279 hsa_circ_0125478 hsa_circ_0132605 hsa_circ_0120922
JAK2	hsa-let-7a-3p	hsa_circ_0135849 hsa_circ_0003234 hsa_circ_0032108 hsa_circ_0006148	hsa_circ_0025896 hsa_circ_0030793 hsa_circ_0036984 hsa_circ_0004776	hsa_circ_0003410 hsa_circ_0024279 hsa_circ_0094976 hsa_circ_0013232
JAK2	hsa-miR-568	hsa_circ_0074816 hsa_circ_0046429 hsa_circ_0027033 hsa_circ_0007798 hsa_circ_0006160 hsa_circ_0005420 hsa_circ_0000817	hsa_circ_0002665 hsa_circ_0076948 hsa_circ_0000111 hsa_circ_0000153 hsa_circ_0003739 hsa_circ_0069443 hsa_circ_0077983	hsa_circ_0084464 hsa_circ_0081891 hsa_circ_0077976 hsa_circ_0006856 hsa_circ_0027464 hsa_circ_0057518 hsa_circ_0084171
JAK2	hsa-miR-101-3p	hsa_circ_0003776 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0056734 hsa_circ_0088246 hsa_circ_0065265	hsa_circ_0000290 hsa_circ_0001398 hsa_circ_0006619 hsa_circ_0001479 hsa_circ_0047885	hsa_circ_0001554 hsa_circ_0002096 hsa_circ_0061721 hsa_circ_0085045 hsa_circ_0039927
JAK2	hsa-miR-375	hsa_circ_0032969 hsa_circ_0058530 hsa_circ_0078059 hsa_circ_0078465	hsa_circ_0001392 hsa_circ_0002073 hsa_circ_0004576 hsa_circ_0005229	hsa_circ_0006371 hsa_circ_0032731 hsa_circ_0014186
STAT3	hsa-miR-20a-5p	hsa_circ_0007625 hsa_circ_0007775 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0007996 hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0008112	hsa_circ_0001345 hsa_circ_0002210 hsa_circ_0002926 hsa_circ_0003504 hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005387 hsa_circ_0006741	hsa_circ_0008534 hsa_circ_0009910 hsa_circ_0011201 hsa_circ_0007112 hsa_circ_0007509
STAT3	hsa-miR-106b-5p	hsa_circ_0006741 hsa_circ_0007032 hsa_circ_0007112 hsa_circ_0007509 hsa_circ_0007625 hsa_circ_0007775 hsa_circ_0065898 hsa_circ_0073027 hsa_circ_0073659 hsa_circ_0077430 hsa_circ_0078363 hsa_circ_0085045 hsa_circ_0086742 hsa_circ_0086743 hsa_circ_0089952	hsa_circ_0008112 hsa_circ_0009910 hsa_circ_0013171 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0015800 hsa_circ_0018456 hsa_circ_0024865 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0029913 hsa_circ_0030067 hsa_circ_0031433 hsa_circ_0036984 hsa_circ_0044941 hsa_circ_0046132	hsa_circ_0002210 hsa_circ_0002926 hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005085 hsa_circ_0005387 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0007996 hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0047959 hsa_circ_0061878 hsa_circ_0056704
STAT3	hsa-miR-298	hsa_circ_0004482 hsa_circ_0004692 hsa_circ_0005252 hsa_circ_0005986 hsa_circ_0006302 hsa_circ_0007945 hsa_circ_0031011 hsa_circ_0031655	hsa_circ_0070637 hsa_circ_0072305 hsa_circ_0074719 hsa_circ_0078626 hsa_circ_0082612 hsa_circ_0083470 hsa_circ_0083891 hsa_circ_0087749	hsa_circ_0000448 hsa_circ_000669 hsa_circ_0000906 hsa_circ_0001436 hsa_circ_0002554 hsa_circ_0002702 hsa_circ_0003273 hsa_circ_0058530

		hsa_circ_0032252 hsa_circ_0036365 hsa_circ_0036441 hsa_circ_0047959 hsa_circ_0054296 hsa_circ_0054309 hsa_circ_0057799 hsa_circ_0013082 hsa_circ_0020670	hsa_circ_0089277 hsa_circ_0089973 hsa_circ_0014088 hsa_circ_0017310 hsa_circ_0017647 hsa_circ_0019057 hsa_circ_0008417 hsa_circ_0010096 hsa_circ_0021867	hsa_circ_0061179 hsa_circ_0064840 hsa_circ_0065336 hsa_circ_0068809 hsa_circ_0068837 hsa_circ_0068916 hsa_circ_0010527 hsa_circ_0010530
STAT3	hsa-miR-519d-3'	hsa_circ_0006281 hsa_circ_0006696 hsa_circ_0006894 hsa_circ_0007625 hsa_circ_0009089 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0015800	hsa_circ_0044941 hsa_circ_0057282 hsa_circ_0057283 hsa_circ_0073027 hsa_circ_0074004 hsa_circ_0075748 hsa_circ_0078619 hsa_circ_0090223	hsa_circ_0001345 hsa_circ_0001400 hsa_circ_0003504 hsa_circ_0018456 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0030067
STAT3	hsa-miR-371b-3'	hsa_circ_0028031 hsa_circ_0057870 hsa_circ_0059304 hsa_circ_0059661	hsa_circ_0003820 hsa_circ_0005442 hsa_circ_0005595 hsa_circ_0068774	hsa_circ_0007112 hsa_circ_0015749 hsa_circ_0001330 hsa_circ_0002702
STAT3	hsa-miR-20b-5p	hsa_circ_0003504 hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005387 hsa_circ_0006696 hsa_circ_0009910 hsa_circ_000674 hsa_circ_0007112	hsa_circ_0007775 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0007996 hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0008112 hsa_circ_00085341	hsa_circ_0001345 hsa_circ_0001377 hsa_circ_0002210 hsa_circ_0002926 hsa_circ_0007509 hsa_circ_0007625
STAT3	hsa-miR-17-5p	hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0008112 hsa_circ_0009910 hsa_circ_0061878 hsa_circ_0065898 hsa_circ_0073027 hsa_circ_0073659 hsa_circ_0075748 hsa_circ_0077430 hsa_circ_0078363 hsa_circ_0078619 hsa_circ_0086742 hsa_circ_0086746 hsa_circ_0089952 hsa_circ_0056704	hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0015800 hsa_circ_0018456 hsa_circ_0023879 hsa_circ_0024865 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0029913 hsa_circ_0030067 hsa_circ_0043183 hsa_circ_0044941 hsa_circ_0047959 hsa_circ_0056178 hsa_circ_0006741 hsa_circ_0006696 hsa_circ_0011201	hsa_circ_0007032 hsa_circ_0007112 hsa_circ_0007149 hsa_circ_0007509 hsa_circ_0007525 hsa_circ_0007775 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0007996 hsa_circ_0001345 hsa_circ_0001377 hsa_circ_0002210 hsa_circ_0003504 hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005085 hsa_circ_0005387
STAT3	hsa-miR-106a-5'	hsa_circ_0011201 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0015800 hsa_circ_0018456 hsa_circ_0030067 hsa_circ_0043183 hsa_circ_0044941 hsa_circ_0047959 hsa_circ_0073659 hsa_circ_0075748 hsa_circ_0077430 hsa_circ_0086742	hsa_circ_0005387 hsa_circ_0006696 hsa_circ_0006741 hsa_circ_0007032 hsa_circ_0007112 hsa_circ_0007509 hsa_circ_0007625 hsa_circ_0007775 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0023879 hsa_circ_0024865 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0029913	hsa_circ_0007996 hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0008112 hsa_circ_0009910 hsa_circ_0001345 hsa_circ_0001377 hsa_circ_0002210 hsa_circ_0003504 hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005085 hsa_circ_0078363 hsa_circ_0078619

		hsa_circ_0086743 hsa_circ_0089952 hsa_circ_0073027	hsa_circ_0056178 hsa_circ_0056704 hsa_circ_0065898	hsa_circ_0061878
STAT3	hsa-miR-125a-5p	hsa_circ_0007017 hsa_circ_0007466 hsa_circ_0008041 hsa_circ_0012792 hsa_circ_0013232 hsa_circ_0032969 hsa_circ_0036240 hsa_circ_0063410 hsa_circ_0084878	hsa_circ_0000039 hsa_circ_0001006 hsa_circ_0001769 hsa_circ_0002917 hsa_circ_0004456 hsa_circ_0005229 hsa_circ_0005243 hsa_circ_0005442 hsa_circ_0006493	hsa_circ_0008573 hsa_circ_0008706 hsa_circ_0009134 hsa_circ_0067091 hsa_circ_0011543 hsa_circ_0006873 hsa_circ_0011542 hsa_circ_0091089 hsa_circ_0020670
STAT3	hsa-miR-93-5p	hsa_circ_0029913 hsa_circ_0030067 hsa_circ_0031433 hsa_circ_0044941 hsa_circ_0046132 hsa_circ_0047959 hsa_circ_0053393 hsa_circ_0056178 hsa_circ_0056704 hsa_circ_0061878 hsa_circ_0073027 hsa_circ_0073659 hsa_circ_0074719 hsa_circ_0077430	hsa_circ_0003984 hsa_circ_0005085 hsa_circ_0005387 hsa_circ_0006696 hsa_circ_0006741 hsa_circ_0007509 hsa_circ_0007625 hsa_circ_0007775 hsa_circ_0007776 hsa_circ_0007996 hsa_circ_0008068 hsa_circ_0008087 hsa_circ_0008534 hsa_circ_0009910	hsa_circ_0018456 hsa_circ_0024865 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0001345 hsa_circ_0001400 hsa_circ_0002210 hsa_circ_0002926 hsa_circ_0090223 hsa_circ_0015800 hsa_circ_0015798 hsa_circ_0013171 hsa_circ_0015797 hsa_circ_0078619 hsa_circ_0078363
STAT3	hsa-miR-21-5p	hsa_circ_0069399 hsa_circ_0077416 hsa_circ_0083756 hsa_circ_0089277 hsa_circ_0035443 hsa_circ_0042098	hsa_circ_0018600 hsa_circ_0020998 hsa_circ_0028130 hsa_circ_0030131 hsa_circ_0043121 hsa_circ_0007411	hsa_circ_0061657 hsa_circ_0062685 hsa_circ_0004267 hsa_circ_0005966

Posteriormente, se exploró cuáles circRNAs reportados previamente pudieran actuar como "esponjas" moleculares de los miRNAs predichos (Tabla 4). Para ello, se consultaron las bases de datos circBase, CIRCpedia v2 y CircInteractome. Como resultado se identificaron 20 y 11 miRNAs que interactuaban potencialmente con el mRNA de *JAK2* y de *STAT3*, respectivamente, y que también interactuaban con circRNAs (Tabla 4).

