

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 DE CIENCIAS GENÓMICAS

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

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

YUSSEL FERNANDO PÉREZ NAVARRO

DIRECTOR
DRA. LILIA LÓPEZ CÁNOVAS

CODIRECTOR
DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA

Ciudad de México, JUNIO, 2022

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Mauricio Castañón Arreola UACM
Secretario: Dra. Lilia López Cánovas UACM
Vocal: Dr. Jesús Valdés Flores CINVESTAV-IPN
1^{er}. Suplente: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga UACM
2^{do}. Suplente: Dra. Angeles Tecalco Cruz UACM

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dra. Lilia López Cánovas

Grado y nombre del Director

Institución del Director

CODIRECTOR

(solo en caso de existir)

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Grado y nombre del Codirector

Institución del Codirector

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la elaboración de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su ayuda económica brindada mediante la beca otorgada durante el periodo de febrero de 2020 a enero de 2022 con No. de becario: 1035170.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Lilia López Cánovas por aceptarme en su laboratorio para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, mi co-directora por su guía y aporte en el desarrollo de esta tesis y por su disponibilidad.

Quiero extender un sincero agradecimiento a la Dr. Jesús Valdés Flores, al Dr. Mauricio Castañón Arreola y a la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, por su paciencia y disponibilidad en la revisión de esta tesis.

Mi más profundo agradecimiento y sentido a mi familia. Sin su apoyo, compañía e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura investigación.

Gracias a mis padres por ser mis principales instructores, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí, por sembrar en mi la educación, les agradezco familia por enseñarme a vivir la vida con amor, con inteligencia, gracias por enseñarme la fortaleza en todo aspecto.

Gracias a mi esposa, por su paciencia, tolerancia y porque en todo momento fue un apoyo incondicional.

Gracias a mi hija por ser la fuente de mi esfuerzo, gracias por darme fuerza y sonrisas cada día.

Gracias a Dios.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Diabetes mellitus tipo 1	2
1.4 Diabetes mellitus tipo 2.....	3
1.5 Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus	4
1.6 Nefropatía diabética.....	5
1.7 La inflamación en la nefropatía diabética	6
1.8 La fibrosis en la nefropatía diabética.....	7
1.9 La hipertrofia en la nefropatía diabética	8
1.10 Elementos finales de Glicación Avanzada (AGEs).....	9
1.11 Participación de los AGEs en la nefropatía diabética.....	13
1.12 Receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE)	13
2 ANTECEDENTES PARTICULARES	18
2.1 RNA circulares: nuevos reguladores de la expresión genética.....	18
2.2 Biogénesis de los circRNAs	19
2.3 Clasificación de los circRNAs	19
2.3.1 EcircRNAs	20
2.3.2 CiRNAs.....	20
2.3.3 ElciRNAs	21
2.4 Funciones de los circRNAs	23
2.4.1 Los circRNAs regulan la expresión del gen parental.....	23
2.4.2 Interacción de los circRNAs con proteínas	23
2.4.3 Los circRNAs como esponjas de microRNAs	24

2.5 Rol de los circRNAs en la nefropatía diabética	30
3 JUSTIFICACIÓN	33
4 HIPÓTESIS	33
5 OBJETIVO GENERAL.....	34
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
7 METODOLOGÍA.....	36
7.1 Identificación <i>in silico</i> de los circRNAs que se expresan en células epiteliales renales sometidas a altas concentraciones de glucosa	36
7.2 Determinación <i>in silico</i> de la red de circRNA-miRNA-mRNA que se expresan en células epiteliales renales sometidas a altas concentraciones de glucosa (25mM)	36
7.2.1 Construcción de la red de correulación circRNA-miRNA-mRNA.....	37
7.2.2 Identificación <i>in silico</i> de los circRNAs candidatos a unirse a proteínas del eje AGE-RAGE.....	38
7.3 Análisis <i>in silico</i> del efecto de los circRNAs candidatos sobre la transcripción de sus genes parentales.....	39
7.3.1 Análisis de la expresión de los genes parentales de los circRNAs	39
7.3.2 Predicción de los sitios de unión a los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs	39
7.3.3 Predicción de sitios de unión para AP-1, c-Jun y c-Fos en los genes parentales de los circRNAs	39
7.4 Determinación de la expresión de los circRNAs candidatos en la línea celular AD-293 sometida a stress mediante AGEs de lisina.....	39
7.4.1 Mantenimiento del cultivo celular	39
7.4.2 Tratamientos con altas concentraciones de glucosa y N-ε-carboxi-metil-lisina (CML)	40
7.4.3 Ensayo de viabilidad celular	40
7.4.4 Extracción de RNA total mediante la técnica de Trizol.....	41

7.4.5 Síntesis de cDNA	41
7.4.6 Diseño de primers divergentes específicos para los circRNAs candidatos	41
7.4.7 qPCR en tiempo real	42
7.5 Análisis estadístico	42
8. RESULTADOS	45
8.1 Identificación de los circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa	45
8.2 Predicción de los miRNAs y mRNAs blancos de los circRNAs expresados en HEK293	45
8.4 Construcción de la red circRNAs-miRNAs-mRNAs	50
8.5 Predicción de las proteínas blancos de los circRNAs expresados en HEK293	54
8.6 Los circRNAs y sus genes parentales	59
8.7 Regulación de la expresión de los genes parentales de los circRNAs por los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y AP-1	64
8.8 Predicción de la unión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs	64
8.9 Determinación del tiempo óptimo de exposición a CML a partir del cual se activa la vía AGE-RAGE en la línea celular AD-293	65
8.10 Efecto de la exposición a concentraciones elevadas de glucosa y CML durante 48 h sobre la viabilidad celular en la línea AD-293	69
8.11 Efecto de la concentración de glucosa y CML sobre la expresión de los circRNAs en la línea celular AD-293	69
8.12 Efecto de la concentración de glucosa y CML sobre la expresión de <i>RAGE</i> , <i>c-Jun</i> , <i>c-Fos</i> y <i>fibronectina 1</i> en la línea celular AD-293	72
8.13 Correlación entre los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1784, circ_1461, circ_0811, circ_1821) y <i>RAGE</i> , <i>c-Jun</i> , <i>c-Fos</i> y <i>fibronectina 1</i> en la línea celular AD-293	74
9 DISCUSIÓN	76

10	CONCLUSIONES.....	82
11	PERSPECTIVAS.....	83
12	REFERENCIAS.....	84
13	ANEXO 1.....	102

Índice de tablas

Tabla 1. Los posibles mecanismos y ejes de regulación de los circRNAs en la nefropatía diabética	31
Tabla 2. Secuencia de los cebadores diseñados para amplificar los transcritos estudiados	44
Tabla 3. CircRNAs que interactúan <i>in silico</i> con c-Jun y/o c-Fos y motivos de unión a RBP predichos en su secuencia	60
Tabla 4. Genes parentales de los 17 circRNAs y evidencias de su relación con la fisiopatología de la diabetes mellitus y/o nefropatía diabética	62

Índice de figuras

Figura 1. Rol de la fibrosis e inflamación en la nefropatía diabética..	11
Figura 2. Reacciones químicas durante la formación de los productos de glicación avanzada (AGEs).....	12
Figura 3. La unión de los AGEs a RAGE induce la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citocinas y factores de crecimiento.....	16
Figura 4. Esquema de las diferentes vías asociadas en la señalización AGE-RAGE.	17
Figura 5. Biogénesis de los circRNAs.	22
Figura 6. Representación esquemática de las funciones de los circRNAs.	28
Figura 7. Biogénesis de los miRNAs.....	29
Figura 8. Distribución cromosómica de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM).....	46
Figura 9. Origen genómico de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM).....	47
Figura 10. Genes blancos que fueron seleccionados para realizar este estudio.	49
Figura 11. Predicción de los miRNAs y mRNAs.....	51
Figura 12. Predicción de la energía libre y los tipos de interacción miRNA-mRNA. ..	52
Figura 13. Red de correulación de circRNA-miRNA-mRNA involucrada en los procesos de hipertrofia, inflamación y fibrosis renal mediada por hiperglucemia.	53
Figura 14. Predicción de regiones de unión a RNA de las proteínas de interés involucradas en la vía AGE-RAGE.....	55
Figura 15. Motivos RRM conservados en c-Fos y c-Jun.	56
Figura 16. Mapas de calor de la probabilidad de las interacciones entre los circRNAs expresados en HEK293 y las proteínas implicadas en las vías de señalización NF- κ B, TG β -1 y JAK2.	58
Figura 17. Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los genes parentales de los circRNAs en tejido de riñón sano mediante la base de datos	61
Figura 18. Los genes parentales de los 17 circRNAs presentan sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y AP-1.	66
Figura 19. Predicción de la unión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs.	67

Figura 20. Expresión relativa de RAGE en la línea celular AD-293 tratada con CML (50 µg/ml) durante diferentes tiempos de incubación.	68
Figura 21. Viabilidad celular en la línea celular AD-293 cultivada bajo el tratamiento de concentraciones altas de glucosa (HG) y CML [25, 50 y 100 µg/ml].	70
Figura 22. Expresión de los circRNAs en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa y CML (25, 50 y 100 µg/ml).	71
Figura 23. Expresión de <i>RAGE</i> , <i>c-Jun</i> , <i>c-Fos</i> y <i>fibronectina 1</i> en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa y CML (25, 50 y 100 µg/ml).	73
Figura 24. Correlación entre los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1784, circ_1461, circ_0811, circ_1821) y <i>RAGE</i> , <i>c-Jun</i> , <i>c-Fos</i> y <i>fibronectina 1</i> en la línea celular AD-293.	75

Abreviaturas

AGEs	Productos finales de glicación avanzada
circRNAs	RNA circulares
CiRNAs	circRNAs intrónicos
CML	N-ε-carboxi-metil-lisina
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EcircRNAs	circRNAs exónicos
Egr-1	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
ElciRNAs	circRNAs exones-intrones
EndMT	Transición endotelial-mesenquimal
FID	Federación Internacional de la Diabetes
GLUT 4	Transportador de Glucosa 4
GSK-3β	Glucógeno sintasa cinasa-3β
HG	Concentraciones elevadas de glucosa
IL-1	Interleucina-1
IL-18	Interleucina-18
IL-6	Interleucina-6
JAK-STAT	Janus cinasa /transductores de señales y activadores de la transcripción
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
miRNAs	microRNAs
MREs	Elementos de respuesta a miRNA
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro
ND	Nefropatía diabética
NF- κB	Factor nuclear- κB
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa

PKC	Proteína cinasa C
Pre-miRNA	miRNA precursores
RAGE	Receptor de productos finales de glicación avanzada
RBPs	Proteínas de unión a RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNAm	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRM	Motivos de unión a RNA
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF -β1	Factor de crecimiento tumoral beta 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
UTR	del inglés untranslated region
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen

La nefropatía diabética (ND) es una de las principales causas de enfermedad renal terminal en todo el mundo. Se ha descrito que los RNAs circulares (circRNAs) participan en el desarrollo y progresión de la ND, sin embargo, sus mecanismos de acción siguen sin ser dilucidados. En este proyecto, se analizaron *in silico* 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM), con el objetivo de determinar su posible implicación en los procesos de fibrosis, inflamación e hipertrofia que ocurren en la ND. El análisis reveló que el 83.3% de esos circRNAs son de origen exónico. Establecimos una red de correulación circRNA-miRNA-mRNA *in silico* y buscamos motivos RRM en las proteínas involucradas en los procesos fisiopatológicos de la ND. Se predijeron 34 ejes de correulación que tienen como blanco mRNAs que codifican proteínas que participan en la vía de señalización AGE-RAGE. Se encontró que los factores de transcripción c-Jun y c-Fos tienen motivos RRM los cuales podrían estar interactuando con los circRNAs, por lo que la expresión de los genes que codifican estas proteínas podría estar modulada por la expresión de circRNAs. Se estudió también si se pudiese establecer un mecanismo de regulación por *feedback*, y para eso analizamos si los promotores de los miRNAs blancos de los circRNAs estudiados poseen sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun y c-Fos. Se encontró que los miR-1183 y miR-1200, son blancos predichos de los circ_0001461 y circ_0001784, respectivamente; además de que estos círculos interactúan *in silico* con c-Jun y/o c-Fos. Finalmente, analizamos la expresión de cinco circRNAs (circ_0001461, circ_0001784, circ_0001666, circ_0001821 y circ_0000811) que interactúan *in silico* con c-Jun y c-Fos, encontrando que los circ_0001461, circ0001666, circ_0001821 y circ_0001784 se sobreexpresan en concentraciones elevadas de glucosa y N^ε-1-carboxi-metil-L-lisina. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los circ_0001461, circ_0001666 y circ_0001821 podrían promover el desarrollo de la ND y su expresión podría correlacionar con la de *c-Jun*, *c-Fos*, y *fibronectina* las cuales son proteínas que podrían modular y/o participar en los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia cuando se activa el eje AGE-AGE.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is a leading cause of end-stage renal disease worldwide. Circular RNAs (circRNAs) have been reported to be involved in the development and progression of DN, but the molecular mechanism linking diabetic nephropathy to circRNAs remains to be elucidated. In this project, we performed *in silico* analysis of 60 circRNAs expressed in the HEK293 cell line cultured at high glucose concentrations (25 mM), with the aim of determining their possible involvement in the processes of fibrosis, inflammation and hypertrophy that occur in DN. Bioinformatic analyses revealed that 83.3% of these circRNAs are of exonic origin. We established a circRNA-miRNA-mRNA coregulation network *in silico* and searched for RRM motifs in proteins involved in the pathophysiological processes of ND. We predicted 34 coregulation axes targeting mRNAs encoding proteins involved in the AGE-RAGE signaling pathway. It was found that the transcription factors c-Jun and c-Fos have RRM motifs which could be interacting with circRNAs, so that the expression of the genes encoding these proteins could be modulated by the expression of circRNAs. We also studied whether a mechanism of feedback regulation could be established, and for this purpose we analyzed whether the promoters of the miRNA targets of the circRNAs studied possess binding sites for the transcription factors c-Jun and c-Fos. We found that miR-1183 and miR-1200, are predicted targets of circ_0001461 and circ_0001784, respectively; furthermore, these circles interact *in silico* with c-Jun and/or c-Fos. Finally, we analyzed the expression of five circRNAs (circ_0001461, circ_0001784, circ_0001666, circ_0001821 and circ_0000811) that interact *in silico* with c-Jun and c-Fos, finding that circ_0001461, circ0001666, circ_0001821 and circ_0001784 are overexpressed at elevated concentrations of glucose and N ϵ -1-carboxy-methyl-L-lysine. Taken together, these findings suggest that circ_0001461, circ0001666, and circ_0001821 could promote the development of ND and their expression could correlate with that of c-Jun, c-Fos, and fibronectin which are proteins that could modulate and/or participate in the processes of inflammation, fibrosis, and hypertrophy when the AGE-AGE axis is activated.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) se considera un trastorno metabólico crónico el cual se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) como resultado de una deficiencia absoluta o relativa de insulina, en el contexto de una disfunción de las células β , resistencia a la insulina o ambas. La DM se clasifica en una forma de aparición temprana de etiología autoinmune llamada diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y otra no autoinmune de aparición tardía conocida como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2); también, se han descrito otros subtipos clínicamente reconocibles, como la diabetes monogénica, la diabetes gestacional y posiblemente una forma autoinmune de aparición tardía (diabetes autoinmune latente en el adulto). De hecho, la DMT2 se define esencialmente como cualquier forma de diabetes que no sea de naturaleza autoinmune o monogénica (Udler M., *et al* 2018). Las personas con diabetes tienen un mayor riesgo de desarrollar una serie de enfermedades graves que ponen en peligro su vida, dando como resultado, menor calidad de vida y mayor mortalidad. La hiperglucemia provoca daño vascular generalizado que afecta al corazón, retina, riñones y sistema nervioso causando diversas complicaciones (World Health Organization, 2009).

1.2 Epidemiología

La DM es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial que no respeta estatus socioeconómico ni las fronteras entre países. De acuerdo con los datos publicados en 2019 por la Federación Internacional de la Diabetes (FID), en su 9ª edición del Atlas de la Diabetes (International Diabetes, 2021), en la actualidad 463 millones de adultos viven con diabetes. Si no se toman las medidas necesarias de prevención, se prevé que para el año 2030 578 millones de personas tendrán diabetes. Para el año 2045, esa cifra aumentará hasta 700 millones. En 2015, México fue el segundo país latinoamericano y el sexto a nivel mundial en prevalencia de este trastorno con cerca de 11,5 millones de pacientes (García-Chapa E., *et al* 2017). Las

personas que viven con diabetes están en riesgo de desarrollar un conjunto de complicaciones graves y potencialmente fatales, que derivan en una creciente necesidad de atención médica, reducida calidad de vida y estrés excesivo para las familias. Si la diabetes y sus complicaciones no se tratan de manera adecuada, los ingresos hospitalarios pueden ser frecuentes y existe un elevado riesgo de muerte prematura (International Diabetes Federation - ATLAS DE LA DIABETES DE LA FID., 2019).

1.3 Diabetes mellitus tipo 1

La DMT1 es también conocida como diabetes insulino dependiente, se presenta comúnmente desde la infancia y se considera una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción de las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. Las células β tienen como función principal la secreción de insulina en respuesta al incremento de la glucosa (Achenbach P., *et al* 2005).

Existen diversas causas por las cuales puede ocurrir la destrucción de las células β en los islotes de Langerhans, como pueden ser infecciones por virus, agentes químicos, autoinmunidad o predisposición genética (Maedler K., 2008). Durante la etapa previa al inicio de la DMT1, en el 80% de los individuos se detectan anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos o membranales de las células β pancreáticas como la descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67 (GAD65 y 67), la proteína de choque térmico 65 (HSP-65), y contra la insulina (Fathallah N., *et al* 2015). Mediante la identificación de estos anticuerpos en personas sanas, se establece el riesgo de desarrollar la enfermedad; por ejemplo, la presencia de anticuerpos contra insulina confiere un riesgo pequeño, mientras que la combinación de anticuerpos contra células de los islotes y contra GAD o insulina representa un riesgo alto de padecer DMT1 (Maedler K., 2008). Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar DMT1 la confieren algunas de las variantes de los genes del antígeno leucocitario humano de clase II (HLA clase II). Estas variantes contribuyen con el 50% del riesgo a padecer DMT1, y en particular se han encontrado asociados algunos polimorfismos genéticos

en la región que codifica para los sitios de unión de los péptidos en los antígenos HLA (Achenbach P., *et al* 2005; Fathallah N., *et al* 2015).

1.4 Diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 es una enfermedad crónica y compleja, relacionada con defectos en la secreción de insulina frecuentemente en el contexto de resistencia a esta hormona; la progresión de la enfermedad está asociada a factores genéticos, estrés metabólico e inflamación (American Diabetes Association, 2003). Sin embargo, las causas que desencadenan la DMT2 se desconocen en el 70-85% de los pacientes; al parecer, influyen diversos factores como la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), junto con factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historial familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria. Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (Fathallah N., *et al* 2015). Del 80 al 90% de las personas tienen células β pancreáticas sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (obesidad, embarazo y cortisol) mediante el incremento en su función secretora y en la masa celular (Maedler K., 2008; Donath M., *et al* 2005). Sin embargo, en el 10 al 20% de las personas se presenta una deficiencia de las células β en adaptarse, lo cual produce un agotamiento celular, con reducción en la producción y liberación de insulina (Maedler K., 2008).

Asimismo, la DMT2 se asocia con la pérdida de sensibilidad a la insulina y posteriormente con la falla en la secreción de esa hormona. La insulina mantiene la homeostasis de la glucosa regulando la captación de esta en los tejidos musculares y adiposos, a través de un proceso mediado por el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Bryant N., *et al* 2002). En células adiposas y musculares no estimuladas, GLUT4 se encuentra en el citoplasma, en pequeñas vesículas que funde como reservorios y una vez que son estimuladas se transloca constitutivamente hacia la membrana plasmática (MP), para transportar la glucosa desde la sangre al interior de los tejidos. La resistencia a la insulina, particularmente en el músculo esquelético, se asocia con una

translocación insuficiente de GLUT4 a la membrana plasmática a pesar de que sus niveles de expresión sean fisiológicos (Dugani C., y Klip A. 2005). De manera interesante, se ha demostrado que la unión de la insulina y la activación de su receptor es rápidamente seguida por el acoplamiento de los sustratos del receptor de insulina y la activación de la fosfatidilinositol 3-cinasa de clase IA (PI3K). PI3K cataliza la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃), que, a su vez, conduce a la activación de la proteína cinasa C atípica (αPKC) y AKT, enzimas requeridas para la translocación de GLUT4 inducida por insulina (Farese R., *et al* 2005; Welsh G., *et al* 2005). La activación de la vía de señalización AKT estimula diversos procesos celulares como son la fibrosis, inflamación e hipertrofia, asociados con las complicaciones crónicas de la DM (Cipolletta E., *et al* 2009; Stöckli J., *et al* 2009).

1.5 Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

Los individuos con DMT1 y DMT2 tienen mayor riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud incapacitantes y potencialmente mortales. Los niveles constantemente elevados de glucosa en sangre pueden provocar complicaciones graves que afectan al corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y el sistema nervioso. Estas complicaciones aparecen a medida que evoluciona la DM y por lo regular ocurren después de transcurridos los 10 primeros años de la enfermedad, lo cual también depende, entre otros factores, del control de los niveles de glucosa que haya tenido el paciente.

Las complicaciones crónicas de la DM se clasifican en: i) macrovasculares, que afectan a las arterias causando enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica (Cole J., *et al* 2020), ii) microvasculares, como son la, a) Retinopatía, en la que su prevalencia está asociada a la duración de la diabetes y representa la causa más frecuente de nuevos casos de ceguera entre los adultos de 20 a 74 años (Melendez-Ramirez L., *et al* 2010); b) Neuropatía, su prevalencia oscila entre el 60 % al 80 % de los pacientes y su tasa de mortalidad alcanza el 20 % en los diez años posteriores a su aparición (Vinik A., *et al* 2013); y c) Nefropatía, ocurre en el 20% al 40% de los pacientes con diabetes y es la principal causa de insuficiencia

renal (Melendez-Ramirez L., *et al* 2010). En particular, en este proyecto nos centraremos en el estudio de uno de los mecanismos de regulación post-transcripcional de las vías de señalización relacionadas con los procesos celulares patológicos que ocurren en la nefropatía diabética debido a que su prevalencia ha ido en aumento en los últimos años.

1.6 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más frecuentes y graves de la DM y se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos (Valencia W., y Florez H. 2017). La ND se considera como la disfunción de varios tipos de células del riñón y es la principal causa de insuficiencia renal (Moreno F., *et al* 2000; American Diabetes., 2003). La ND afecta aproximadamente entre el 25 y el 40 % de los pacientes con DMT2, y aproximadamente al 25 % de los pacientes con DMT1, representando la principal causa de enfermedad renal terminal (de Boer I., *et al* 2011). Esto se debe, en gran medida, a que la prevalencia de la DM está aumentando en todo el mundo como consecuencia del incremento en la incidencia de la obesidad y hábitos sedentarios de vida (Papadopoulou-Marketou N., *et al* 2018). De ahí que el aumento en la incidencia de la DM provocará un incremento en la prevalencia de la ND, si no hay una mejora inmediata en la estrategia clínica de prevención de esta complicación (Gheith O., *et al* 2015).

La ND se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular (MEC), y su progresión consta de tres pasos: i) la hipertrofia glomerular e hiperfiltración; ii) inflamación de los glomérulos y de las regiones tubulointersticiales; y iii) la reducción del número de células por apoptosis y acumulación de MEC (Makino H., *et al* 1993). La ND muestra analogía con la progresión de la insuficiencia de las células β de los islotes pancreáticos en la DMT2, es decir, hipertrofia de los islotes pancreáticos, proliferación de las células β asociada a las respuestas inflamatorias y posterior pérdida de las células β por apoptosis y fibrosis de los islotes pancreáticos (Donath M., *et al* 2011).

La fisiopatología de la ND es consecuencia del entorno diabético que favorece la acumulación y circulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), la

síntesis de factores de crecimiento y los cambios hemodinámicos y hormonales, promoviendo la liberación de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios. En conjunto, estos cambios dan como resultado la hiperfiltración glomerular, hipertensión glomerular, hipertrofia renal y la alteración de la composición glomerular, que se manifiesta clínicamente como albuminuria e hipertensión. Desde el punto de vista patológico, los riñones sufren varios cambios, como la deposición de matriz extracelular, principalmente en el mesangio, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, cambios proliferativos y atrofia tubular, lo que finalmente conduce a fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis (Umanath K., *et al* 2018).