Se identificaron 708 circRNAs que potencialmente interactuaban con miRNAs que tenían como blanco a *JAK2*, formando una red con 17 nodos distintos centrados alrededor de los miRNAs miR-1468-3p, miR-5580-5p, miR-548-aw, miR-6826-3p, miR-5582-3p, miR-568, miR-100-3p, miR-6848-3p, miR-6843-3p, miR-380-3p, miR-7a-3p, miR-135a-3p (y miR-135b-5p), miR-101-3p, miR-4468, miR-197-3p, miR-

211-5p y miR-345 (Fig. 16). De manera similar, nuestra investigación reveló 318 circRNAs que interactúan potencialmente con 11 miRNAs que reconocían a *STAT3* formando 5 nodos (Fig. 16). En particular, se descubrió que las redes de interacción circRNA-miRNA-mRNA de *JAK2* y *STAT3* estaban interconectadas mediante la participación de 29 circRNAs (Fig. 16). Por ejemplo, el hsa_circ_0007776 se identificó como un nodo que interactúa con miRNAs que tienen como blancos a *JAK2* y *STAT3*, como hsa-miR-101-3p (*JAK2*) y hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-20a-5p y hsa-miR-20b-5p (*STAT3*). También se observó que el hsa_circ_0061878 interactúa potencialmente con los miRNAs hsa-miR-5582-3p (*JAK2*) y con hsa-miR-106b-5p, miR-106a-5p hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p (*STAT3*). De manera similar, hsa_circ_0028130 mostró interacciones con los miRNAs hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p (*STAT3*) y con hsa-miR-5580-5p (*JAK2*). Por último, hsa_circ_0032969 interactuó con hsa-miR-375 y hsa-miR-211-5p (*JAK2*), así como con hsa-miR-125a-5p (*STAT3*).

Adicionalmente, se construyó la red de interacción entre los miRNAs que tenían como blanco los mRNAs de los genes que codifican el resto de las 11 proteínas desreguladas en ND y que participan simultáneamente en los procesos de fibrosis, inflamación e hipertrofia renal. Se encontró que esta red tiene 2492 nodos y 7003 aristas (Fig. 17). Estos resultados muestran las múltiples interacciones que pueden establecerse en la regulación de la expresión de proteínas en el tejido renal en la ND. Por otra parte, la identificación *in silico* de esta red de interacción constituye una base de conocimientos para, en un futuro, estudiar cómo cada una de estas proteínas pudiera ser regulada a través de miRNAs y circRNAs en la ND.

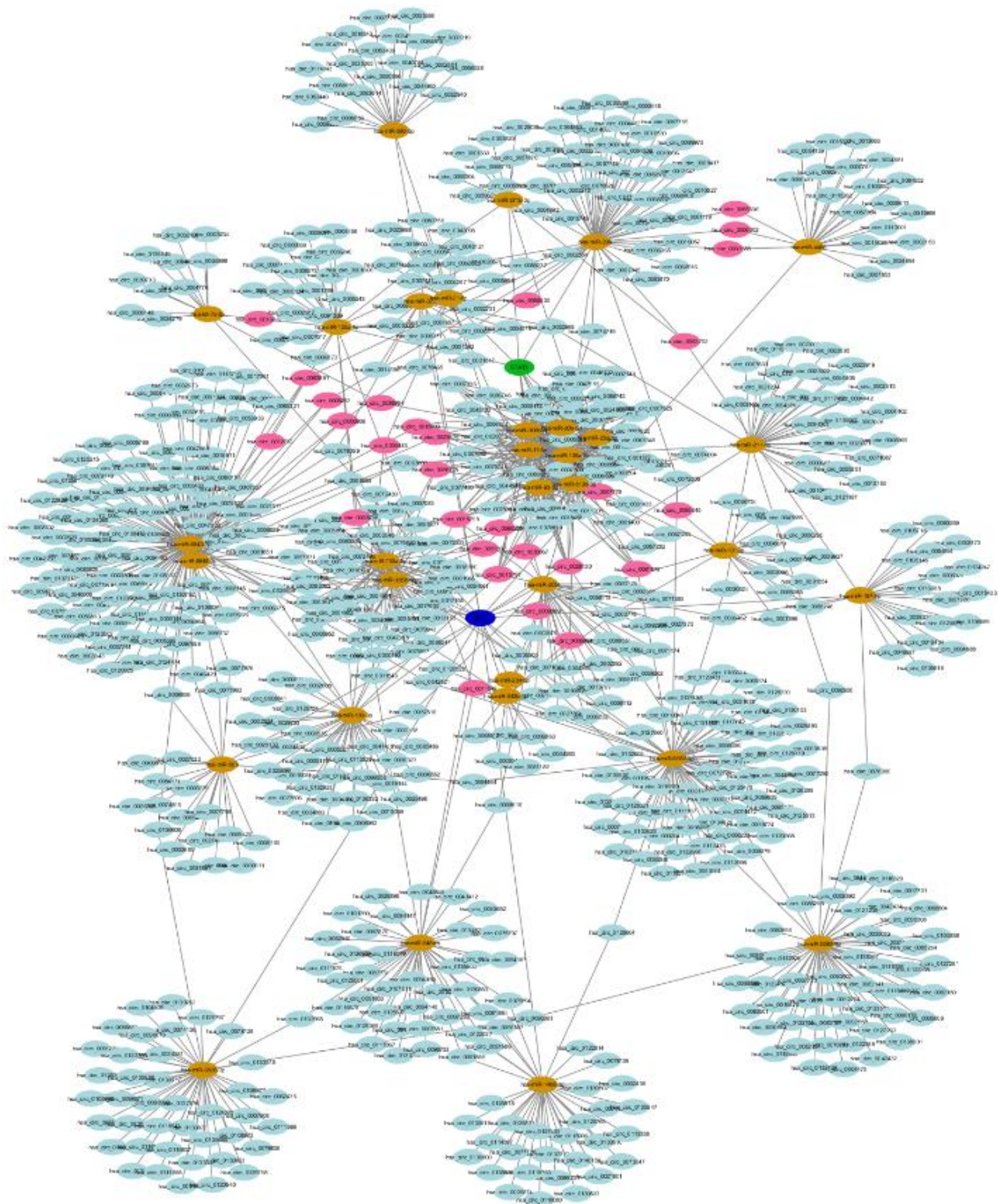


Figura 16. Red de interacción circRNA-miRNA-mRNA de los genes que codifican a *JAK2* y *STAT3*. Los mRNAs de *JAK2* y *STAT3* se presentan en azul

marino y verde, respectivamente, mientras que los miRNAs se ilustran en naranja. Los circRNAs que interconectan a *JAK2* y *STAT3* se representan en rosa y el resto de ellos en color celeste.

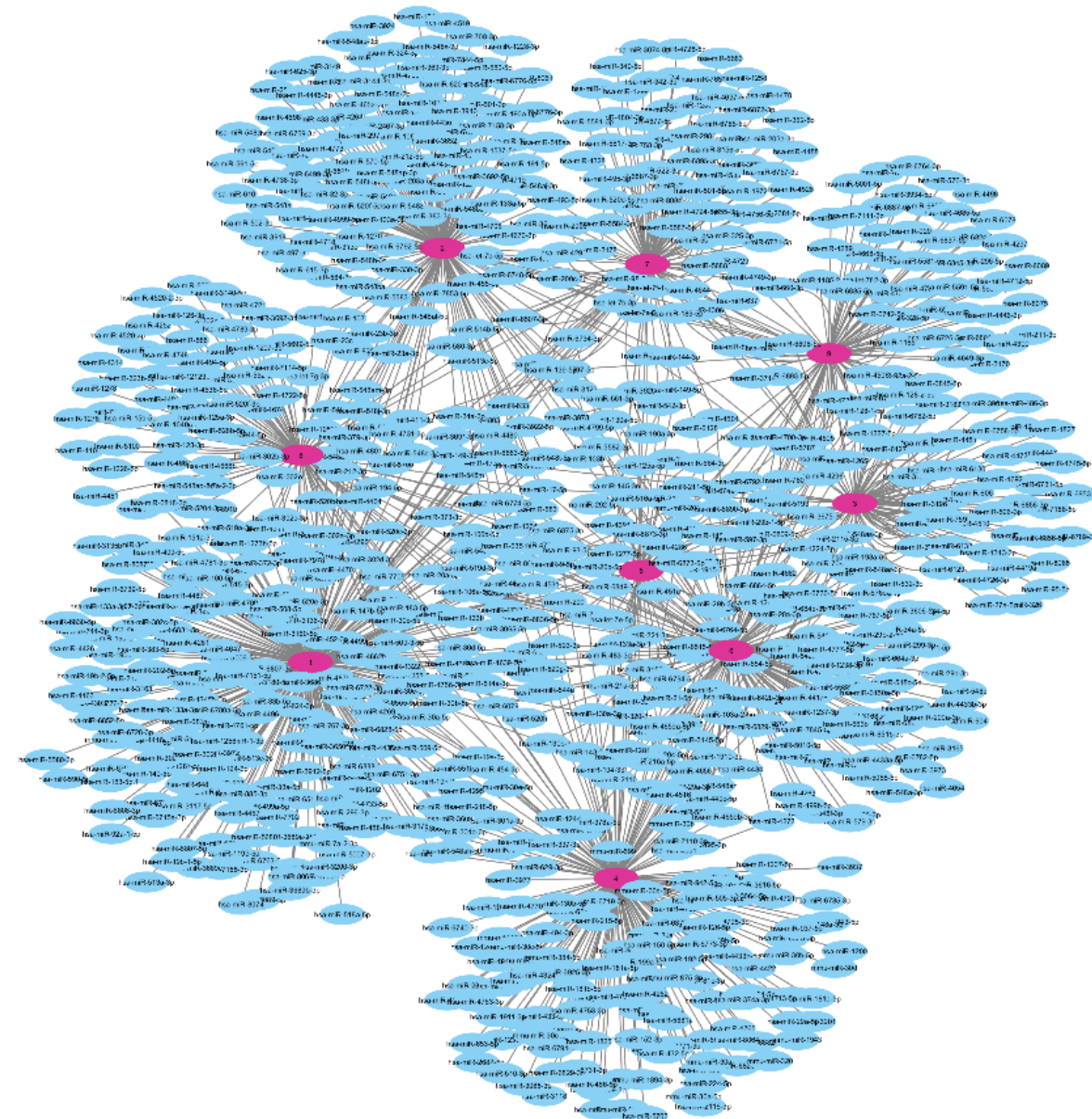


Figura 17. Red de interacción miRNA-mRNA de los genes que codifican a proteínas, identificadas en este trabajo, que participan simultáneamente en los procesos de fibrosis, inflamación e hipertrofia que ocurren en la ND. En rosa y numerados se señalan los mRNAs de los genes *PFN2* (1), *TJP1* (2), *TGFβ1*

(3), *Serpine1* (4), *MMP9* (5), *MMP2* (6), *Jun* (7), *JAK1* (8) y *AGER* (9); mientras que en azul claro se representan los miRNAs que potencialmente interactúan con ellos.

8.3 Selección del miRNA candidato

Para seleccionar el mejor miRNA candidato para proseguir con el análisis experimental, se buscó evidencia científica en la literatura acerca de miRNAs que hayan sido validados como reguladores de JAK2 en otros contextos patológicos.

Como resultado, se seleccionó el miRNA-375 para continuar el estudio porque su interacción con el mRNA de *JAK2* está validada experimentalmente en diversos tejidos celulares como tejido prostático, pancreático, gástrico y mamario, y particularmente en cáncer gástrico (Ding, *et al.*, 2010). Esta evidencia respalda que la interacción miRNA-375-mRNA de *JAK2* es conservada en diferentes órganos y tejidos. Por otra parte, el miRNA-375 se expresa en tejido renal, incluida la línea celular HEK293, la cual es el modelo biológico de interés (Fig.18).

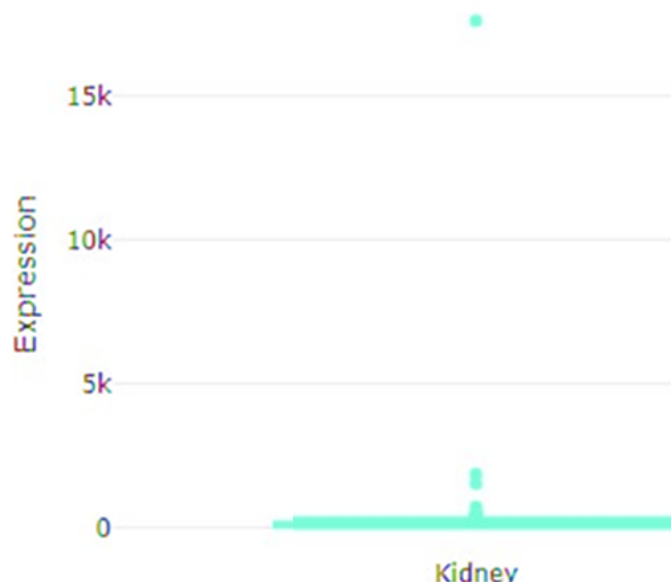


Figura 18. Expresión del miRNA-375 en riñón humano. Dato obtenido de miRNA Tissue Atlas.

8.4 Selección de circRNAs candidatos

La búsqueda de los circRNAs que interactúan con el miRNA-375 en la base de datos CIRCpedia v2 reveló que 37 circRNAs potencialmente se unen a él. De ellos solamente 11 circRNAs se expresan en tejido renal y otros 7 que aunque no se expresan en el riñón si lo hacen sus genes parentales (Tabla 5, Fig. 19).

Tabla 5. RNA circulares que interactúan potencialmente con el miRNA-375 y que sus genes parentales o ellos se expresan en tejido renal		
circRNAs que potencialmente interactúan con miRNA-375	circRNAs expresados en tejido renal	circRNAs cuyo gen parental es expresado en tejido renal
hsa_circ_0006371 hsa_circ_0070962 hsa_circ_0032731 hsa_circ_0032969 hsa_circ_0058530 hsa_circ_0078059 hsa_circ_0078465 hsa_circ_0014186 hsa_circ_0005229 hsa_circ_0098465 hsa_circ_0098466 hsa_circ_0001392 hsa_circ_0002073 hsa_circ_0004576 hsa_circ_0025868 hsa_circ_0039350 hsa_circ_0036032 hsa_circ_0085076 hsa_circ_0056333 hsa_circ_0069980 hsa_circ_0106572 hsa_circ_0114399 hsa_circ_0002073 hsa_circ_0002389 hsa_circ_0045229	hsa_circ_0006371 hsa_circ_0032731 hsa_circ_0032969 hsa_circ_0058530 hsa_circ_0078059 hsa_circ_0078465 hsa_circ_0014186 hsa_circ_0005229 hsa_circ_0001392 hsa_circ_0002073 hsa_circ_0004576	hsa_circ_0025868 hsa_circ_0039350 hsa_circ_0036032 hsa_circ_0085076 hsa_circ_0070962 hsa_circ_0056333 hsa_circ_0069980

hsa_circ_0062535 hsa_circ_0062536 hsa_circ_0093487 hsa_circ_0095359 hsa_circ_0097614 hsa_circ_0108697 hsa_circ_0110818 hsa_circ_0115150 hsa_circ_0117260 hsa_circ_0125342 hsa_circ_0139059 hsa_circ_0139073		
--	--	--

A partir del análisis de los parámetros termodinámicos de unión circRNA-miRNA (energía libre de unión < -4 kCal/mol; energía libre mínima < 42 kCal/mol y regiones semilla de 7 y 8mers) se seleccionaron cinco circRNAs candidatos expresados en tejido renal que eran capaces de establecer interacciones estables para analizar su expresión en las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 19). Los circRNAs seleccionados fueron: hsa_circ_0014186, hsa_circ_0001392, hsa_circ_0004576, hsa_circ_0032969 y hsa_circ_0078465. También se seleccionaron, para realizar el análisis experimental, cuatro circRNAs (0025868, 0039350, 0036032 y 0085076) que se unían al miRNA-375, que aunque no se expresaban en tejido renal, si se expresaban sus genes parentales.

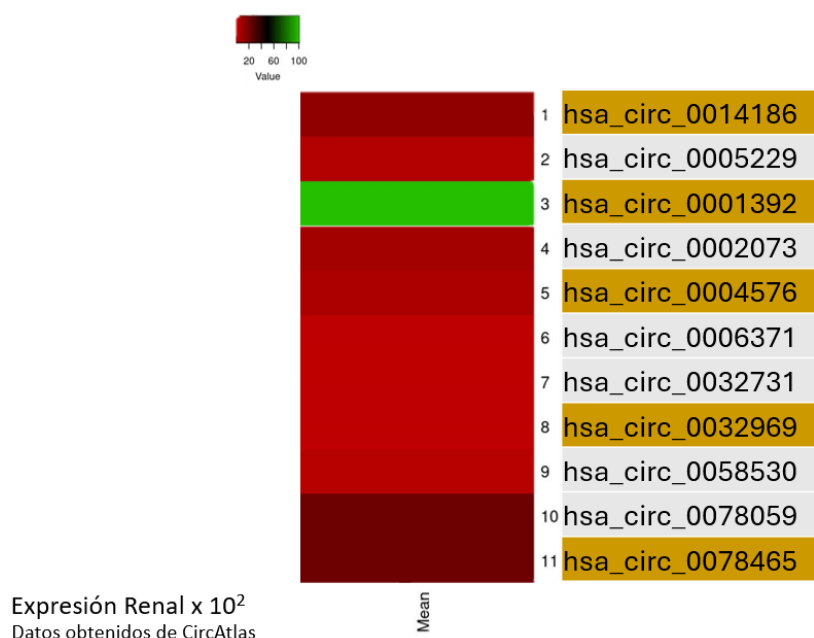


Figura 19. Expresión renal de los circRNAs que interactúan con el miRNA-375.

El mapa de calor que ilustra la expresión renal se multiplicó por 10². En color café se marcan los circRNAs seleccionados para realizar el análisis experimental. Los datos se obtuvieron de CircAtlas.

8.5 Análisis de la expresión de *JAK2*, *STAT3*, *RAGE*, y proteínas de la matriz extracelular

Se cuantificó mediante RT-PCR la expresión de *AGER*, *JAK2*, *STAT3*, *colágeno 4* (*COL4A1*), y *fibronectina 1* (*FN1*) en las células AD293 expuestas a diferentes condiciones experimentales (glucosa 5.5 mM, glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más AGEs de lisina, CML 50 µg/ml) durante 2, 24 y 48h.

La expresión de *RAGE* mostró una tendencia a incrementarse a medida que transcurría el tiempo de tratamiento de 2 a 48h, siendo significativamente ($p < 0.05$) mayor a las 24-48h en presencia de glucosa y AGEs de lisina, lo cual significa que se activó el eje AGE-RAGE desde las 2 horas de tratamiento y por tanto, estábamos en condiciones de analizar la expresión del resto de los genes (Fig. 20).

La expresión de *FN1* y *COL4A1* también mostró un incremento considerable en presencia de glucosa 30 mM y CML durante 48 horas, con cambios de expresión estadísticamente significativos en comparación con la ocurrida en las células cultivadas en las condiciones control ($p < 0.05$) (Fig. 20). Sin embargo, la expresión de fibronectina disminuye en el transcurso del tiempo para incrementarse ligera pero significativamente con respecto al control ($p < 0.05$) a las 48h de tratamiento con glucosa 30 mM más CML (Fig. 20). Por otro lado, la expresión de colágeno aunque se incrementó en presencia de glucosa 30 mM más CML a las 2h de tratamiento, su expresión comienza disminuir en el tiempo y no mostró cambios significativos en respuesta al incremento de la concentración de glucosa y la adición de AGEs de lisina (CML) durante 48 horas ($p \geq 0.05$) (Fig. 20).

Estos resultados pueden sugerir que hay una respuesta temprana al incremento de las concentraciones de glucosa y la presencia de AGEs de lisina pero que tal vez por un fenómeno de retroalimentación negativa se inhibe la expresión de fibronectina y colágeno cuando el estímulo es mantenido en el tiempo.

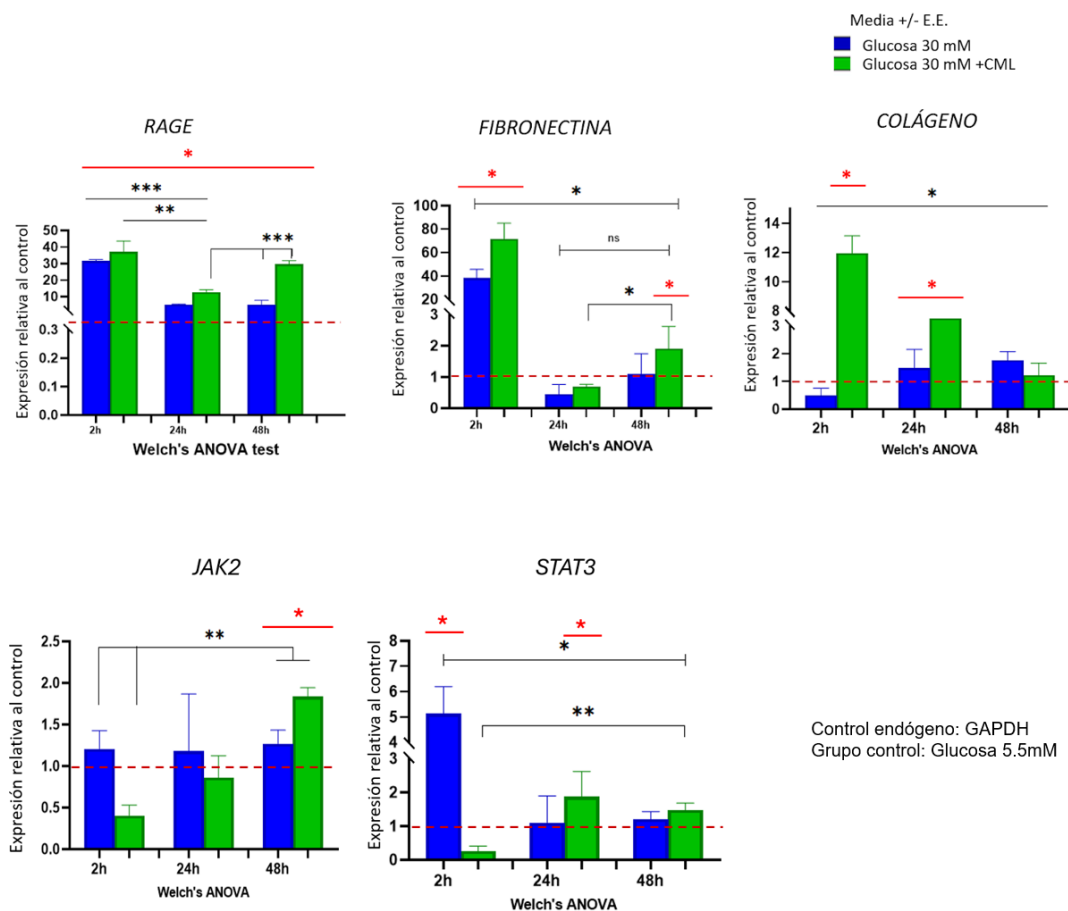


Figura 20. Análisis de la expresión relativa respecto a la condición control (glucosa 5.5 mM) de *RAGE*, *FIBRONECTINA 1*, *JAK2*, *STAT3* y *COLÁGENO IV* en células AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 2, 24 ó 48 horas. La línea roja discontinua marca el valor umbral; valores por encima o debajo de este punto, se considera un cambio de expresión respecto a la condición control ($p < 0.05$). La barra azul tratamiento glucosa 30 mM y la verde glucosa 30 mM y CML (50 ug/ml).