Se han identificado tres vías principales en el desarrollo de la ND: 1) la activación de las vías de señalización del polirol y de la proteína cinasa C (PKC), producto de alteraciones en el metabolismo intracelular; 2) formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), mediada por la hiperglucemia, lo cual induce la disfunción de las células glomerulares y la activación de los macrófagos (Ramasamy R., *et al* 2011; Sourris K., *et al* 2009); 3) la activación de vías de señalización, por la interacción de los AGEs con su receptor (RAGE), relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo (Chung A., *et al* 2010). Estas tres vías inducen lesiones en las células endoteliales glomerulares, acompañadas de la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, que dan lugar a la infiltración de macrófagos en los tejidos renales (Navarro-Gonzalez J., *et al* 2011).

1.7 La inflamación en la nefropatía diabética

Varios estudios han demostrado que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la ND (Tavafi M. 2013). Las moléculas proinflamatorias, como las interleucinas-(IL-) 1, 6 y 18, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β 1) están elevadas en la sangre de los pacientes diabéticos contribuyendo al desarrollo y la progresión de la ND (Shang J., *et al* 2019; Crook M., *et al* 2001). En el 2007, Wong y colaboradores demostraron que la acumulación de células inflamatorias en el riñón, mediada por las IL-1, IL-6 e IL-18 (Wong C., *et al* 2018), promueve directamente el inicio y progresión de la ND (Figura

1). La inflamación persistente del endotelio vascular y del tejido renal, a través de diferentes mecanismos metabólicos, bioquímicos y hemodinámicos (Lim A., y Tesch G. 2012), contribuye también al desarrollo de la ND (Figura 1).

Por otra parte, se ha demostrado que uno de los elementos clave del proceso inflamatorio en la ND es la activación del factor nuclear-kappa B (NF- κ B), que es un factor transcripcional, que es activado por diferentes mediadores inflamatorios de la ND, como los AGEs, la hiperglucemia y el estrés mecánico. Además, NF- κ B regula la expresión de citocinas inflamatorias, quimiocinas y proteínas de adhesión celular, que contribuyen a la lesión renal en la ND (Navarro-González J., *et al* 2011). Una de las principales vías que se activan y transducen señales inflamatorias es la vía Janus cinasa/transductores de señales y activadores de la transcripción (JAK-STAT). JAK-STAT es una vía de señalización asociada con citocinas intracelulares que sirven como mediadores principales entre la estimulación paracrina y los receptores nucleares. Las citocinas proinflamatorias y las condiciones de hiperglucemia pueden activar mecanismos importantes que regulan la activación, proliferación, reclutamiento, migración y diferenciación celular, promoviendo el desarrollo y progresión de la ND (Shang J., *et al* 2019).

1.8 La fibrosis en la nefropatía diabética

Otro mecanismo importante que conlleva al desarrollo de ND es la fibrosis y está directamente relacionada con la inflamación. La fibrosis es la acumulación de componentes de la MEC, como el colágeno y la fibronectina, dentro y alrededor del tejido inflamado o dañado, lo que puede provocar cicatrices permanentes, mal funcionamiento de los órganos y, en última instancia, la muerte, como ocurre, por ejemplo, en la enfermedad renal terminal (Figura 1) (Srivastava S., *et al* 2013). La fibrosis del riñón es causada por una lesión prolongada y/o por procesos anormales de cicatrización de heridas, así como el depósito excesivo de MEC. En dicho proceso fibrótico, los fibroblastos renales juegan un papel importante. Los principales lugares donde se origina la fibrosis en el riñón son en el espacio tubulointersticial y en el glomérulo (Srivastava S., *et al* 2019). Por otra parte, la fibrosis de las células

mesangiales está estrechamente relacionada con la activación de la vía de señalización TGF- β 1, lo cual promueve la activación de los fibroblastos y la síntesis anormal de matriz fibrótica en las células mesangiales (Giannico G., *et al* 2007). Además, TGF- β 1 promueve la proliferación y diferenciación de células renales, la síntesis de MEC (Akhmetshina A., *et al* 2012) y la transición epitelio mesenquimal (TEM) de células epiteliales tubulares renales, que es esencial para el desarrollo de fibrosis tubulointersticial (Lin C., *et al* 2006). Es probable que estos cambios patológicos en las células mesangiales, las células endoteliales y los podocitos puedan estar interrelacionados. También se sabe que la hiperglucemia interrumpe la vía de señalización del receptor de glucocorticoides-podocitos para desencadenar la TEM y causar fibrosis glomerular en la DM. La fibrosis glomerular también se asocia con la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, que modula la fibrosis mediada por TGF- β 1 en las células mesangiales y puede activar la señalización de la glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β) e inducir la apoptosis de las células mesangiales (Hung P., *et al* 2021).

1.9 La hipertrofia en la nefropatía diabética

Como se ha mencionado anteriormente la ND, conduce a una serie de mecanismos patológicos relacionados con la hiperglucemia, que incluyen la inflamación, fibrosis y la hipertrofia (Dai H., *et al* 2017). La hipertrofia es el resultado de un mecanismo compensatorio que mantiene la capacidad funcional después de la lesión del glomérulo o de los podocitos (Kriz W., y Lemley K. 2015). Después del daño renal, el glomérulo sobreviviente experimenta un aumento del flujo sanguíneo e inicia la hipertrofia a nivel de una sola nefrona para compensar la pérdida funcional de otros glomérulos (Lee J., *et al* 2019). Sin embargo, la capacidad de replicación de los podocitos es limitada y cualquier estímulo de crecimiento da como resultado fallas en la división celular y la reorganización del citoesqueleto, lo que lleva a la degradación de estas células. Además, el crecimiento de los podocitos depende principalmente de la hipertrofia celular, mientras que el crecimiento de otras células depende de la hiperplasia celular. Finalmente, la hipertrofia glomerular hace que los podocitos sean susceptibles al

desprendimiento de los capilares y subsecuente fallo en su funcionamiento (Kriz W., y Lemley, K. V. 2015).

1.10 Elementos finales de Glicación Avanzada (AGEs)

Los elementos o también llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs) desempeñan un papel central en la génesis y progresión de las complicaciones de la DMT1 y DMT2. Estos elementos se han encontrado también en pacientes no diabéticos como un marcador de enfermedad cardiovascular (Nenna A., *et al* 2015).

Los AGEs son un grupo complejo y heterogéneo de compuestos que derivan de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que son glicosados y oxidados de forma no enzimática en un proceso que es llamado reacción de *Maillard* (Hegab Z., *et al* 2012). Las proteínas pueden experimentar reacciones de glicación no enzimática, dando como resultado una alteración de su función, ya que principalmente se glican los residuos de lisina o arginina (Thornalley P., *et al* 1999). La reacción de Maillard se inicia por la reacción de un grupo carbonilo libre de un azúcar reductor con el grupo amino libre de una proteína, lípido o ácido nucleico, dando como resultado la formación de una base de Schiff inestable; esta reacción es reversible y ocurre en pocas horas. Posteriormente, se lleva a cabo la transposición de la base de Schiff, en donde el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo adyacente al doble enlace carbono-nitrógeno de la imina se desplaza hacia el nitrógeno, formando una cetona y dando como resultado un producto de Amadori el cual sufre otras reacciones que son irreversibles (oxidación, deshidratación y degradación) generando los AGEs que son compuestos altamente estables (Schalkwijk C., *et al* 2012). Las especies dicarbonílicas (glioxal y metilglioxal) derivadas de la formación de los AGEs por la glucosa, son altamente reactivas y se consideran los intermediarios metabólicos precursores de la mayoría de los productos glicosados (Pun P., *et al* 2012) (Figura 2). Los AGEs median sus efectos a través de tres mecanismos principales: 1) entrecruzamiento con proteínas de la MEC, afectando las propiedades mecánicas de los tejidos; 2) entrecruzamiento con proteínas intracelulares, alterando sus funciones fisiológicas; y 3) unión a sus receptores de

superficie RAGE para inducir múltiples cascadas de señales intracelulares (Fuentes-Nava A. 2017).

Se sabe que los riñones son órganos vitales para la eliminación de agentes oxidantes que se encuentran en circulación, especialmente los AGEs y se ha identificado al túbulo proximal como el principal sitio de catabolismo de AGEs, por lo que esta región se vuelve un blanco fácil de daño cuando se incrementa la concentración de AGEs circulantes (Vlassara H., *et al* 2013). Los AGEs se acumulan intracelularmente en las células que componen la barrera de filtración glomerular modificando la arquitectura y función renal y activando vías de señalización intracelular por medio de la interacción de los AGEs con su receptor (Brownlee M., 1995; Brownlee M., 2001).

La glicación de las proteínas interfiere con sus funciones ya que altera su conformación molecular, su actividad enzimática, reduce la capacidad de degradación de estas y reduce su afinidad por sus receptores u otros ligandos (Hsieh C., *et al* 2007). Las proteínas de vida larga, como el colágeno, contienen numerosos residuos de lisina, hidroxilisina y arginina que son propensos a la acumulación de daños por la glicación. Los AGEs son factores que contribuyen a la patogenia de la diabetes, las cataratas, la aterosclerosis y la ND (Brownlee M., *et al* 1988; Yonekura H., *et al* 2005).

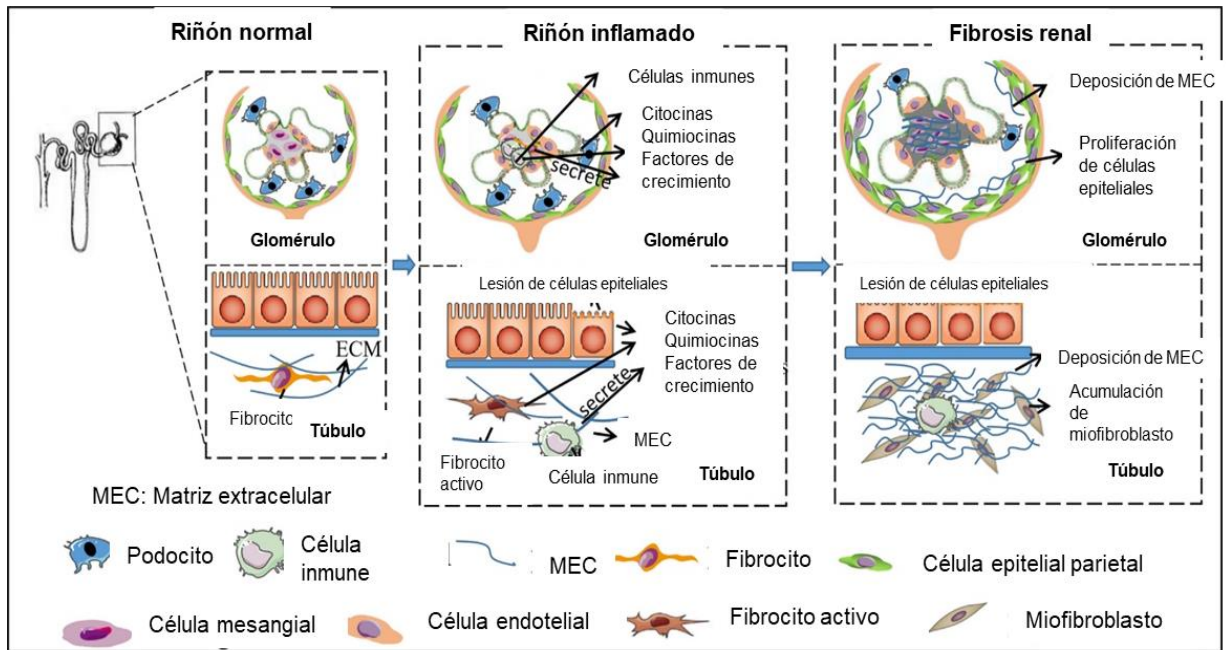


Figura 1. Rol de la fibrosis e inflamación en la nefropatía diabética. Cuando ocurre una lesión renal, las células inmunitarias circulantes se reclutan en el riñón y activan las células renales intrínsecas, como los podocitos, lo que produce factores de daño tisular, como citocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno que conducen a la acumulación de miofibroblastos y la producción de MEC. La inflamación promueve la fibrosis renal progresiva. Tomada y modificada de Jin J., *et al* 2020.

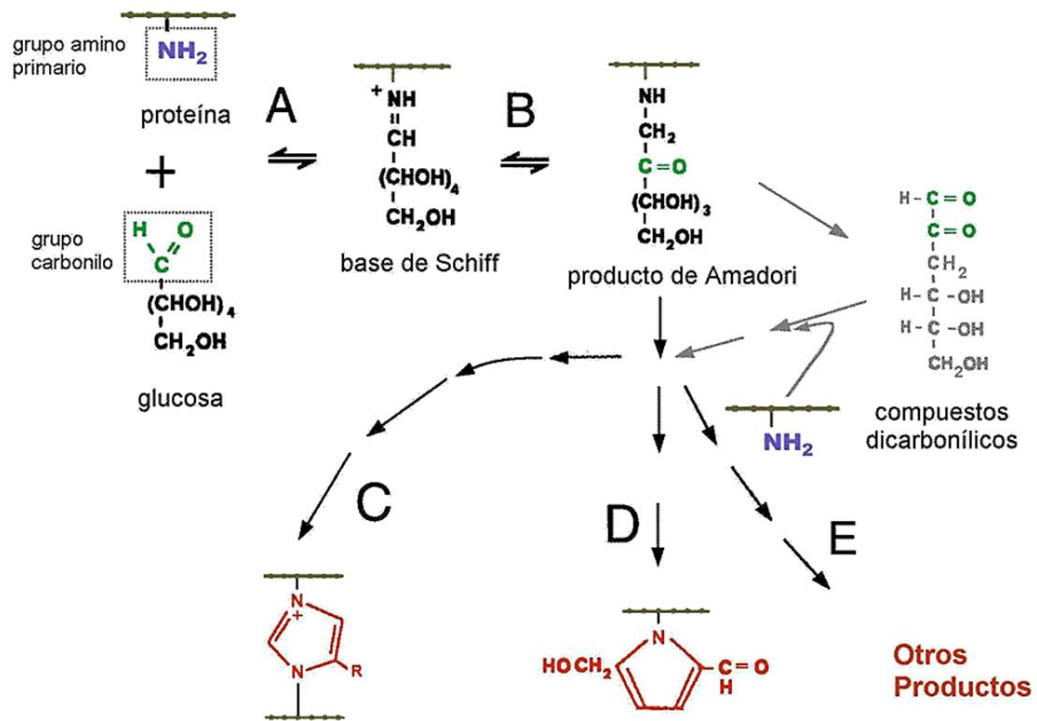


Figura 2. Reacciones químicas durante la formación de los productos de glicación avanzada (AGEs). (A) Formación de la base de Schiff. (B) Producto de Amadori. A través de una serie de reacciones químicas complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc). Tomada de Pun P., *et al* 2012.

1.11 Participación de los AGEs en la nefropatía diabética

Se ha demostrado que en pacientes con DMT1 y DMT2, los niveles de AGEs en plasma aumentan significativamente en comparación con los de personas no diabéticas (Genuth S., *et al* 2005). Además, Galler y colaboradores demostraron un incremento de casi dos veces el nivel de AGEs plasmáticos en pacientes diabéticos con enfermedad renal terminal en comparación con pacientes diabéticos sin enfermedad renal, lo que sugiere que los niveles de AGEs se correlacionan con la gravedad de la ND (Galler A., *et al* 2003). Se ha observado, que la acumulación de AGEs en el riñón puede contribuir a la alteración progresiva y la pérdida de la función renal en los pacientes a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos es provocar el entrecruzamiento de las proteínas de la MEC y el otro la activación río abajo de vías de señalización (Fukami K., *et al* 2007). Además, el aumento de la formación de AGEs, así como la disminución de su eliminación por la disfunción renal, son responsables de la acumulación de AGEs en el glomérulo renal y la matriz mesangial, promoviendo los procesos de inflamación, hipertrofia y fibrosis (Genuth S., *et al* 2005).

1.12 Receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE)

El receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) es el receptor que media los efectos de los AGEs y es expresado en muchos tipos celulares como, células endoteliales, monocitos, macrófagos, células del músculo liso, astrocitos, células mesangiales y podocitos entre otras. La expresión del *RAGE* es baja en condiciones fisiológicas, mientras que, en condiciones patológicas, como lo puede ser la inflamación crónica y la diabetes, hay una mayor expresión del receptor (Hegab Z., *et al* 2012).

El RAGE es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, consta de 394 residuos de aminoácidos, tiene un único dominio transmembranal de 19 aminoácidos y un extremo citosólico C-terminal de 43 aminoácidos y es el encargado de mediar la transducción de señal intracelular. Esta proteína, tiene extracelularmente un dominio N-terminal de unión a ligando de tipo V (Variable) precedido por dos dominios (Constantes) (Figura 3) (Bierhaus A., *et al* 2005). El RAGE actúa como un receptor de

transducción de señales para N- ϵ -carboxi-metil-lisina (CML), el principal AGE *in vivo*. Los AGEs se unen solo al dominio V de RAGE y cuando esto ocurre se desencadenan diferentes cascadas de señalización que conducen a la inflamación, fibrosis e hipertrofia, los cuales son procesos que ocurren en la ND (Kislinger T., *et al* 1999; Xie J., *et al* 2008).

Las complicaciones de la DM mediadas por la señalización AGE-RAGE incluyen neuropatía, nefropatía, otras complicaciones vasculares y síndrome del pie diabético. Además, la interacción AGE-RAGE también desempeña un papel importante en la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad, como el Alzheimer, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades renales, la hipertensión arterial, los accidentes cerebrovasculares, la discapacidad visual y las enfermedades de la piel. Dependiendo del tipo de célula y la condición fisiopatológica, la cascada de señalización activada por la vía AGE-RAGE incluyen varios miembros de las siguientes familias: la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), JAK/STAT, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K-Akt) y Rho GTPasas, factores transcripcionales, como NF- κ B y la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1). Estas vías de señalización pueden inducir la activación de diversos genes proinflamatorios y cambios fenotípicos celulares, como el estímulo a la migración, invasión, proliferación y apoptosis (Harja E., *et al* 2008; Hudson B., *et al* 2001; Zeng S., *et al* 2009). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) está implicado en la producción local de especies reactivas de oxígeno (ROS), en el aumento de la permeabilidad a la albúmina, en el reclutamiento de monocitos y en la disminución de la tasa de filtración glomerular (GFR) (Lim A., *et al* 2012). Las ROS contribuyen al daño renal en diversas formas: induciendo la disfunción endotelial renal y la microalbuminuria, la acumulación de matriz, la expansión mesangial y la fibrosis. El infiltrado de macrófagos se asocia a inflamación crónica, ya que los macrófagos pueden interactuar con las células renales para generar un microambiente proinflamatorio que amplifica el daño y promueve la fibrosis (Raimundo M., *et al* 2011).

La estimulación AGE-RAGE también activa a la enzima NADPH oxidasa dando como resultado la producción de ROS y generando estrés oxidativo. Las ROS son citotóxicas a nivel renal y a través de la activación de la vía de la MAPK, NF- κ B y de la Proteína Cinasa C (PKC), en las células mesangiales y tubulointersticiales promueven

reacciones inflamatorias y fibrogénicas por medio de la sobreexpresión del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), TGF- β y el Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (CTGF) (Tabit C., *et al* 2010; Brownlee M. 2001). Por otra parte, TGF- β no solo estimula la síntesis de la matriz, sino que también inhibe su degradación, estando involucrada en la esclerosis glomerular. De manera interesante, se ha demostrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan a TGF- β promueven la disfunción renal caracterizada por proteinuria, glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial (Goldfarb S., *et al* 2001) (Figura 4).

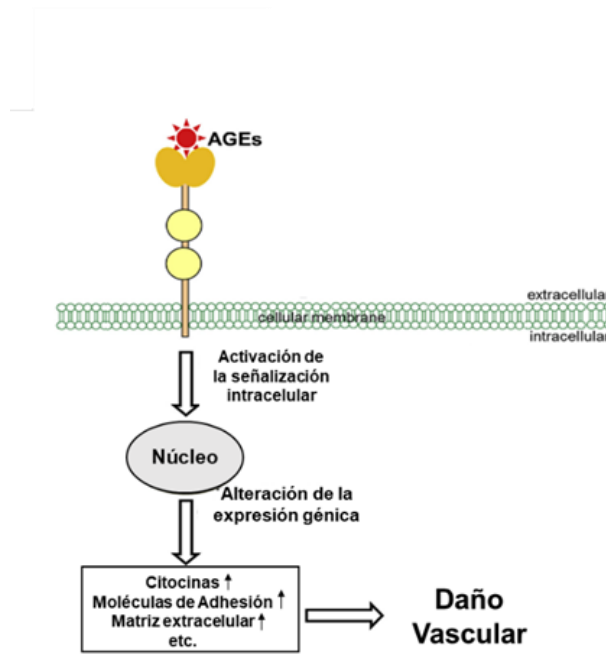


Figura 3. La unión de los AGEs a RAGE induce la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citocinas y factores de crecimiento. Los AGEs estimulan a los monocitos para que induzcan la producción y secreción de diversas citocinas, y a las células musculares lisas vasculares para que induzcan la migración, proliferación y la producción de matriz extracelular. La expresión de *RAGE* aumenta en respuesta a un incremento de los AGEs. Tomada de Bierhaus A., *et al* 2005.

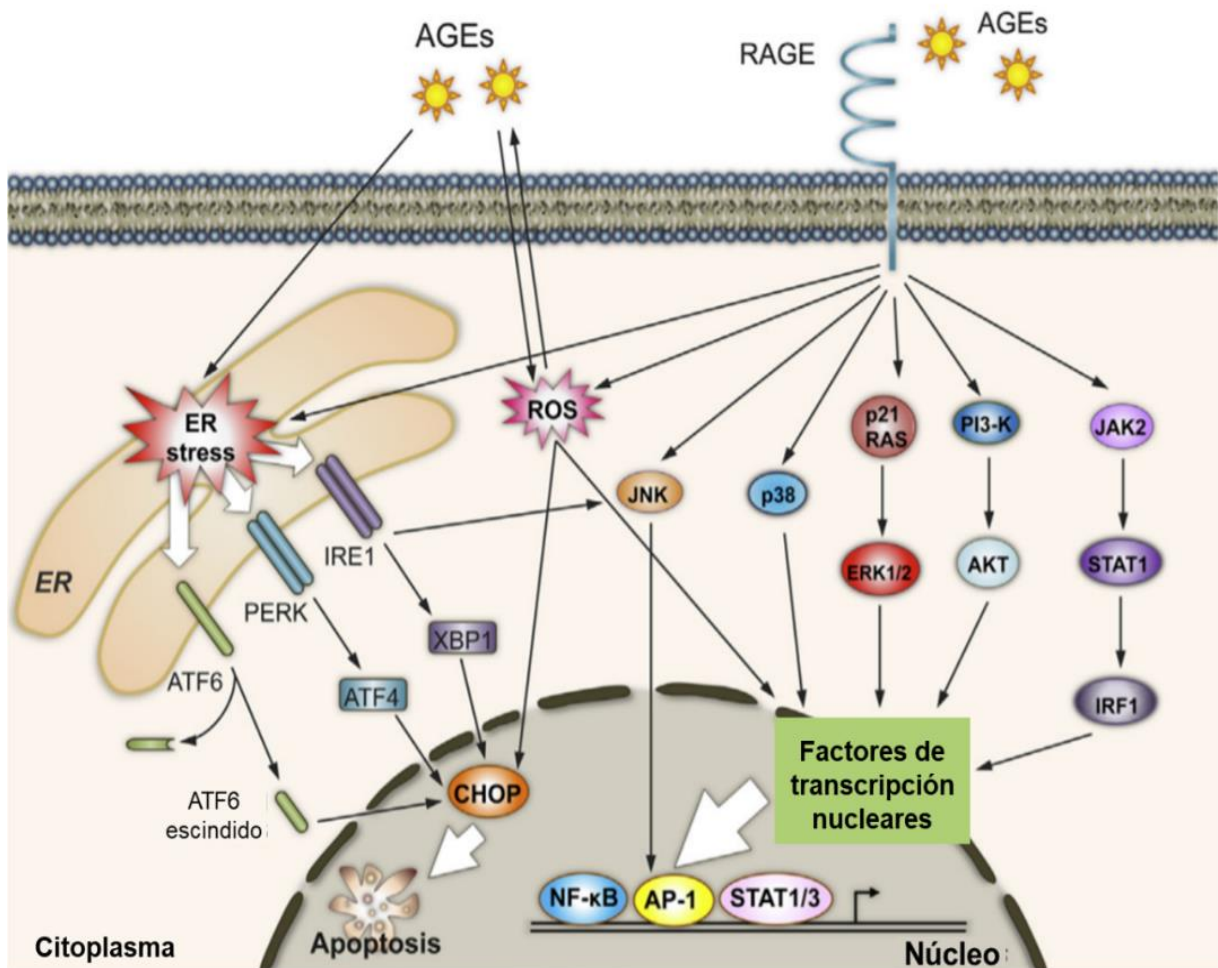


Figura 4. Esquema de las diferentes vías asociadas en la señalización AGE-RAGE. AGE/RAGE promueve la activación de diferentes vías río abajo, como son las vías MAPK (ERK1/2, p38, JNK), PI3-K/AKT, JAK2/STAT1, las cuales resultan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, STAT1/3 implicados en los procesos clave (fibrosis, hipertrofia e inflamación) que conllevan el desarrollo de la ND. EL exceso de AGEs induce estrés oxidativo por medio del aumento de ROS, lo cual provoca la formación de mayor cantidad de AGEs y por lo tanto estrés en el retículo endoplasmático (ER) al estimular la respuesta de proteínas no plegadas (UPR). Tomada de Goldfarb S., *et al* 2001.