La expresión de *JAK2* en los grupos tratados con glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML no se modificó con respecto al control en las primeras 2 a 24 h (Fig. 20). Sin embargo, a las 48 h se incrementó significativamente ($p < 0.05$) la expresión con respecto al control en las dos condiciones ensayadas (Fig. 20). En el caso de *STAT3* su expresión en el grupo tratado con glucosa 30 mM aumentó

significativamente en comparación con el grupo control a las 2h, lo que indica el impacto inicial de los niveles altos de glucosa sobre este gen, destacando la expresión mínima en el grupo de glucosa 30 mM más CML, aunque, este último resultado también podría deberse a variaciones experimentales (Fig. 20). A las 24 h y 48 h de exposición glucosa elevada y CML, la expresión de *STAT3* disminuye con respecto a las 2h pero es significativamente diferente de la expresión en el grupo control ($p < 0.05$) sugiriendo que los niveles de *STAT3* se mantienen elevados durante toda la exposición a las condiciones ensayadas y la resistencia del efecto y por tanto de sus consecuencias.

Estos resultados sugieren que *JAK2* y *STAT3* podrían ser posibles blancos terapéuticos en el contexto de la ND, ya que ellos participan en vías de señalización relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación celular, apoptosis y respuesta inmune en el proceso fisiopatológico de la ND (Li X, Wang Y, *et al.*, 2018). Sin embargo, sería necesario investigar los mecanismos por los cuales se modula su expresión cuando se incrementan los niveles de glucosa, por lo que se exploró la posibilidad de que esta modulación pudiera ser realizada por RNAs no codificantes.

8.6 Análisis de la expresión del miRNA-375 en células de la línea celular AD293 sometidas a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina (CML)

Es conocido que los miRNAs pueden modular la expresión génica al inhibir la traducción del mRNA o promover su degradación. En este trabajo se identificó mediante minería de datos que el miRNA-375 era capaz de interactuar potencialmente con el mRNA de *JAK2* (acápite 8.3 Resultados). Adicionalmente se verificó que este miRNA se expresa en el riñón en condiciones fisiológicas (Fig. 18) y que además ha sido reportado que interactúa con el mRNA de *JAK2* en otros procesos patológicos (Chen, *et al.*, 2017; Wei, *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que en este trabajo se encontró que la expresión de *JAK2* está incrementada a las 48h de exposición a glucosa 30 mM y AGEs de lisina y que estas condiciones son las que más se asemejan a la hiperglucemia persistente que se observa en los pacientes diabéticos se decidió analizar solamente la expresión del miRNA-375 a dicho tiempo de exposición. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del miRNA-375 se reprimió en las células expuestas a glucosa 30 mM y en glucosa 30 mM más AGEs de lisina, con una expresión relativa con respecto a la condición control (glucosa 5.5 mM) estadísticamente significativa menor ($p < 0.05$) sobre todo cuando se añadían los AGEs de lisina (Fig. 21) .

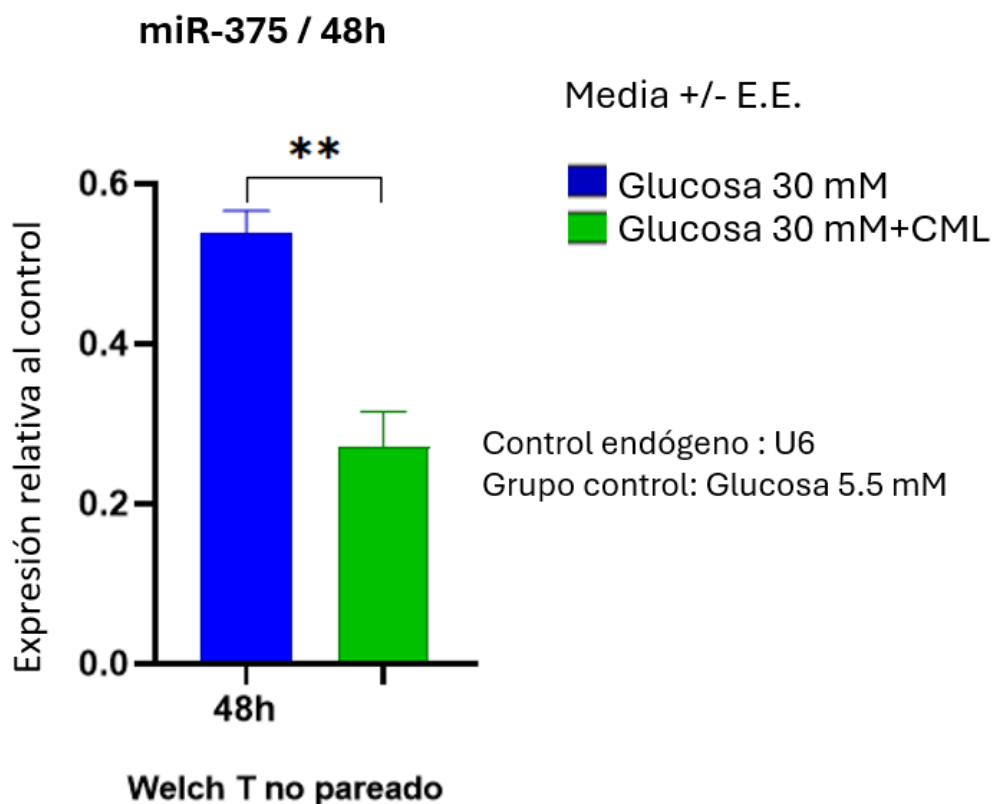


Figura 21. Análisis de la expresión relativa del miRNA-375 en células de la línea celular AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 48 horas. Los datos están representados como expresión relativa con respecto a la de las células en condiciones de control

(glucosa 5.5 mM) normalizadas contra la expresión del control endógeno (U6).

Estos resultados podrían explicar el incremento que se observa en la expresión de *JAK2*, ya que si disminuye la expresión del miRNA-375, debe haber un incremento en la cantidad de moléculas de mRNA de *JAK2*, que se detectan en la RT-PCR como se pudo constatar en los resultados mostrados en la Fig. 20, ya que esas moléculas no son capturadas por el miRNA.

La producción (aumento o disminución), estabilidad y función de los miRNAs puede modificarse debido a factores externos como el estrés o la exposición a sustancias nocivas, pero también a mecanismos celulares como la regulación epigenética, por ejemplo, mediante la desacetilación de histonas, o los cambios en la biogénesis de los miRNAs durante enfermedades, sin que se conozca exactamente el mecanismo por el cual ocurre, o porque son capturados por otros RNA no codificantes como los RNA circulares o los largos no codificantes.

En este trabajo se decidió explorar si la disminución de la expresión del miRNA-375 que observamos en las condiciones experimentales ensayadas pudiera deberse a que esas moléculas son capturadas por RNA circulares (circRNAs).

8.7 La expresión de los circRNAs candidatos

Para corroborar preliminarmente la hipótesis de este trabajo, se midió la expresión de los circRNAs 0014186, 0001392, 0004576, 0032969, 0078465, 0025868, 0036032, 0039350, y 0085076 en las células tratadas en las condiciones mencionadas durante 48h. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, esos nueve circRNAs interactúan potencialmente con el miRNA-375 (Tabla 4) Cinco de los circRNAs mencionados se expresan en riñón en condiciones fisiológicas (0014186, 0001392, 0004576, 0032969 y 0078465) y los otros cuatro (0025868, 0036032, 0039350, y 0085076) no está reportada su expresión en riñón, pero sí la de sus genes parentales.

Se encontró que los circRNAs 0025868 y 0039350 incrementaron significativamente ($p < 0.05$) su expresión con respecto al control en las condiciones de tratamiento ensayadas (Fig. 22). Estas moléculas pudieran ser las responsables de la represión del miRNA-375, pero para demostrarlo sería necesario silenciarlos en las mismas condiciones de tratamiento y medir qué sucede con la expresión del miRNA 375 y de *JAK2*.

Otro hallazgo fue la disminución ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de los circRNAs 001392, 0032969, 0014186 y 0036032 cuando se incrementaban las concentraciones de glucosa en el medio y/o adicionalmente se añadía AGEs de lisina en comparación con el grupo control (Fig. 22). Por otra parte, la expresión de los circRNAs 0004576, 0078465 y 008576 en las dos variantes de tratamiento utilizadas no se modificó con respecto a la condición control (Fig. 22). Estos resultados sugirieron que esos siete circRNAs no son responsables de la represión del miRNA-375 encontrada en este trabajo.

Sin embargo, es importante destacar que la disminución de la expresión de los circRNAs 001392, 0032969, 0014186 y 0036032 en las condiciones de tratamiento con glucosa a 30 mM utilizadas permite proponer nuevas moléculas a las cuales se les modifica su expresión durante los eventos de hiperglicemia y que habría que estudiar en cuáles mecanismos están involucradas y/o verificar si son simplemente marcadores de ese estado.

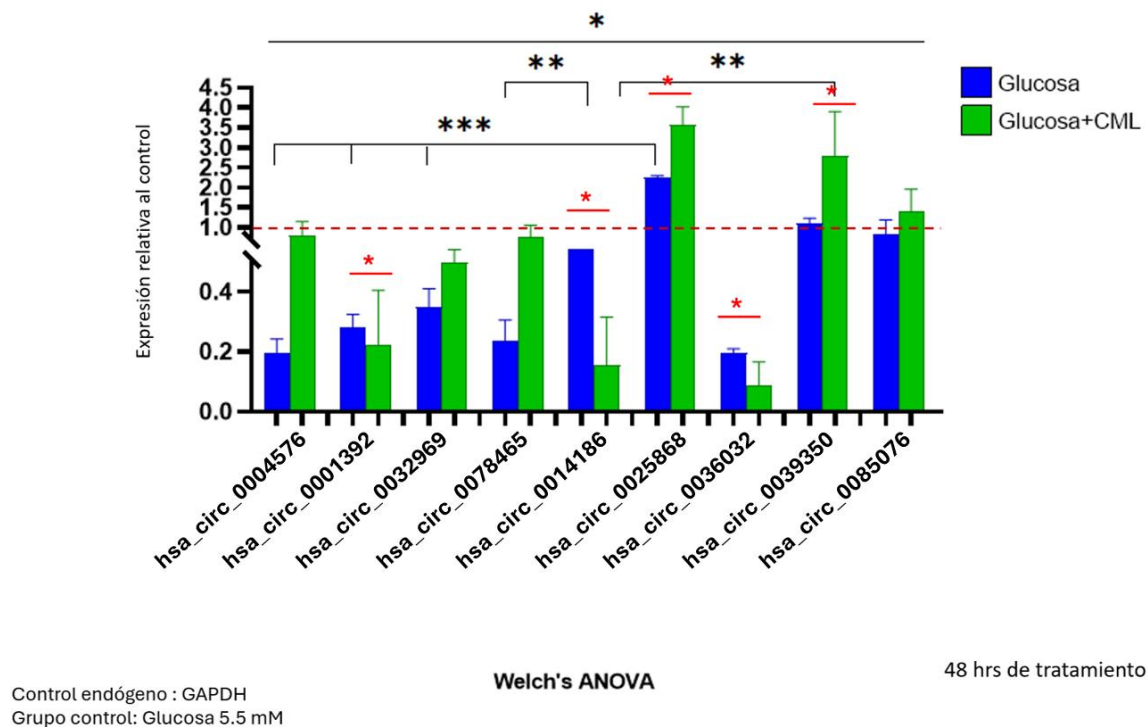


Figura 22. Análisis de la expresión relativa de diferentes RNAs circulares en células de la línea celular AD293 expuestas a glucosa 30 mM o glucosa 30 mM más CML (AGEs de lisina) durante 48 horas. Los datos están representados como expresión relativa en relación con la de las células en condiciones control (glucosa 5.5 mM) normalizadas contra la expresión del control endógeno (GAPDH). En el eje de las ordenadas se muestra el nombre de cada uno de los circRNAs estudiados. La línea roja discontinua marca el valor umbral; valores por encima o debajo de este punto, se considera un cambio de expresión respecto a la condición control ($p < 0.05$).