2 ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 RNA circulares: nuevos reguladores de la expresión genética

Los RNA circulares (circRNAs, por sus siglas en inglés) son un tipo de RNAs largos no codificantes con *loops* unidos covalentemente, por lo que son resistentes a las exoribonucleasas y se localizan por lo general en el citoplasma. Los circRNAs regulan la expresión genética a nivel transcripcional o post-transcripcional al interactuar con los microRNAs (miRNAs) (Jeck W., *et al* 2013; Greene J., *et al* 2017). Durante mucho tiempo se creía que los circRNAs eran isoformas raras resultado de errores de *splicing* o reordenamientos de genes (Barrett S., and Salzman J., 2016). Sin embargo, hoy en día se sabe que los circRNAs se forman por un proceso de *back-splicing* en el que puede ocurrir la unión covalente entre el sitio donante y el aceptor de *splicing*, formando así un *lariat* compuesto por exones; o por circularización impulsada por complementariedad de intrones, o porque el *spliceosoma* corta los exones y los intrones se circularizan (Jin J., *et al* 2020; Lasda E., *et al* 2014).

Diversos estudios han demostrado que los circRNAs actúan como esponjas de los miRNAs. Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de alrededor de 18-25 nt de longitud que participan en la regulación negativa de la expresión genética a nivel postranscripcional (Hu W., *et al* 2019). Por otra parte, recientemente se ha investigado el papel de los circRNAs como esponjas de proteínas de unión al RNA (RBP) regulando la expresión genética (Abdelmohsen K., *et al* 2017).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la unión de circRNA a proteínas, entre ellas se encuentran: los circRNAs funcionan como vehículos de ribonucleoproteínas, transportando estas moléculas hacia una localización subcelular específica; o las secuestran impidiéndoles que realicen su función; o pueden funcionar como un andamio para múltiples RBPs, facilitando la interacción entre ellas; o se unen a RBPs provocando cambios alostéricos que regulan su función (Hentze M., *et al* 2013; Greene J., *et al* 2017).

2.2 Biogénesis de los circRNAs

Generalmente, los circRNAs se expresan a niveles bajos, lo que indica la posibilidad de que la mayoría de ellos sean funcionalmente irrelevantes e intrascendentes y sean producto de *splicing* alternativo (Guo J., *et al* 2014). Las vías y la maquinaria canónica de *splicing* son componentes necesarios para la circularización de los transcritos mediante '*back-splicing*'. El *splicing* canónico es catalizado por la maquinaria *spliceosomal* para eliminar intrones y unir exones. Junto con otros procesos co/postranscripcionales, tales como el *capping* en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3', el *splicing* canónico conduce a la formación de un transcrito de RNA lineal con polaridad 5' - 3'. A diferencia del *splicing* canónico que une un sitio donante río arriba (5') con un sitio aceptor río abajo (3'), el *back-splicing* liga un sitio donante río abajo de forma inversa con un sitio aceptor río arriba, lo que da como resultado un transcrito de circRNA unido covalentemente (Chen L., and Yang L., 2015). Todos los tipos de circRNAs, independientemente del origen de su secuencia nucleotídica, pueden derivarse de un único locus (Figura 5). En un único mRNA precursor (pre-mRNA), la competencia entre diferentes secuencias complementarias dentro de un único intrón y a través de intrones flanqueantes influye en la predilección entre el *splicing* canónico y el *back-splicing*; la competencia entre secuencias complementarias a través de intrones flanqueantes también genera diferentes eventos de circularización de exones (Figura 5) (Guo J., *et al* 2014). Existen, distintos elementos reguladores en cis y factores de acción en trans que regulan este proceso de *splicing*; estos posiblemente incluyen la longitud del exón, los intrones largos que flanquean con elementos repetitivos (por ejemplo, elementos ALU) o secuencias complementarias no repetitivas, sitios de *splicing* canónicos y RBPs (Chen L., 2016).

2.3 Clasificación de los circRNAs

Los circRNAs se clasifican en 3 tipos, en función de las partes que los componen: 1) los circRNAs exónicos (EcircRNAs), 2) circRNAs intrónicos (CiRNAs) y 3) circRNAs compuesto de exones-intrones (ElciRNAs) (Chen L., 2016).

2.3.1 EcircRNAs

Los EcircRNAs, están compuestos por uno o varios exones, se forman principalmente por *back-splicing* o la omisión de exones y se localizan generalmente en el citoplasma (Jeck W., *et al* 2013). Además, los ecircRNAs son los más abundantes en las células humanas en comparación con los circRNAs que surgen de las regiones intrónicas e intergénicas (Gao Y., *et al* 2015).

Se han propuesto 3 modelos para explicar la biogénesis de los ecircRNAs: 1) la circularización impulsada por *lariat*; 2) la circularización impulsada por complementariedad de intrones; y 3) la circularización impulsada por RBPs (Figura 5). Además, existen dos mecanismos a través de los cuales se pueden formar: *back-splicing* directo y *exon-skipping*.

La circularización impulsada por el *lariat*, se genera a partir del mecanismo de *exon-skipping*, es un proceso de plegado parcial del pre-mRNA después del *exon-skipping* (Jeck W., *et al* 2013). Durante este proceso, el acercamiento entre dos exones no adyacentes conduce a la unión covalente del donante río arriba y el receptor río abajo. Posteriormente, se forma un intermediario *lariat* que genera un ecircRNA mediante la eliminación del intrón. De manera similar, la circularización impulsada por complementariedad de intrones y por las RBPs, ocurre a partir del *back-splicing* directo; sin embargo, en este proceso, dos intrones flanqueantes que contienen exones circularizados se acercan por elementos complementarios repetidos ALU u otras secuencias complementarias sin repetición o RBP (Zhang X., *et al* 2014). De manera interesante los ecircRNAs actúan como esponjas de los microRNAs (miRNAs), a través de los elementos de respuesta a miRNAs (MREs), regulando la expresión génica mediada por miRNAs (Hansen T., *et al* 2013).

2.3.2 CiRNAs

Los CiRNAs se originan de intrones que poseen motivos ricos en GU de siete nucleótidos cerca del sitio de *splicing* 5' y los motivos ricos en C de once nucleótidos cerca del sitio de ramificación 3' (Zhang Y., *et al* 2013). Además, poseen un punto de ramificación especial 2'-5' originado por circularización intrónica que es diferente. Esta

circularización requiere que después de la liberación del exón 3', el grupo terminal 2-OH libre ataque el sitio de splicing 5', lo que da lugar a la formación del *lariat* del intrón (Figura 5) (Petkovic S., and Müller S., 2015). El *lariat* del intrón que alberga los motivos consenso evade la digestión de la enzima desramificadora y es escindido por las enzimas exonucleolíticas para producir un CiRNA (Zhang Y., *et al* 2013). Los CiRNAs se localizan principalmente en el núcleo.

2.3.3 ElciRNAs

Los ElciRNAs, se componen tanto de intrones como de exones y se localizan principalmente en el núcleo. Dada la existencia de secuencias complementarias en los intrones largos que los flanquean, los ElciRNAs comparten un mecanismo de *splicing* común con los ecircRNAs y se originan a partir de intrones retenidos tras el *back-splicing* de los exones (Li Z., *et al* 2015). Los ElciRNAs desempeñan funciones reguladoras, por ejemplo, modulando la transcripción de la expresión de sus genes parentales (Eidem T., *et al* 2019).

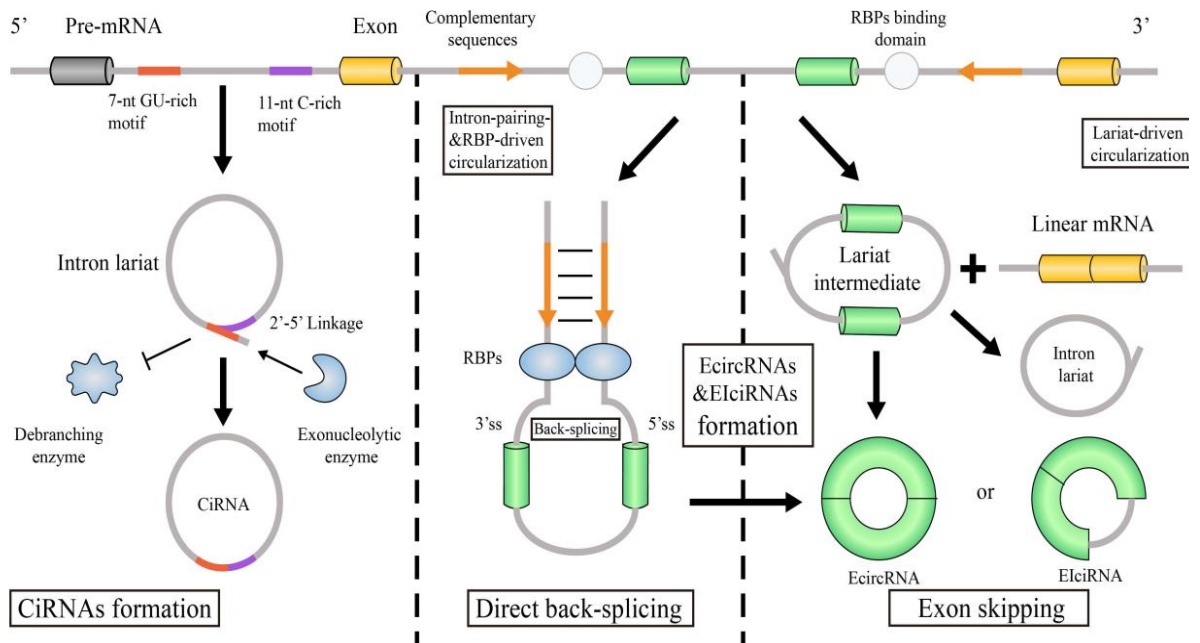


Figura 5. Biogénesis de los circRNAs. La formación de los circRNAs depende de motivos conservados cerca de ambos extremos de la molécula de RNA. La formación de EcircRNA y ElciRNA requieren de la circularización por *splicing*, la cual es catalizada por secuencias complementarias o RBPs. Su formación también es el resultado de la omisión de exones, que da lugar a intermediarios del *lariat*. Estos intermediarios sufren posteriormente *splicing* interno para generar ecircRNAs o ElciRNAs. CircRNA: RNA circular, EcircRNA: RNA circular exónico, CiRNA: RNA circular intrónico, ElciRNA: RNA circular exón-intrón, RBPs: proteínas de unión a RNA, ss: sitio de *splicing*. Tomada de Wang M., *et al* 2017.

2.4 Funciones de los circRNAs

Los circRNAs funcionan como reguladores de la expresión génica. Ellos pueden interactuar con miRNAs o proteínas, y actuar como esponjas moleculares e inhibir su función; en menor medida pudieran ser traducidos (Figura 6) (Wang M., *et al* 2017).

2.4.1 Los circRNAs regulan la expresión del gen parental

Los circRNAs funcionan como reguladores transcripcionales (Figura 6). Además, los circRNAs de origen exón-intrón (EliciRNAs), que se encuentran localizados en el núcleo, se asocian con la RNA polimerasa II (RNA pol II), interactúan con el snRNP U1 y el complejo de transcripción Pol II en el promotor de sus genes parentales, controlando así la expresión de los genes parentales, por ejemplo, tanto el circEIF3J como el circPAIP2 pueden unirse a U1snRNP y RNA Pol II en *cis* regulando la transcripción de sus genes parentales (Li Z., *et al* 2015). En conjunto, los circRNAs actúan como reguladores transcripcionales para controlar la expresión de sus genes parentales. En el 2013, Zhang y colaboradores demostraron que los circRNAs intrónicos (ci-ankrd52, ci-mcm5 y ci-sirt7) también pueden funcionar como reguladores positivos de la transcripción de sus genes parentales al interactuar con la RNA Pol II y la inhibición de la expresión de estos circRNAs también inhibe la expresión de sus genes parentales (Zhang Y., *et al* 2013).

2.4.2 Interacción de los circRNAs con proteínas

Las proteínas más conocidas que interactúan con las moléculas de RNA son las proteínas de unión a RNA (RBP). Las RBPs son una clase de proteínas asociadas con el procesamiento metabólico de los RNA y estas proteínas incluso participan en la formación de complejos de ribonucleoproteínas (Huang A., *et al* 2020). Estudios recientes han indicado que las interacciones RNA-RBP están determinadas por la estructura terciaria de las moléculas de RNA. Por lo tanto, la estructura terciaria única de los circRNAs puede ejercer un efecto sobre su capacidad de unión a proteínas

diferente al modo de unión tradicional basado en la secuencia de nucleótidos (Conlon E., and Manley J. 2017).

La unión de circRNAs a proteínas puede tener efectos bidireccionales. Se ha reportado que las interacciones RNA-proteína influyen en la expresión y función de las proteínas, al mismo tiempo que regulan la síntesis y degradación de los circRNAs (Huang A., *et al* 2020). Los circRNAs pueden servir como esponjas proteicas o señuelos para influir en sus funciones celulares, regulando así la transcripción de genes. Por ejemplo, Zeng, y colaboradores demostraron que el circ-Amotl1 se sobreexpresa en tejido cardíaco humano neonatal, y se une a las proteínas PDK1 y AKT1, lo que lleva a la fosforilación de AKT1 y su translocación nuclear, promoviendo la proliferación y supervivencia celular (Zeng Y., *et al* 2017). De manera similar, Yang y colaboradores demostraron que el circ-Amotl1 se sobreexpresa en diferentes líneas celulares de cáncer en comparación con las líneas celulares no tumorales. Además, demostraron que los niveles de circ-Amotl1 disminuyen significativamente cuando las células se mantuvieron en una confluencia del 80 % o más, sugiriendo que circ-Amotl1 promueve la proliferación celular. De manera interesante, demostraron que circ-Amotl1 interacciona con el factor de transcripción oncogénico c-Myc induciendo su translocación nuclear y estabilidad, y promoviendo la afinidad de unión de c-Myc a varios promotores, lo que conlleva la progresión del cáncer (Yang Q., *et al* 2017). Sin embargo, el papel de los circRNAs como esponjas de proteínas involucradas en la ND sigue sin ser elucidado, por lo tanto, el estudio de estos circRNAs en la regulación de proteínas que participen en la inflamación, fibrosis e hipertrofia, nos ayudará a comprender su relevancia en la ND.

2.4.3 Los circRNAs como esponjas de microRNAs

Recientemente, se ha demostrado que los circRNAs contienen sitios de unión a miRNAs. Cuando el circRNA actúa como esponja del miRNA, lo atrapa, por ende, este no puede unirse a su mRNA blanco, por lo tanto, pierde su capacidad para inhibir la expresión génica, lo que da como resultado un aumento de la expresión del mRNA y de la proteína que codifica (Figura 6) (Huang A., *et al* 2020).

2.4.3.1 MicroRNAs: reguladores negativos de la expresión génica

Los miRNAs pertenecen a una familia de pequeños RNA monocatenarios no codificantes, tienen un tamaño de alrededor de 19-25 nucleótidos (nt) de largo, los cuales se pueden encontrar tanto en animales como en plantas y están involucrados en la regulación post-transcripcional (Lin S., *et al* 2015; Garzon R., *et al* 2006). En 1993 fueron descritos por primera vez por Victor Ambros y colaboradores, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. El grupo de investigadores estaba trabajando con el gen *lin-4* el cual es esencial para el desarrollo post-embriónico del nemátodo. Lo único que sabían en ese tiempo era que, en la etapa larvaria, *lin-4* regulaba negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Ellos encontraron que *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNAs: uno de 22 nt y otro de aproximadamente 60 nt, el cual podría formar una estructura de tallo y burbuja y ser el precursor del transcrito más corto (Lee R., and Ambros V. 2001). Posteriormente, se descubrió que la manera en la que *lin-4* regula la producción de la proteína LIN-14 es mediante la unión de la región 3'UTR del mRNA por complementariedad de bases, evitando así su traducción (Lagos-Quintana M., *et al* 2001; Lee R., & Ambros V. 2001). Estos datos sugirieron que los miRNAs reprimen la expresión génica al unirse directamente a la región 3' no traducida (UTR, del inglés untranslated region) de un mRNA blanco e inducen su degradación o inhiben la traducción del transcrito de manera específica (Eroles P., *et al* 2016). Se ha demostrado que los miRNAs, participan en la regulación de la expresión de genes involucrados en la progresión y desarrollo de la ND (Yu F., *et al* 2019).

2.4.3.2 Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs ocurre en cinco pasos: (1) Los miRNAs son sintetizados por la RNA pol II, que inicialmente produce un transcrito largo precursor. Durante la transcripción se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla mediante apareamiento de secuencias complementarias, generando así un miRNA primario (pri-miRNA) de alrededor de 100 nt, que poseen una estructura de CAP en su extremo 5' UTR y son poliadenilados en su extremo 3' UTR, tal como ocurre con los

mRNA celulares. (Lee Y., *et al* 2004); (2) El pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador conformado por la enzima Drosha y la proteína DGCR8. La estructura secundaria de tallo-burbuja del pri-miRNA es reconocida y procesada por la enzima Drosha, la cual posee actividad de RNasa tipo III, generando precursores de 70-100 nt llamados miRNA precursores (pre-miRNA). El pre-miRNA es una secuencia que está conformada por una estructura tallo-burbuja con una prolongación que contiene dos uracilos en su extremo 3', esta estructura funciona como un motivo de reconocimiento por la exportina 5; (3) La exportina 5, interviene directamente en el transporte del pri-miRNA del núcleo al citoplasma en un proceso dependiente de Ran-GTP (Lin S., *et al* 2015); (4) Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por DICER, otra enzima del tipo RNasa III, que en conjunto con la proteína TRBP, recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto denominado miRNA/miRNA*. Posteriormente, TRBP recluta a la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) al complejo miRNA/miRNA*-DICER y forma el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). La cadena complementaria del dúplex miRNA/miRNA* es liberada y degradada por AGO2. La proteína AGO2 guía al miRNA a la región 3' UTR del ARNm blanco donde se une de manera específica mediante complementariedad de la secuencia (Ha M., *et al* 2014); (5) Si la complementariedad del miRNA con la secuencia del transcrito es perfecta se reclutarán las proteínas de desadenilación para iniciar la degradación del mRNA. De manera alternativa, si la complementariedad del miRNA con su mRNA blanco no es complementaria en su totalidad se inhibirá la traducción del transcrito (Lin S., *et al* 2015) (Figura 7).

2.4.3.3 Implicación de los miRNAs en la nefropatía diabética

La inflamación contribuye a la patogenia y progresión de la ND. Guo y colaboradores demostraron que el miR-29c se sobreexpresa en pacientes con ND, y la sobreexpresión de miR-29c en podocitos resulta en un aumento de citocinas inflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- α . La inhibición de miRNA-29c disminuyó la expresión de las citocinas inflamatorias en los podocitos. Por lo tanto, el miRNA-29c podría contribuir al desarrollo y progresión de la ND (Guo J., *et al* 2007). De manera

similar, el miR-155 se sobreexpresa en pacientes con ND y su sobreexpresión promueve la expresión de TNF- α , TGF- β 1 y NF- κ B, contribuyendo a la lesión endotelial glomerular mediada por inflamación (Huang Y., *et al* 2014). Otro mecanismo importante, involucrado en la progresión de la ND es la fibrosis. Un estudio reciente sugirió que el miR-21 puede promover el desarrollo de fibrosis renal al regular las vías metabólicas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y lípidos (Chau B., *et al* 2012). McClelland y colaboradores demostraron que el miR-21 se sobreexpresa en pacientes con ND y su expresión se correlacionó positivamente con la gravedad de la fibrosis y la tasa de disminución de la función renal en DN. Ellos demostraron que el miR-21 promueve la fibrosis renal en la ND al inhibir la expresión de sus mRNAs blancos PTEN y SMAD7 (McClelland A., *et al* 2015).

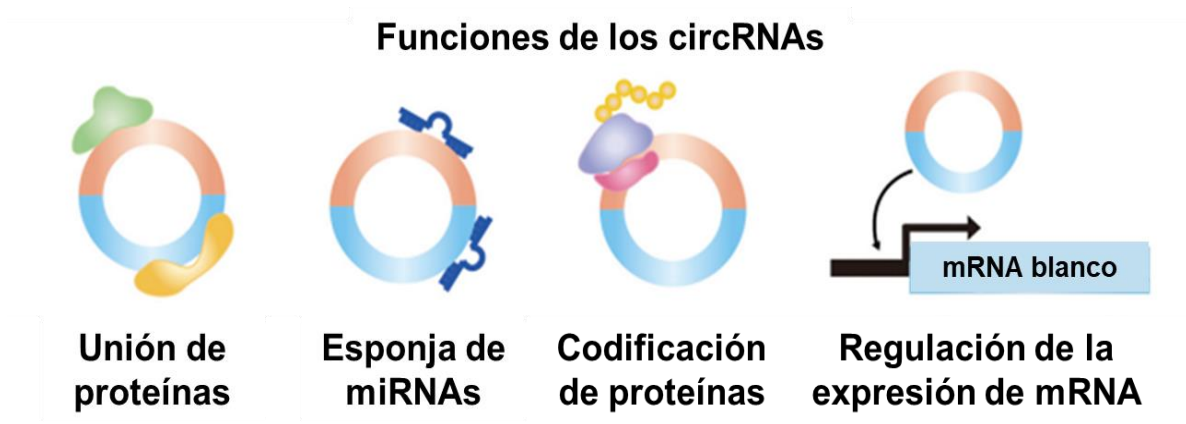


Figura 6. Representación esquemática de las funciones de los circRNAs. Tomada de Kim E., *et al* 2021.

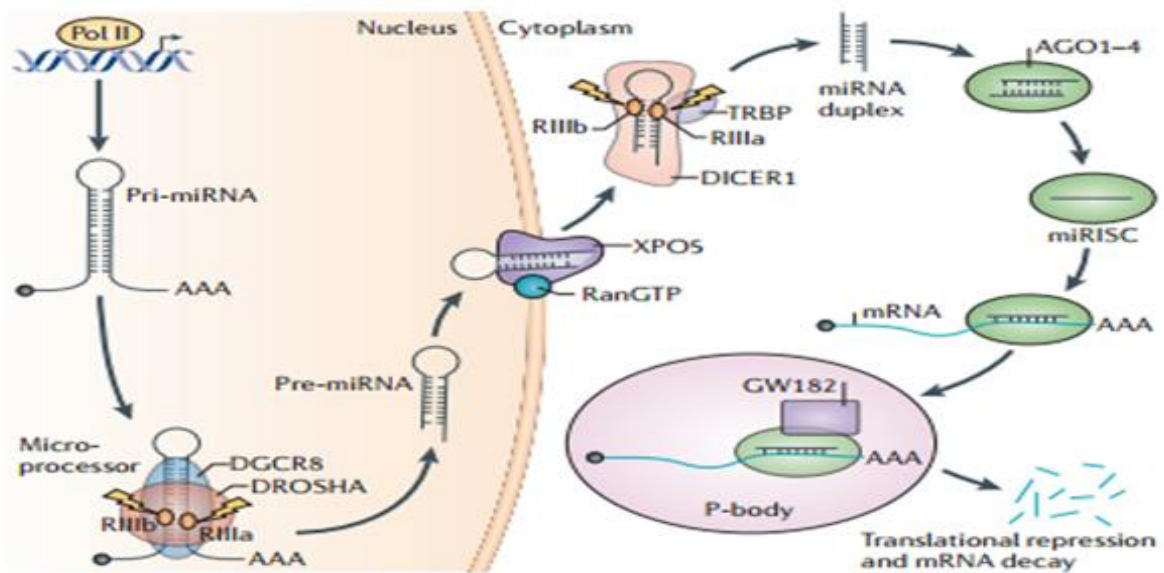


Figura 7. Biogénesis de los miRNAs. Los pri-miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II y pueden contener CAP y ser poliadenilados. Los pri-miRNAs son procesados por Drosha, una enzima RNasa III y convertidos a pre-miRNA, que se caracterizan por tener una estructura dúplex imperfecta. Los pre-miRNA son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y RanGTP. En el citoplasma, los pre-miRNA son transformados por Dicer, otra enzima del tipo RNasa III, generando la estructura híbrida miRNA/miRNA*. La unión de estos dúplex de RNA a proteínas como la Argonata 2, libera el miRNA*. El miRNA dirige la asociación de RISC a sitios específicos en la región 3' no traducida del mRNA blanco. Si el apareamiento de bases entre el miRNA y su mRNA blanco es perfecto, la función endonucleolítica de la Argonata 2 rompe el mRNA, llevándolo a su rápida destrucción. La complementariedad imperfecta puede provocar represión traduccional o causar inestabilidad del mRNA. Este último efecto es posiblemente mediado por un mecanismo de deadenilación. Estas funciones requieren del apareamiento de bases entre la secuencia 5' del miRNA y su secuencia complementaria en el 3' del mRNA blanco. Tomado de Ha M., *et al* 2014.