8.8 Análisis de la abundancia de las proteínas JAK2 y RAGE en las diferentes condiciones experimentales ensayadas

Posteriormente, se analizó la abundancia de JAK2 y RAGE mediante electroforesis, en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 12%, de los extractos celulares de AD293 obtenidos en las tres condiciones de tratamiento descritas. Los resultados obtenidos sugieren un aumento en la abundancia tanto de JAK2 como de RAGE en condiciones caracterizadas por altos niveles de glucosa y la presencia

de CML, en marcado contraste con las condiciones de normoglucosa (Fig. 23). El incremento en la abundancia de RAGE cuando se trataban las células con glucosa 30 mM y AGEs de lisina confirma la activación de la vía AGE-RAGE en las condiciones de tratamiento empleadas en nuestro modelo celular y que por tanto es plausible el uso de dicho modelo para reproducir las condiciones de hiperglucemia persistente observadas en el individuo diabético.

En particular, en el análisis de Western Blot, JAK2 mostró una ligera disminución en la expresión en condiciones de alto contenido de glucosa en comparación con el grupo control, mientras que se observó una regulación positiva importante en presencia de CML (Fig. 23). Estas observaciones están acordes con los hallazgos de qRT-PCR, donde se identificó una tendencia similar en la expresión del mRNA de *JAK2* (Fig. 20). A las 48 h, el grupo tratado con glucosa mostró sólo un aumento discreto en los niveles de mRNA de *JAK2* en comparación con el grupo control, mientras que el grupo con AGEs de lisina mostró un aumento estadísticamente significativo. Esta congruencia entre los patrones de expresión de proteínas y mRNA sugirió que la regulación de *JAK2* en respuesta a glucosa y la CML puede ocurrir principalmente a nivel transcripcional.

El hecho de que la abundancia de *JAK2* disminuya en condiciones de niveles altos de glucosa al igual que la cantidad de mRNA, en contraste con la regulación positiva sustancial en presencia de CML, indica una sinergia potencial entre la glucosa y los AGEs de lisina, en donde su impacto combinado sobre *JAK2* se vuelve más pronunciado con el tiempo. Además, implica que el desarrollo y la progresión de la ND pueden implicar vías intrincadas y dependientes del tiempo asociadas con estos cambios moleculares.

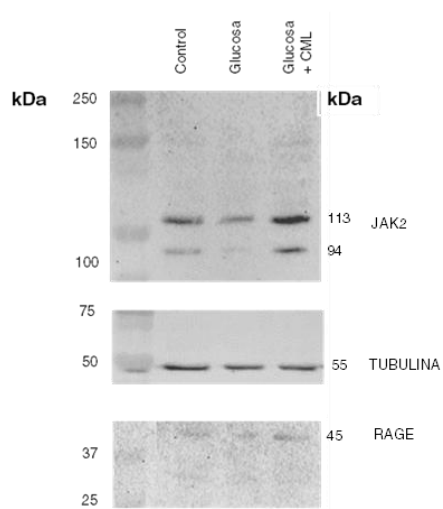


Figura 23. Efecto de las altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina sobre los niveles de JAK2 y RAGE en la línea celular AD293. Imagen representativa del análisis por Western Blot de los niveles de JAK2 después de tratar las células AD293 con glucosa 30 mM (Glucosa) o glucosa 30 mM y AGEs de lisina (Glucosa + CML) durante 48h. En la condición Control se utilizó glucosa 5.5 mM. En el panel superior se muestran los resultados relativos a JAK2, mientras que en el inferior a RAGE. Se utilizó beta-tubulina como control de carga y los resultados se muestran en el panel intermedio. A la derecha se indica el peso molecular estimado en kDa.

9. Discusión

En el mecanismo fisiopatológico de la nefropatía diabética se han involucrado cambios en la expresión de múltiples proteínas, los cuales ocurren debido a la activación o represión de vías moleculares por la hiperglucemia persistente y las alteraciones hemodinámicas que se observan en esta enfermedad (Ratan, *et al.*, 2025). Entre las principales alteraciones que se observan durante la hiperglucemia persistente, y por ende en la DM, se encuentran el proceso inflamatorio, la acumulación de la MEC, el estrés oxidativo y la activación de la PKC (Giacco, *et al.*, 2010).

El proceso inflamatorio se origina por la desregulación que ocurre en la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, la cual es dirigida por la activación de factores de transcripción como NF- κ B y la vía de señalización JAK/STAT, lo que conduce a la infiltración de las células del sistema inmune en el tejido y su posterior fibrosis (García-García, *et al.*, 2014). A su vez, se incrementa la síntesis y disminuye la degradación de los componentes de la MEC como colágeno y fibronectina, lo cual contribuye a la fibrosis glomerular y tubulointersticial (García-García, *et al.*, 2014). Este incremento en la expresión de fibronectina y colágeno fue también corroborados en nuestro estudio, donde se constató dicho incremento sobre todo a las 2h de exposición de las células AD293 a concentraciones elevadas de glucosa (30 mM) y AGEs de lisina (Fig. 20). Sin embargo, ese efecto disminuyó con el paso del tiempo, aunque la expresión de esas moléculas se mantuvo discretamente mayor que en la condición control hasta las 48 h.

Estos resultados coinciden con los de Kreisberg *et al.* (1994), quienes reportaron que los niveles elevados de glucosa (30 mM) inducían una cascada de transcripción temprana en células mesangiales, que alcanza el mayor aumento en la expresión de *c-fos* a los 15-30 minutos, seguido de un aumento sostenido de *c-jun* a partir de las 2 horas. Ambas moléculas forman parte del complejo AP-1 que regula

positivamente la expresión de genes de la MEC como la fibronectina, cuyos niveles se mantienen elevados hasta por 48 horas.

De forma semejante, Liu Y *et al.* (2014) encontraron que concentraciones elevadas de glucosa (30mM) inducían la fosforilación de caveolina-1 (cav-1), en células mesangiales a la hora de la exposición, alcanzando un pico a las 1.5 horas.

Cav-1 es una proteína que ayuda a mantener la homeostasis energética y media la transducción de señales del metabolismo de glucosa y lípidos, la homeostasis del colesterol, la autofagia y la respuesta al estrés oxidativo. (Luo, et al., 2021; Pereira-Prado, et al., 2017). En presencia de algunas patologías, estas funciones se ven comprometidas por modificaciones aberrantes como su fosforilación sostenida, y dicha fosforilación genera una disfunción mitocondrial, un aumento de ROS y regula positivamente la producción de fibronectina y su consecuente expresión, desencadenando una cascada rápida de señalización profibrótica (Liu et al., 2014; Pereira-Prado, et al., 2017).

El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno es otro de los fenómenos que se observan durante la hiperglicemia, lo cual conduce a la desregulación en la producción de enzimas antioxidantes, y por tanto al incremento en el estrés oxidativo y daño a las células renales. Aunque en este trabajo no estudiamos de manera directa y por tanto, no cuantificamos el incremento en el estrés oxidativo producto de la exposición de las células renales a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina, si medimos la expresión del receptor de AGEs (RAGE). Este receptor está en la superficie del endotelio vascular y es el encargado de unir los AGEs circulantes. Estos AGEs se forman por la glicación irreversible de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Al unirse a su receptor, los AGEs desencadenan vías de señalización que pueden provocar la formación de especies reactivas de oxígeno, incrementar el estrés oxidativo y activar la transcripción de múltiples genes que codifican moléculas proinflamatorias o que participan en la acumulación de MEC. A su vez, la formación de especies reactivas de oxígeno contribuye a la formación de una mayor cantidad de AGEs, y por tanto,

mayor interacción AGE-RAGE, lo cual perpetúa sus efectos negativos (Patil *et al.*, 2022).

Otro fenómeno importante, que no fue estudiado en este trabajo, es la activación de las diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC- α , PKC- β) lo cual contribuye al incremento en la permeabilidad vascular, al engrosamiento de las membranas basales y al aumento en la expresión de factores profibróticos como por ejemplo el TGF β y VEGF (Noh, *et al.*, 2007).

En los procesos anteriormente mencionados se desregulan múltiples proteínas, por lo que su identificación, detección temprana, así como la investigación acerca de los factores que pudieran modular esa desregulación son útiles para la identificación de nuevos blancos terapéuticos, así como también de biomarcadores tempranos de la enfermedad.

Por todo lo anterior, el primer objetivo de este trabajo fue identificar, mediante análisis de minería de datos, proteínas que se expresaran en tejido renal y que estuvieran desreguladas en pacientes con ND. Si bien, todas las proteínas que identificamos pudieran no ser el universo de proteínas desreguladas en la ND en la actualidad constituyen un conjunto importante de ellas (Tabla 2). Es interesante que la mayoría de las proteínas que identificamos participan de una manera u otra en la vía de señalización AGE-RAGE (Fig. 11), lo cual confirma el papel de esta vía en el desencadenamiento de los procesos de fibrosis, hipertrofia e inflamación renal en la ND, tal y como ha sido reportado por otros autores (Yamagishi, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2021; Pathomthongtawechai, *et al.* 2020).

Es conocido que los AGEs se metabolizan fundamentalmente a nivel renal (Fotheringham, *et al.*, 2022) lo cual puede explicar el rol de esta vía en el desarrollo de la ND. Además, los procesos biológicos en los cuales participa la mayoría de las proteínas identificadas son la unión a filamentos de queratina, la autofagia de mitocondrias, y la formación de MEC conteniendo colágeno (Fig. 12), lo cual coincide con los principales procesos que se han reportado en la ND (Yamagishi, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2021). Lo mismo sucede con los componentes celulares, donde

están enriquecidas las 59 proteínas identificadas, los cuales fueron regiones de unión a proteasas, de regulación positiva de los procesos biosintéticos de macromoléculas y de organización de la MEC, lo cual corrobora el involucramiento de estas proteínas en procesos de importancia en la fisiopatología de la ND (Nakatani, 2012).