pri_miRNA: miRNA primario; pre-miRNA: miRNA precursor; mRNA: RNA mensajero

2.5 Rol de los circRNAs en la nefropatía diabética

Estudios recientes han demostrado la participación de los circRNAs en la modulación de los eventos fisiopatológicos que ocurren en la ND (Tabla 1). Por ejemplo, el circ-ACR2 se sobreexpresa tanto en pacientes con ND como en la línea celular HRMC (células mesangiales renales de humano) expuestas a altos niveles de glucosa y actúa como esponja del miR-205-5p, teniendo como blanco al mRNA de HMG2. El silenciamiento de la expresión del circ-ACR2 inhibe la proliferación celular, la producción de citocinas proinflamatorias, la acumulación de matriz extracelular y el estrés oxidativo en la línea celular HRMC expuestas a altos niveles de glucosa (Yun J., *et al* 2021). De manera similar, el circ_0000712 se sobreexpresa en tejidos renales y en células mesangiales (CM) expuestas a altos niveles de glucosa. Asimismo, el silenciamiento del circ_0000712 inhibe la apoptosis, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis causados por las altas concentraciones de glucosa en las CM. Este circRNA actúa como esponja del miR-879-5p, aumentando la expresión de SOX6, regulando así la ND inducida por glucosa a través del eje circ_000071/miR-879-5p/SOX6 (Zhao L., *et al* 2021). Otro ejemplo es el circ_0037128 que se sobreexpresa, tanto en la línea celular SV40-MES13 de células mesangiales de ratón expuestas a altos niveles de glucosa como en el modelo de ratón de ND y actúa como esponja del miR-17-3p, teniendo como blanco a AKT3, promoviendo así la proliferación celular y la fibrosis a través del eje circ_0037128 / miR-17-3p / AKT3 (Wang Q., *et al* 2021). Por el contrario, el circ_010383 disminuye su expresión, tanto en la línea celular SV40-MES13 de células mesangiales de ratón expuestas a altos niveles de glucosa como en el modelo de ratón de ND y actúa como esponja del miR-135a, promoviendo la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (ECM) e inhibiendo la expresión de la proteína del potencial transitorio del receptor canónico 1, subfamilia C (TRPC1), que funciona como un canal catiónico, y es un blanco de miR-135a. Además, la sobreexpresión de circRNA_010383 inhibió eficazmente la acumulación de ECM inducida por altos niveles de glucosa y aumentó los niveles de TRPC1 (Peng F., *et al* 2020).

Tabla 1. Los posibles mecanismos y ejes de regulación de los circRNAs en la nefropatía diabética

circRNA	Expresión	Eje de regulación	Función	Referencia
circ-ACTR2	Sobreexpresado	miR- 205-5p/ HMGA2	Promueve la proliferación, inflamación, la acumulación de matriz extracelular y el estrés oxidativo	Yun J., 2021
circ_0000712	Sobreexpresado	miR-879-5p/SOX6	Induce la apoptosis, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis	Zhao L., 2021
circ_0037128	Sobreexpresado	miR-17-3p / AKT3	Promueve la inflamación y la fibrosis.	Wang Q., 2021
circ_010383	Reprimido	miR-135a/TRPC1	Promueve la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (ECM)	Peng F., 2020
circHIPK3	Sobreexpresado	miR-185/ cyclin D1, PCNA, TGF- β 1	Promueve la proliferación celular	Liu R., 2021
circRNA_102682	Reprimido	TGF- β y CTGF	Se asocia con la sobreexpresión de TGF- β y CTGF, promoviendo la hiperhomocisteinemia	Hu F., 2021
circ-ITCH	Reprimido	miR-33a-5p /SIRT6	Promueve la migración, la fibrosis y la respuesta inflamatoria	Liu J., 2021
circ_LARP4	Reprimido	miR-424/Bcl-2	Induce la proliferación y fibrosis celular e inhibe la apoptosis.	Wang Y., 2021
circ_0000491	Sobreexpresado	miR-455-3p/Hmgb1	Induce la apoptosis, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis	Wang J., 2021

Se conoce muy poco sobre el eje de regulación circRNA/miRNA/mRNA en la progresión de la nefropatía diabética. Por ende, el objetivo de este proyecto es investigar las posibles implicaciones de la regulación circRNA/miRNA/mRNA de genes que codifican proteínas de la vía de señalización AGE-RAGE que median la inflamación, fibrosis y/o hipertrofia renal en ambientes con altas concentraciones de glucosa. Además, hasta la fecha no existe un solo reporte de la interacción de circRNAs con proteínas en ND, por lo tanto, el análisis sobre estos mecanismos de regulación nos proporcionará información importante sobre el rol de los circRNAs en la modulación de la vía de señalización AGE-RAGE, la cual está implicada en la fisiopatología de la ND.

3 JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la ND una de sus principales complicaciones microvasculares. La aparición de la ND está mediada principalmente por la formación de AGEs y su interacción con su receptor (RAGE). Aunque se ha encontrado una expresión desregulada de los circRNAs en diabetes, el papel de estas moléculas en las complicaciones como la ND, a través de la modulación de la vía AGE-RAGE por interacción directa o indirecta con RAGE u otras proteínas de su vía de señalización sigue siendo desconocido. Dilucidar estos aspectos nos permitirá generar nuevos conocimientos acerca del rol de los circRNAs en la fisiopatología de la ND y su potencial como blancos terapéuticos.

4 HIPÓTESIS

Los circRNAs expresados en células epiteliales renales expuestas a altas concentraciones de glucosa modulan la expresión de genes del eje AGE-RAGE que median la inflamación, fibrosis y/o hipertrofia renal.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar *in silico* las posibles interacciones directas e indirectas entre circRNAs y proteínas de la vía de señalización AGE/RAGE en células epiteliales renales sometidas a altas concentraciones de glucosa.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Predecir la red de interacción de los circRNAs, expresados en células epiteliales renales cultivadas en ambientes con altas concentraciones de glucosa, con miRNAs y mRNAs de genes que codifican proteínas de la vía de señalización AGE-RAGE involucradas en la inflamación, fibrosis y/o hipertrofia renal.

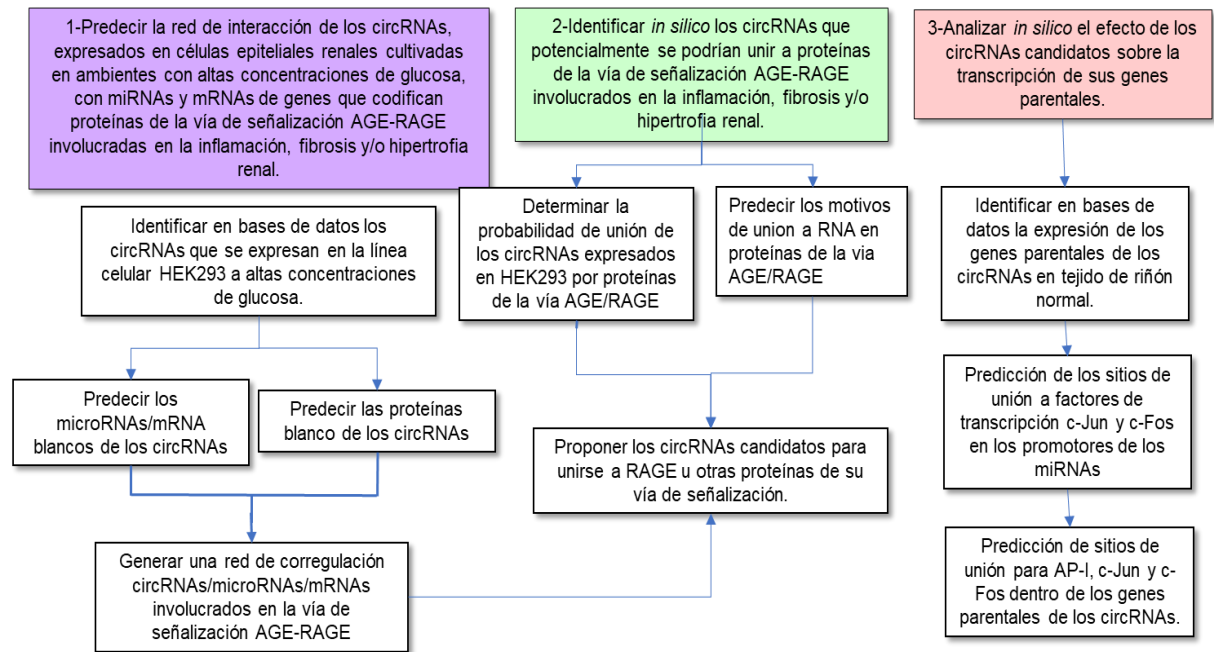
2-Identificar *in silico* los circRNAs que potencialmente se podrían unir a proteínas de la vía de señalización AGE-RAGE involucrados en la inflamación, fibrosis y/o hipertrofia renal.

3-Analizar *in silico* el efecto de los circRNAs candidatos sobre la transcripción de sus genes parentales.

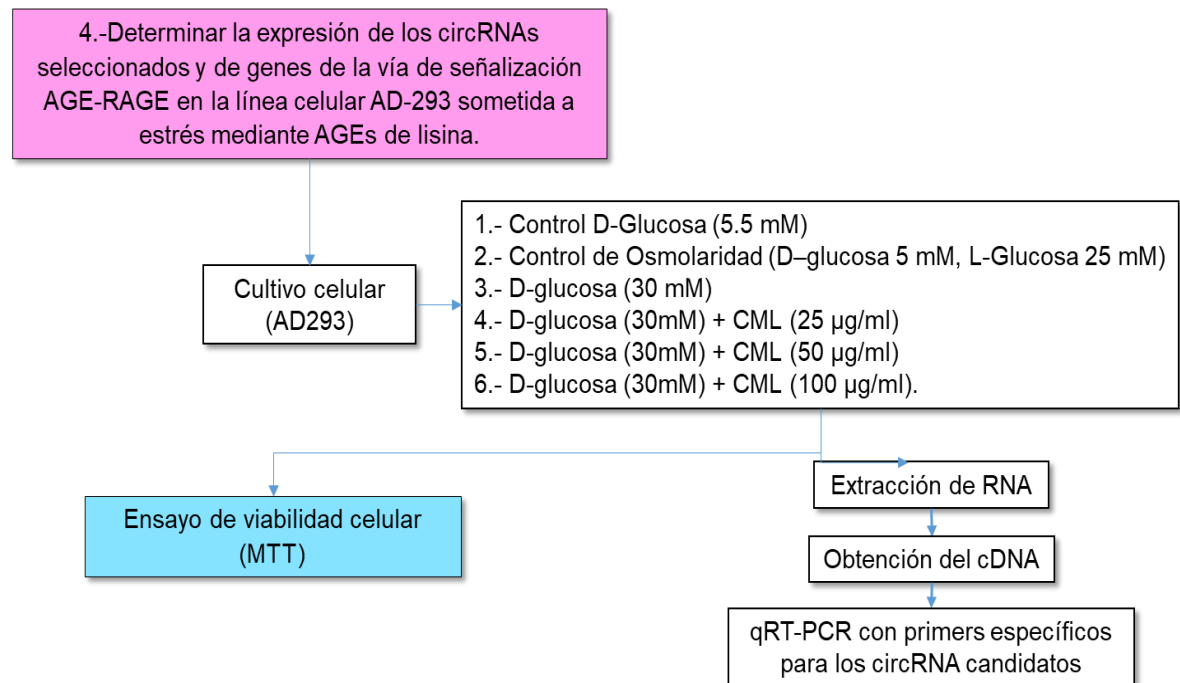
4-Determinar la expresión de los circRNAs seleccionados y de genes de la vía de señalización AGE-RAGE en la línea celular AD-293 sometida a estrés mediante AGEs de lisina.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Análisis *in silico*



Análisis experimentales



7 METODOLOGÍA

7.1 Identificación *in silico* de los circRNAs que se expresan en células epiteliales renales sometidas a altas concentraciones de glucosa

Se colectaron las secuencias de los circRNAs predichos por Memczak y cols (Memczak S., *et al* 2013) a partir de los datos de secuenciación de ribonucleos de la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM) y disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus bajo el número de acceso GSE43574. Las secuencias de los circRNA predichos y validados por Memczak., *et al* 2013 se verificaron 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 Circ2traits (<http://gyanxet-beta.com/circdb/>).