Teniendo en cuenta los principales procesos patológicos que ocurren en la ND (inflamación, fibrosis e hipertrofia) en este trabajo nos concentramos en identificar cuáles de ellas participan simultáneamente en los 3 procesos que caracterizan a la ND (Fig. 13) por lo que se eligieron como candidatas para continuar el estudio. Esas proteínas han sido reportadas de manera aislada por otros autores. Por ejemplo, TGF β 1 es reconocido por ser el principal efector profibrótico en la ND, además de su papel en la hipertrofia celular y en la activación de vías proinflamatorias (Pantsulaia, *et al.*, 2006; Zhang, *et al.*, 2021). Mientras tanto, la PFN2, es una proteína reguladora del citoesqueleto que ha sido asociada con la hipertrofia de células mesangiales y la disfunción de barreras de filtración (Lu, *et al.*, 2021). Por otro lado, la TJP1 se ha vinculado con la inflamación, la fibrosis glomerular y la glomeruloesclerosis renal (Itoh, *et al.*, 2014). Otras proteínas que también destacan son la quinasa JAK2 y el factor de transcripción STAT3, que forman parte central de la vía de señalización JAK/STAT, la cual se ha visto que tiene un papel importante en la mediación de los procesos de la ND (Liu Y, *et al.*, 2023; Yang, *et al.*, 2017).

La activación de la vía JAK/STAT es una de las principales causas del daño renal inducido por la hiperglucemia (Gurzov, *et al.*, 2016) y suele ser derivada de los procesos propios de la diabetes, tales como la presencia de AGEs y el estrés oxidativo (Liu Y, *et al.*, 2023). Dicha vía conduce a la transcripción de genes diana que codifican moléculas clave en el proceso fisiopatológico de la ND, incluyendo diferentes citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento profibróticos y reguladores del ciclo celular que promueven la hipertrofia (Liu, *et al.*, 2023; Yang, *et al.*, 2017).

Se ha observado que los glomérulos y las células túbulointersticiales de algunos pacientes con ND presentan una expresión significativamente mayor de JAK1-3,

STAT1 y *STAT3*. De ellos destaca *JAK2*, que se ha visto que su activación pudiese inducir esclerosis glomerular y fibrosis túbulo intersticial (Berthier, *et al.*, 2009).

La razón para enfocar este trabajo de investigación en el estudio de la regulación de *JAK2* es que en los últimos años se ha propuesto como un blanco terapéutico válido en diferentes enfermedades. De hecho, inhibidores específicos de *JAK2* como el ruxolitinib y el fedratinib han sido aprobados para el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas, demostrando un perfil de seguridad manejable en humanos bajos ciertas condiciones específicas (Ceccardi *et al.*, 2025; Chen, *et al.*, 2023; Panda, *et al.* 2024; Yoshikawa, *et al.*, 2018).

En este trabajo observamos que la expresión de *JAK2* no se modificó durante la exposición de las células de la línea AD293 a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina durante 2 a 24 hrs. Sin embargo, vemos un incremento significativo a las 48 horas. Esto podría significar que *JAK2* no es un sensor primario del estrés, sino un efector en la fase de establecimiento y perpetuación del daño en la nefropatía diabética (Chatterjee, *et al.*, 2024; Zhang, *et al.*, 2017). Es posible que su sobreexpresión sea consecuencia de la acumulación de AGEs en un plazo más prolongado. Grimm, *et al.* (2012), demostraron que los AGEs son capaces de inducir la expresión de genes diana mediante la activación de la vía *JAK/STAT*, a través de su receptor RAGE. Consistente con ese reporte, en este trabajo se observó que cuando las células de la línea AD293 se exponían a concentraciones elevadas de glucosa y AGEs de lisina (CML) se potenciaba la expresión de *JAK2* a las 48 horas, por lo que probablemente la acumulación de AGEs por un tiempo prolongado sea el factor responsable de inducir la activación de *JAK2* (Grimm, *et al.* 2012).

Por otra parte, también observamos que la expresión de *STAT3* estaba desregulada, alcanzando un máximo a las 2 horas. Esto podría ser por su papel como un gen de respuesta inmediata al estrés celular (Jo, *et al.*, 2016). Se ha observado que en podocitos expuestos a concentraciones elevadas de glucosa, la IL-6 activa la vía *JAK2/STAT3*, promoviendo la hipertrofia celular. Además, se ha encontrado que en los estadios tempranos de la ND se encuentra activada la vía

JAK/STAT mediante el análisis de tejido proveniente de biopsias de riñón de pacientes con ND. Es probable que la expresión máxima de STAT3 a las 2 horas de exposición a altas concentraciones de glucosa, que observamos en nuestro estudio, podría estar promoviendo el inicio de los procesos de hipertrofia celular (Jo, *et al.*, 2016).

Ha sido reportado que el miRNA-375 tiene como blanco el mRNA de *JAK2* (Ding, *et al.*, 2010; Chen, *et al.*, 2017), lo cual fue verificado *in silico* en este trabajo (Fig. 18). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que en presencia de AGEs de lisina y/o altas concentraciones de glucosa la expresión del miRNA-375 disminuye en las células AD293 (Fig. 21), lo cual podría explicar el incremento de la expresión de *JAK2* que encontramos, incluido un discreto incremento en su abundancia proteica (Fig. 23). Por esa razón estudiamos cinco RNA circulares que se expresan en tejido renal (circRNAs 0014186, 0001392, 0004576, 0032969, 0078465) y otros cuatro que está reportada la expresión de su gen parental pero no del circRNA (0025868, 0036032, 0039350, y 0085076) esperando encontrar que la expresión de alguno de ellos estuviera incrementada. Como resultado, se encontró que los circRNAs 0025868 y 0039350 están sobreexpresados con respecto a la condición de control (baja glucosa, 5.5 mM), por lo que podrían ser los responsables de la represión del miRNA-375. Hasta el momento no ha sido reportada la sobreexpresión de estos RNA circulares ni en ND ni en células renales expuestas *in vitro* a altas concentraciones de glucosa, por lo que sería necesario realizar experimentos adicionales silenciando estos circRNAs para comprobar que efectivamente forman parte del eje circRNA 0025868/0039350- miRNA375-JAK2.

Otro resultado interesante fue la represión de la expresión de los circRNAs 0001392, 0032969, 0014186 y 0036032 cuando las células de la línea AD293 fueron expuestas a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina, lo cual tampoco ha sido reportado en la literatura y debe ser estudiado posteriormente.

Los RNA circulares que encontramos desregulados en este trabajo han sido reportados como que también se desregulan en otras patologías como la tuberculosis activa (hsa_circ_0014186, Huang, *et al.*, 2018), pero participan

regulando procesos relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación (Rodríguez-Rodríguez, 2023) los cuales también ocurren en la ND. Por otra parte, el gen parental del circRNA 0001392, el cual codifica para la Huntingtina (*HTT*), forma RNA circulares con diferente composición de exones. Uno de ellos (circHTT(2-6)) está más altamente expresado en la corteza frontal de los pacientes con enfermedad de Huntington comparado con los controles sanos, y su expresión correlaciona positivamente con la longitud de los repetidos CAG que se observa en esa enfermedad (Gantley, *et al.*, 2023). La sobreexpresión del circHTT(2-6) en la línea de células embrionarias de riñón HEK293 está reportado que reduce la proliferación celular y el tamaño nuclear sin afectar la progresión del ciclo celular y el tamaño celular o alterando la longitud de la región de repetidos CAG en el gen *HTT*, así como reduce la localización nuclear de la proteína HTT pero no su abundancia (Gantley, *et al.*, 2023). Estos eventos no han sido asociados a la fisiopatología de la ND, pero dada la represión del circRNA0001392 que observamos en nuestro estudio fuera conveniente explorar la participación de estas moléculas en el proceso de la ND o su asociación como marcador de los cambios celulares cuando se incrementan las concentraciones de glucosa. De igual forma, sería importante estudiar el rol, en el contexto de células renales sometidas a hiperglucemia, que pudieran tener los circRNAs 0032969 y 0036032, los cuales tampoco han sido estudiados en la ND, ni ha sido reportada su desregulación en otras patologías.

10. Conclusiones

1-Se identificaron 59 proteínas desreguladas en ND. La mayor parte de ellas participan en la vía AGE-RAGE, lo cual respalda el papel de los componentes de esta vía en la fisiopatología de la ND

2-Las 59 proteínas desreguladas en ND, son reguladas potencialmente por la interacción de los mRNAs de los genes que la codifican con miRNAs, los cuales son capaces de interactuar con más de una de estas proteínas a la vez. Esto generó una base de conocimientos acerca de la regulación de proteínas participantes en la fisiopatología de la ND mediante RNAs no codificantes.

3-Las proteínas JAK2 y STAT3 están desreguladas en ND y su expresión se incrementa en las células AD293 expuestas durante 48h a AGEs de lisina.

4-El miRNA-375 interactúa potencialmente con JAK2 y su expresión se reprime en las células AD293 expuestas durante 48h a AGEs de lisina.

5-La expresión de los circRNAs 0014186, 0001392, 0032969 y 0036032 se reprime en las células AD293 expuestas durante 48h a AGEs de lisina, mientras que la de los circRNAs 0004576, 0078465 y 0085076 se mantiene igual que en el control endógeno, lo cual sugiere que no son los responsables de la represión del miRNA-375, pero que pudieran estar participando en la regulación de otras proteínas involucradas en la vía AGE/RAGE.

6-La expresión de los circRNAs 0025868 y 0039350 se incrementa en las células AD293 expuestas durante 48h a altas concentraciones de glucosa y AGEs de lisina, lo cual sugiere que pudieran estar capturando al miRNA-375, e impidiendo que dicho miRNA module la expresión de sus blancos proteicos.

7-La expresión de *AGER*, *Colágeno IV* y *Fibronectina 1* tiende a incrementarse en las células AD293 tratadas con AGEs de lisina a medida que aumenta el tiempo de

exposición de 2-48h sugiriendo la activación de la vía AGE-RAGE en nuestro modelo celular y sus efectos sobre proteínas de la MEC.

8- Los resultados obtenidos sugieren un incremento en la abundancia de RAGE y JAK2 en las células AD-293 expuestas durante 48h a AGEs de lisina que correlaciona con los cambios en expresión de los genes que la codifica por lo que se puede concluir que en nuestro modelo esas moléculas son reguladas a nivel transcripcional.

11. Perspectivas

- Como perspectivas para la continuación de este trabajo se plantea la validación experimental de hsa-miR-375 como regulador negativo de JAK2.
- Asimismo, considerando que algunos RNAs circulares aumentan su expresión, resulta relevante evaluar la interacción de los circRNAs hsa_circ_0025868 y hsa_circ_0039350 con hsa-miR-375. Esta validación podría realizarse mediante el silenciamiento de los círculos, con la finalidad de determinar si su inhibición induce cambios significativo en la expresión de hsa-miR-375 y consecuentemente en la expresión de JAK2
- Adicionalmente, se sugiere realizar Western blot para otras proteínas previamente identificadas, particularmente aquellas incluidas en el clúster donde se destaca la vía AGE-RAGE.
- De manera relevante, se recomienda revisar los hallazgos en un modelo celular más específico para ND
- Finalmente, se propone analizar recomienda que otros miRNAs interactúan con los circRNAs identificados, con el proposito de determinar si alguno de ellos se encuentra relacionado con la vía AGE-RAGE u otras vías de señalización implicadas en la progresión de la ND.

12. Referencias

1. Agarwal, R. (2021). Pathogenesis of diabetic nephropathy.pp 2-7.
2. Aikaeli, F., Njim, T., Gissing, S., Moyo, F., Alam, U., Mfinanga, S. G; Garrib, A. (2022). Prevalence of microvascular and macrovascular complications of diabetes in newly diagnosed type 2 diabetes in low-and-middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. PLOS global publichealth, 2(6), e0000599.
3. Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 717(1-2), 1-8.
4. Association, A. D. (2020). Obesity management for the treatment of type 2 diabetes: standards of medical care in diabetes– 2020. Diabetes Care, 43(Suppl 1), S89-s97.
5. Annese, T., Tamma, R., De Giorgis, M., & Ribatti, D. (2020). microRNAs biogenesis, functions and role in tumor angiogenesis. Frontiers in oncology, 10, 581007.
6. Asadipooya, K., & Uy, E. M. (2019). Advanced glycation end products (AGEs), receptor for AGEs, diabetes, and bone: review of the literature. Journal of the Endocrine Society, 3(10), 1799-1818.
7. Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M.; Kadener, S. (2014). circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. Molecular cell, 56(1), 55-66.
8. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell, 116(2), 281-297.
9. Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Moreno-Banda GL, Carnalla M, Rivera JA, Romero-Martínez M, Barquera S, Barrientos-Gutiérrez T. Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. Salud Pública Mex [Internet]. 13 de junio de 2023; 65:s163-s168. Disponible en:<https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/14832>.
10. Benítez, M. B. M., Navarro, Y. P., Azuara-Liceaga, E., Cruz, A. T., Flores, J. V.; Lopez-Canovas, L. (2024). Circular RNAs and the regulation of gene expression in diabetic nephropathy. International Journal of Molecular Medicine, 53(5), 44
11. Berthier, C. C., Zhang, H., Schin, M., Henger, A., Nelson, R. G., Yee, B., ... & Kretzler, M. (2009). Enhanced expression of Janus kinase–signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. Diabetes, 58(2), 469-477.

12. Brosius FC, Tuttle KR, Kretzler M. (2016). JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease. *Diabetologia*. 59(8):1624-7. doi: 10.1007/s00125-016-4021-5.
13. Busch M, Franke S, Rüster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney. *Eur J Clin Invest*. 2010 Aug;40(8):742-55. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02317.x.
14. Campion, C. G., Sanchez-Ferras, O., & Batchu, S. N. (2017). Potential role of serum and urinary biomarkers in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy. *Canadian journal of kidney health and disease*, 4, 2054358117705371.
15. Ceccardi, A., Dameri, M., Ravera, F., Gilardi, N., Stabile, M., Lombardo, I., & Zoppoli, G. (2025). JAK2 is a critical therapeutic target in VEXAS syndrome treated with ruxolitinib. *British Journal of Haematology*, 206(2), 758.
16. Carrera Boada, C. A., & Martínez-Moreno, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2: más allá del dúo "resistencia insulina-déficit de secreción". *Nutrición hospitalaria*, 28, 78-87.
17. Chatterjee, A., Tumarin, J., & Prabhakar, S. (2024). Role of inflammation in the progression of diabetic kidney disease. *Vessel Plus*, 8, N-A.
18. Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum?. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 20(4), 546.
19. Chen, B., Guo, S., Yu, Z., Feng, Y., & Hui, L. (2017). Downregulation of microRNA-375, combined with upregulation of its target gene Janus kinase 2, predicts unfavorable prognosis in patients with gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(11), 11106.
20. Chen, B., Ning, K., Sun, M. L., & Zhang, X. A. (2023). Regulation and therapy, the role of JAK2/STAT3 signaling pathway in OA: a systematic review. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 67.
21. Davies, M. J., Aroda, V. R., Collins, B. S., Gabbay, R. A., Green, J., Maruthur, N. M., ... & Buse, J. B. (2022). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care*, 45(11), 2753-2786.
22. Dhodi, J. B., Mestry, S. N., & Juvekar, A. R. (2014). Diabetic nephropathy-genesis, prevention, and treatment. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(9), 42-7.
23. Ding, L., Xu, Y., Zhang, W., Deng, Y., Si, M., Du, Y., ... & Zhou, T. (2010). MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell research*, 20(7), 784-793.
24. ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., ... & Gabbay, R. A. (2023). Introduction and methodology:

- standards of care in diabetes—2023. *Diabetes care*, 46(Supplement_1), S1-S4.
25. Farmaki, P., Damaskos, C., Garmpis, N., Garmpi, A., Savvanis, S., & Diamantis, E. (2020). Complications of the Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Cardiology Reviews*, 16(4), 249-251.
 26. Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2022). Epidemiology of diabetes. *Medicine*.
 27. Fotheringham, A. K., Gallo, L. A., Borg, D. J., & Forbes, J. M. (2022). Advanced glycation end products (AGEs) and chronic kidney disease: does the modern diet AGE the kidney?. *Nutrients*, 14(13), 2675.
 28. Fowler, M. J. (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes*, 26(2), 77-82.
 29. Gantley L, Stringer BW, Conn VM, Ootsuka Y, Holds D, Slee M, Aliakbari K, Kirk K, Ormsby RJ, Webb ST, Hanson A, Lin H, Selth LA, Conn SJ. Functional Characterisation of the Circular RNA, circHTT(2-6), in Huntington's Disease. *Cells*. 2023 May 7;12(9):1337. doi: 10.3390/cells12091337. PMID: 37174737; PMCID: PMC10177161.
 30. García-García, P. M., Getino-Melian, M. A., Domínguez-Pimentel, V., & Navarro-Gonzalez, J. F. (2014). Inflammation in diabetic kidney disease. *World journal of diabetes*, 5(4), 431.
 31. Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
 32. Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), 1058-1070.
 33. Grimm, S., Ott, C., Hörlacher, M., Weber, D., Höhn, A., & Grune, T. (2012). Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and JAK2/STAT1. *Biochemical Journal*, 448(1), 127-139.
 34. Gudisa-Bereda (2022). Risk Factors, Complications and Management of Diabetes Mellitus. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 16(4), 409-412.
 35. Guo, J., Zheng, H. J., Zhang, W., Lou, W., Xia, C., Han, X. T., ... & Liu, W. J. (2020). Accelerated kidney aging in diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 1234059.
 36. Gurzov, E. N., Stanley, W. J., Pappas, E. G., Thomas, H. E., & Gough, D. J. (2016). The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *The FEBS journal*, 283(16), 3002-3015.
 37. Gutiérrez, B. D. (2016). Curso básico sobre diabetes. Tema 1. Clasificación, diagnóstico y complicaciones. *Farmacia profesional*, 30(1), 36-43.

38. Gutowska, K., Czajkowski, K., & Kuryłowicz, A. (2023). Receptor for the advanced glycation end products (RAGE) pathway in adipose tissue metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10982.
39. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3-14.
40. Huang, Z., Su, R., Qing, C., Peng, Y., Luo, Q., & Li, J. (2018). Plasma circular RNAs hsa_circ_0001953 and hsa_circ_0009024 as diagnostic biomarkers for active tuberculosis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2010.
41. Itoh, M., Nakadate, K., Horibata, Y., Matsusaka, T., Xu, J., Hunziker, W., & Sugimoto, H. (2014). The structural and functional organization of the podocyte filtration slits is regulated by Tjp1/ZO-1. *PloS one*, 9(9), e106621.
42. Jo, H. A., Kim, J. Y., Yang, S. H., Han, S. S., Joo, K. W., Kim, Y. S., & Kim, D. K. (2016). The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced podocyte hypertrophy. *Kidney research and clinical practice*, 35(4), 212-218.
43. Kawaguchi, S., Moukette, B., Hayasaka, T., Haskell, A. K., Mah, J., Sepúlveda, M. N., ... & Kim, I. M. (2023). Noncoding RNAs as key regulators for cardiac development and cardiovascular diseases. *Journal of cardiovascular development and disease*, 10(4), 166
44. Kalea, A. Z., Schmidt, A. M., & Hudson, B. I. (2011). Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease. *Front Biosci*, 17, 2756-2770.
45. Kay, A. M., Simpson, C. L., & Stewart, J. A. (2016). The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification. *Journal of diabetes research*, 2016.
46. INEGI. (2023). Estadísticas de defunciones registradas (EDR) 2022 (Preliminar). Comunicado de Prensa Número 644/23. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf>
47. Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. *Biomolecules*, 12(4), 542.
48. Kreisberg, J. I., Radnik, R. A., Ayo, S. H., Garoni, J., & Saikumar, P. (1994). High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney international*, 46(1), 105-112
49. Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2019). The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nature reviews genetics*, 20(11), 675-691.
50. Krochmal, M., Kontostathi, G., Magalhães, P., Makridakis, M., Klein, J., Husi, H., ... & Vlahou, A. (2017). Urinary peptidomics analysis reveals proteases involved in diabetic nephropathy. *Scientific reports*, 7(1), 15160.

51. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
52. Li, C., Su, F., Zhang, L., Liu, F., Fan, W., Li, Z., & Ma, J. (2021). Identifying potential diagnostic genes for diabetic nephropathy based on hypoxia and immune status. *Journal of Inflammation Research*, 6871-6891.
53. Li, J., Han, Y., Wang, S., Wu, X., Cao, J., & Sun, T. (2023). Circular RNAs: biogenesis, biological functions, and roles in myocardial infarction. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 4233.
54. Li, X., Yang, L., & Chen, L. L. (2018). The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Molecular cell*, 71(3), 428-442.
55. Li, X., Wang, Y., Wang, K., & Wu, Y. (2018). Renal protective effect of Paeoniflorin by inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway in diabetic mice. *Bioscience trends*, 12(2), 168-176.
56. Liu, F., Huang, J., Zhang, C., Xie, Y., Cao, Y., Tao, L., ... & Zhang, C. (2022). Regulation of podocyte injury by CircHIPK3/FUS complex in diabetic kidney disease. *International journal of biological sciences*, 18(15), 5624.
57. Liu, Y., Lu, S., Zhang, Y., Wang, X., Kong, F., Liu, Y., ... & Fu, Y. (2014). Role of caveolae in high glucose and TGF- β 1 induced fibronectin production in rat mesangial cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8381.
58. Liu, Y., Wang, W., Zhang, J., Gao, S., Xu, T., & Yin, Y. (2023). JAK/STAT signaling in diabetic kidney disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1233259.
59. Liu, Z., Yang, J., Du, M., & Xin, W. (2023). Functioning and mechanisms of PTMs in renal diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1238706.
60. Liu, Q., Cui, Y., Ding, N., & Zhou, C. (2022). Knockdown of circ_0003928 ameliorates high glucose-induced dysfunction of human tubular epithelial cells through the miR-506-3p/HDAC4 pathway in diabetic nephropathy. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 55.
61. Lotfy, M., Adeghate, J., Kalasz, H., Singh, J., & Adeghate, E. (2017). Chronic complications of diabetes mellitus: a mini review. *Current diabetes reviews*, 13(1), 3-10.
62. Lu, L., Zhong, Z., Gu, J., Nan, K., Zhu, M., & Miao, C. (2021). ets1 associates with KMT5A to participate in high glucose-mediated EndMT via upregulation of PFN2 expression in diabetic nephropathy. *Molecular Medicine*, 27(1), 74.
63. Luo, S., Yang, M., Zhao, H., Han, Y., Jiang, N., Yang, J., ... & Sun, L. (2021). Caveolin-1 regulates cellular metabolism: a potential therapeutic target in kidney disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 768100.
64. Nakatani, S., Wei, M., Ishimura, E., Kakehashi, A., Mori, K., Nishizawa, Y., ... & Wanibuchi, H. (2012). Proteome analysis of laser microdissected glomeruli

- from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(5), 1889-1897
65. Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A. (1992) Cloning and expression of RAGE: a cell Surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.*, 267, 14998–15004.
 66. Ni, L., Yamada, T., & Nakatani, K. (2024). Utility of oligonucleotide in upregulating circular RNA production in a cellular model. *Scientific Reports*, 14(1), 8096.
 67. Noh, H., & King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 72, S49-S53.
 68. Oda, Y., Nishi, H., & Nangaku, M. (2023, May). Role of inflammation in progression of chronic kidney disease in type 2 diabetes mellitus: clinical implications. In *Seminars in Nephrology* (Vol. 43, No. 3, p. 151431). WB Saunders.
 69. Pabón-Martínez, Y. V. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 289-297.
 70. Pahlevan Kakhki, M. (2014). Trizol-based RNA extraction: a reliable method for gene expression studies. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 25(1), 13-17.
 71. Pal, R., & Bhadada, S. K. (2023). AGEs accumulation with vascular complications, glycemic control and metabolic syndrome: A narrative review. *Bone*, 116884.
 72. Panda, S. P., Kesharwani, A., Datta, S., Prasanth, D. S. N. B. K., Panda, S. K., & Guru, A. (2024). JAK2/STAT3 as a new potential target to manage neurodegenerative diseases: an interactive review. *European Journal of Pharmacology*, 970, 176490.
 73. Pantsulaia, T. (2006). Role of TGF-beta in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Georgian medical news*, (131), 13-18.
 74. Pathomthongtaweethai, N., & Chutipongtanate, S. (2020). AGE/RAGE signaling-mediated endoplasmic reticulum stress and future prospects in non-coding RNA therapeutics for diabetic nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110655.
 75. Patil, N., Kelkar, A., & Sivaram, A. (2022). Prevention of protein glycation by nanoparticles: potential applications in T2DM and associated neurodegenerative diseases. *Bionanoscience*, 12(2), 607-619.
 76. Patop, I. L., Wüst, S., & Kadener, S. (2019). Past, present, and future of circ RNAs. *The EMBO journal*, 38(16), e100836.

77. Pelletier, D., Rivera, B., Fabian, M. R., & Foulkes, W. D. (2023). miRNA biogénesis and inherited disorders: clinico-molecular insights. *Trends in Genetics*, 39(5), 401-414.
78. Pereira-Prado, V., Tapia, G., & Bologna-Molina, R. (2017). CAVEOLINA-1 implicaciones fisiológicas y patológicas. *Odontoestomatología*, 19(30), 92-98.
79. Pérez-Morales, R. E., Del Pino, M. D., Valdivielso, J. M., Ortiz, A., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2019). Inflammation in diabetic kidney disease. *Nephron*, 143(1), 12-16.
80. Pérez Y. (2022) Análisis de la red de interacción circRNA-miRNA/circRNA-proteínas de la vía de señalización AGE-RAGE y su efecto sobre la expresión de genes que median la inflamación, fibrosis y la hipertrofia renal (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de la Ciudad de México
81. Pezzolesi, M. G., Satake, E., McDonnell, K. P., Major, M., Smiles, A. M., & Krolewski, A. S. (2015). Circulating TGF- β 1-regulated miRNAs and the risk of rapid progression to ESRD in type 1 diabetes. *Diabetes*, 64(9), 3285-3293.
82. Piperi, C., Goumenos, A., Adamopoulos, C., & Papavassiliou, A. G. (2015). AGE/RAGE signalling regulation by miRNAs: associations with diabetic complications and therapeutic potential. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 60, 197-201.
83. Poulsen, M. W., Andersen, J. M., Hedegaard, R. V., Madsen, A. N., Krath, B. N., Monošík, R., Bak M.J., Nielsen J., Holst B., Skibsted L.H., & Dragsted, L. O. (2016). Short-term effects of dietary advanced glycation end products in rats. *British Journal of Nutrition*, 115(4), 629-636.
84. Ramasamy, R., Vannucci, S. J., Yan, S. S. D., Herold, K., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2005). Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, 15(7), 16R-28R.
85. Ratan, Y., Rajput, A., Pareek, A., Pareek, A., & Singh, G. (2025). Comprehending the role of metabolic and hemodynamic factors alongside different signaling pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(7), 3330.
86. Regazzi, R. (2018). MicroRNAs as therapeutic targets for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(2), 153-160.
87. Sakshi, S., Jayasuriya, R., Ganesan, K., Xu, B., & Ramkumar, K. M. (2021). Role of circRNA-miRNA-mRNA interaction network in diabetes and its associated complications. *Molecular therapy Nucleic acids*, 26, 1291-1302.
88. Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., & Kleinschmidt, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3852-3856.

89. Saunders, M. A., Liang, H., & Li, W. H. (2007). Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3300-3305.
90. Selby, N. M.; Taal, M. W. (2020). An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 22, 3-15.
91. Serban, A. I., Stanca, L., Geicu, O. I., Munteanu, M. C., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2015). Extracellular matrix is modulated in advanced glycation end products milieu via a RAGE receptor dependent pathway boosted by transforming growth factor- β 1 在晚期糖基化终末产物环境中细胞外基质通过 RAGE 受体依赖性途径调节, 转化生长因子- β 1 可以促进这种调节. *Journal of diabetes*, 7(1), 114-124.
92. Silva, E. F. F., Ferreira, C. M. M., & Pinho, L. D. (2017). Risk factors and complications in type 2 diabetes outpatients. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 63(07), 621-627.
93. Sinha, S. K., & Nicholas, S. B. (2023). Pathomechanisms of diabetic kidney disease. *Journal of clinical medicine*, 12(23), 7349.
94. Steinkraus, B. R., Toegel, M., & Fulga, T. A. (2016). Tiny giants of gene regulation: experimental strategies for microRNA functional studies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(3), 311-362.
95. Stitt, A. W., Jenkins, A. J., & Cooper, M. E. (2002). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(9), 1205–1223.
96. Suzuki, D., Toyoda, M., Yamamoto, N., Miyauchi, M., Katoh, M., Kimura, M., ... & Yagame, M. (2006). Relationship between the expression of advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) mRNA in diabetic nephropathy. *Internal Medicine*, 45(7), 435-441.
97. Tang, B., Li, W., Ji, T. T., Li, X. Y., Qu, X., Feng, L., & Bai, S. (2020). Circ-AKT3 inhibits the accumulation of extracellular matrix of mesangial cells in diabetic nephropathy via modulating miR-296-3p/E-cadherin signals. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(15), 8779-8788.
98. Thomas, M. C., Brownlee, M., Susztak, K., Sharma, K., Jandeleit-Dahm, K. A., Zoungas, S., ... & Cooper, M. E. (2015). Diabetic kidney disease. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-20.
99. Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska, A. M., & Koziółkiewicz, M. (2022). Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312.
100. Umanath, K., & Lewis, J. B. (2018). Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018. *American journal of kidney diseases*, 71(6), 884-895.

101. van Dongen, K. C., Kappetein, L., Estruch, I. M., Belzer, C., Beekmann, K., & Rietjens, I. M. (2022). Differences in kinetics and dynamics of endogenous versus exogenous advanced glycation end products (AGEs) and their precursors. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 112987.
102. Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B, et al. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex.* 2010;52(Suppl 1):S19-26. <https://doi.org/10.1590/s0036-3634201000070000512>.
103. Wang, Q., Cang, Z., Shen, L., Peng, W., Xi, L., Jiang, X., ... & Huang, S. (2021). circ_0037128/miR-17-3p/AKT3 axis promotes the development of diabetic nephropathy. *Gene*, 765, 145076.
104. Wei, R., Yang, Q., Han, B., Li, Y., Yao, K., Yang, X., ... & Cui, Q. (2017). microRNA-375 inhibits colorectal cancer cells proliferation by downregulating JAK2/STAT3 and MAP3K8/ERK signaling pathways. *Oncotarget*, 8(10), 16633.
105. Wei, T. T., Yang, L. T., Guo, F., Tao, S. B., Cheng, L., Huang, R. S., ... & Fu, P. (2021). Activation of GPR120 in podocytes ameliorates kidney fibrosis and inflammation in diabetic nephropathy. *Acta pharmacologica sinica*, 42(2), 252-263.
106. Wu, X. Q., Zhang, D. D., Wang, Y. N., Tan, Y. Q., Yu, X. Y., & Zhao, Y. Y. (2021). AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. *Free Radical Biology and Medicine*, 171, 260-271.
107. Yamagishi, S. I., & Matsui, T. (2010). Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(2), 101-108.
108. Yang, M., Tian, M., Zhang, X., Xu, J., Yang, B., Yu, J., ... & Li, X. (2017). Role of the JAK2/STAT3 signaling pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Oncotarget*, 8(57), 96958.
109. Yaribeygi, H., Maleki, M., Reiner, Ž., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2022). Mechanistic view on the effects of SGLT2 inhibitors on lipid metabolism in diabetic milieu. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), 6544.
110. Yoshikawa, T., Miyamoto, M., Aoyama, T., Soyama, H., Goto, T., Hirata, J., ... & Takano, M. (2018). JAK2/STAT3 pathway as a therapeutic target in ovarian cancers. *Oncology letters*, 15(4), 5772-5780.
111. Yu, Z., Huang, Q., Zhang, Q., Wu, H., & Zhong, Z. (2021). CircRNAs open a new era in the study of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(1), 49-64.

112. Yun, J., Ren, J., Liu, Y., Dai, L., Song, L., Ma, X., ... & Song, Y. (2021). Circ-ACTR2 aggravates the high glucose-induced cell dysfunction of human renal mesangial cells through mediating the miR-205-5p/HMGA2 axis in diabetic nephropathy. *Diabetology & metabolic syndrome*, 13(1), 72.
113. Zhang, C., Cui, H., Huang, C., Kong, F., Yang, Q., Miao, P., ... & Chang, D. (2022). Interactions of circRNAs with methylation: An important aspect of circRNA biogenesis and function. *Molecular medicine reports*, 25(5), 1-15.
114. Zhang, C., Xue, S., Ren, P., Han, S., Zhou, Y., Si, Y., ... & Shang, L. (2025). Advances in the epigenetic mechanisms of diabetic nephropathy pathogenesis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2629-2639.
115. Zhang, D., Ma, Y., Naz, M., Ahmed, N., Zhang, L., Zhou, J. J., ... & Chen, Z. (2024). Advances in CircRNAs in the Past Decade: Review of CircRNAs Biogenesis, Regulatory Mechanisms, and Functions in Plants. *Genes*, 15(7), 958.
116. Zhang, H., Nair, V., Saha, J., Atkins, K. B., Hodgins, J. B., Saunders, T. L., ... & Brosius, F. C. (2017). Podocyte-specific JAK2 overexpression worsens diabetic kidney disease in mice. *Kidney international*, 92(4), 909-921.
117. Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., & Metz, T. O. (2009). A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Journal of proteome research*, 8(2), 754-769.
118. Zhang, Y., Jin, D., Kang, X., Zhou, R., Sun, Y., Lian, F., & Tong, X. (2021). Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 696542.
119. Zhou, W. Y., Cai, Z. R., Liu, J., Wang, D. S., Ju, H. Q., & Xu, R. H. (2020). Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Molecular cancer*, 19, 1-19.