7.2 Determinación *in silico* de la red de circRNA-miRNA-mRNA que se expresan en células epiteliales renales sometidas a altas concentraciones de glucosa (25mM)

Se analizó *in silico* la interacción de los circRNAs expresados en HEK293 con miRNAs que tuvieran como blanco a los mRNA de 11 genes que codifican para proteínas involucradas con las vías NF- κ B (*PI3K*, *MAPK8*, *MAPK9* y *NF- κ B*), JAK-STAT (*JAK2*, *STAT1*, *STAT3*, *JUN*, *FOS*) y TGF- β 1 (*TGF- β 1*) del eje AGE-RAGE y que están implicadas en los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia, respectivamente.

Para ello, primero se predijeron las interacciones de los circRNAs expresados en HEK293 con miRNAs utilizando las bases de datos circAtlas (<http://159.226.67.237:8080/new/index.php>), CircInteractome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) y circBank (<http://www.circbank.cn/>). Se seleccionaron solamente los miRNAs con blancos predichos consistentemente por al menos 2 bases de datos. Posteriormente, la predicción de los mRNAs blancos de los miRNAs que potencialmente interactúan con los circRNA expresados en HEK293, utilizando las bases de datos TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/),

miRTarBase(https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/search.php) y miRDB (<http://www.mirdb.org/>). La energía libre de los pares de interacciones miRNAs-mRNA y la accesibilidad al blanco se verificó mediante los servidores [RNAHybrid](https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission) ([https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid view submission](https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission)) y [RNAup](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAup.cgi) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAup.cgi>), respectivamente. Para su análisis posterior se seleccionaron aquellos miRNA que tuvieran como blancos predichos los 11 mRNA de interés en al menos dos bases de datos, que presentaban sitios de interacción canónicos (8mer, 7mer-m8 y 7mer-A1), que la energía libre mínima de las interacciones fuera menor a -40 Kcal/mol, y que la energía libre de unión fuera menor a -4 kcal/mol mediante el software RNAhybrid y RNAup, 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. Se verificó la expresión en células renales, en condiciones fisiológicas, de las proteínas blanco y de los pares circRNA/miRNA identificados previamente utilizando el servidor The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), Human miRNA tissue atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) y circAtlas (<http://159.226.67.237:8080/new/index.php>).

7.2.1 Construcción de la red de correulación circRNA-miRNA-mRNA

La red de correulación entre los circRNA-miRNA-mRNA se construyó utilizando el software Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), al cual se le proporcionó, como datos de entrada, los pares de circRNA-miRNA y miRNA-mRNA que interactuaban de acuerdo con los resultados de las predicciones obtenidas como se describe en la sección anterior.

7.2.2 Identificación *in silico* de los circRNAs candidatos a unirse a proteínas del eje AGE-RAGE.

Para predecir los circRNAs candidatos a unirse a proteínas involucradas en las vías del eje AGE-RAGE relacionadas con inflamación, hipertrofia y fibrosis se analizó si dichas proteínas presentan motivos de secuencia capaces de interactuar con RNA. Para ello, se determinó la probabilidad de las 11 proteínas mencionadas en la sección 2 a unirse a RNA y se predijo si poseían regiones de unión a RNA mediante el servidor catRAPID (http://s.tartaglialab.com/page/catrapid_group). A continuación, se predijo la interacción de los circRNA, expresados en HEK293 con las 11 proteínas seleccionadas, mediante el servidor RPI-seq (<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/>). Para establecer criterios de referencia durante la selección de los circRNAs candidatos se incluyó como control positivo en el análisis a las proteínas, FMR1, ZC3H7B, CELF4, eIF4B, FTO, RBFOX2, LIN28, IGFBP3, ELAVL4, FUS, HNRNPDL, las cuales son proteínas de unión a RNA que interactúan con la mayoría de los circRNAs que se expresan en HEK293, y como control negativo se incluyeron las proteínas EGFP, PCNA, LIMA1, H2B, ACTB, HNF4 α , PAX4, Nkx22, TMM70, RNOB2, MC4R, INSIG2, las cuales no presentan sitios de unión a RNA de acuerdo a lo descrito en la literatura (Castello., *et al* 2012). Posteriormente se tomaron las secuencias de las regiones de unión a RNA predichas en catRAPID para identificar posibles motivos de unión a RNA (RRM) dentro de las mismas. Para ello, se descargaron de la base de datos RBPDB (<http://rbpdb.ccb.utoronto.ca//index.php>) 66 secuencias de aminoácidos (Anexo 1) conteniendo los dominios de unión a RNA de 35 proteínas clasificadas como proteínas de unión a RNA (RBP) y se analizaron mediante el software MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) Adicionalmente, se compararon los motivos identificados mediante la herramienta Tomtom (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>).

7.3 Análisis *in silico* del efecto de los circRNAs candidatos sobre la transcripción de sus genes parentales

7.3.1 Análisis de la expresión de los genes parentales de los circRNAs

Se verificó la expresión de los genes parentales de los circRNAs en tejido de riñón normal mediante la base de datos Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>).

7.3.2 Predicción de los sitios de unión a los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs

Mediante el software TransmiR v2.0 se analizó la presencia de sitios de unión a los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los genes que originan los miRNAs que interactúan con los circRNAs expresados en HEK-293 y los mRNA de los genes que codifican las 11 proteínas de interés (<http://www.cuilab.cn/transmir>).

7.3.3 Predicción de sitios de unión para AP-1, c-Jun y c-Fos en los genes parentales de los circRNAs

Se identificaron los genes parentales de los circRNAs que interactuaban *in silico* con c-Jun y c-Fos mediante la base de datos circBase (<http://www.circbase.org/>), y posteriormente se buscaron sitios de unión para AP-1, c-Jun y c-Fos dentro de los promotores de dichos genes parentales mediante la base de datos de biogrid LASAGNA search 2.0 (https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/index.php).

7.4 Determinación de la expresión de los circRNAs candidatos en la línea celular AD-293 sometida a stress mediante AGEs de lisina

7.4.1 Mantenimiento del cultivo celular

La línea celular adherente de riñón AD-293, la cual deriva de la línea HEK293 (CVCL_9804), se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gluta-MAX-I, bajo en glucosa (5.5 mM), con L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM,

bicarbonato de sodio 44 mM y rojo fenol 40 mM (Gibco, Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) (Gibco, Life Technologies) y penicilina/estreptomicina 1X (100X, Sigma-Aldrich). Se incubó a 37 °C en atmósfera con humedad controlada y 5 % de CO₂.

7.4.2 Tratamientos con altas concentraciones de glucosa y N-ε-carboxi-metil-lisina (CML)

Se sembraron 1×10^5 células por pozo (pz) en placas de 6 pz, con 2.5 ml de DMEM bajo en glucosa (5.5 mM), se incubaron a 37° C hasta obtener el 100% de confluencia. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionó medio DMEM sin suplementar, se incubó durante 16 h con la finalidad de que las células se sincronizaran. Una vez transcurrido ese tiempo se retiró el medio y se realizaron los tratamientos a las células. Se utilizaron 6 tratamientos: 1) Control glucosa (5.5 mM), 2) Control de osmolaridad (D – glucosa 5.5 mM, L-Glucosa 24.5 mM); 3) D-glucosa (30 mM), 4) D-glucosa (30 mM) + CML (25 µg/ml de DMEM), 5) D-glucosa (30 mM) + CML (50 µg/ml de DMEM) y 6) D-glucosa (30 mM) + CML (100 µg/ml de DMEM). Se probaron tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) a 37 °C en atmósfera con humedad controlada y 5 % de CO₂, al final de los cuales se colectaron las células para realizar la extracción de RNA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7.4.3 Ensayo de viabilidad celular

Para realizar el ensayo de viabilidad celular, a las células AD-293, previamente cultivadas 1.5×10^3 y tratadas en placas de 96 pozos durante 48 h como se describió en la sección 4.2, se le añadió el reactivo MTT [(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro] y se incubaron durante 3 h a 37 °C en atmósfera con humedad controlada y 5 % de CO₂. Luego, se eliminó el sobrenadante, se añadió isopropanol y se dejó incubar durante 5 min. A continuación, se registró la absorbancia (DO) de cada pozo mediante un espectrofotómetro (570 a 630 nm). El porcentaje (%) de viabilidad se calculó como:

$\% \text{ Viabilidad} = \text{DO células tratadas} \times 100 / \text{DO células control}$

Los datos se analizaron mediante el software Graph-Pad Prism 8. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

7.4.4 Extracción de RNA total mediante la técnica de Trizol

El RNA total de las células cultivadas bajo los tratamientos descritos anteriormente se extrajo con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA se cuantificó por espectrofotometría en un equipo Nanodrop A260/A280 (Thermo Scientific™ NanoDrop) y se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X, para determinar su integridad y verificar su concentración.

7.4.5 Síntesis de cDNA

A 500 ng de RNA se le adicionó 1 μL de hexámero aleatorio (10 pmol/ μL), 2 μL de dNTPs y agua DEPC cbp a un volumen final de 12 μL y se incubó a 65 °C por 5 min. Después se adicionaron 4 μL de amortiguador 5x, 1 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de RNAsaout (40 u/ μL), 1 μL de agua DEPC, 1 μL de transcriptasa reversa (Thermoscript Reverse Transcriptase) y se incubó a 50 °C por 50 min. Transcurrido el tiempo de reacción se inactivó la transcriptasa reversa a 85 °C por 5 min. Finalmente, el cDNA sintetizado se cuantificó por espectrofotometría en un equipo Nanodrop A260/A280 (Thermo Scientific™ NanoDrop).

7.4.6 Diseño de primers divergentes específicos para los circRNAs candidatos

La secuencia madura de los circRNAs candidatos se obtuvo utilizando la base de datos circular RNA interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html/>). Posteriormente, se identificó el templado del amplicón de PCR uniendo el extremo 3' de los últimos 100 nts de la secuencia del circRNA maduro al extremo 5' de los primeros 100 nts. Una vez obtenido el templado se diseñaron los primers para la PCR

utilizando el server Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) o primer-BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/herramientas/imprimaci3n-granallado/>) (Tabla 2).

7.4.7 qPCR en tiempo real

Para la PCR, se utiliz3 100 ng del cDNA del blanco correspondiente y se amplific3 con 5 μ L de SYBR-Green PCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.), 1 μ L de primers divergentes previamente descritos a una concentraci3n de 1 μ M y agua grado PCR cbp de 10 μ L. Se cuantific3 tambi3n la expresi3n de *RAGE*, *c-Jun*, *c-Fos* y *fibronectina 1*, utilizando primers espec3ficos para cada uno dise3ados en este trabajo (Tabla 2). Como control interno se cuantific3 la expresi3n de GAPDH. La reacci3n de PCR se realiz3 en un Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (CA) de la siguiente manera: 95 $^{\circ}$ C durante 10 min y 40 ciclos a 95 $^{\circ}$ C durante 15 segundos, 55 $^{\circ}$ C durante 30 segundos y 72 $^{\circ}$ C por 30 segundos. Para determinar la expresi3n de cada uno de los genes analizados y de los circRNA se utiliz3 el m3todo descrito por Ramakers y cols (19) el cual estima la cantidad de producto (N_c) despu3s de C ciclos mediante la f3rmula:

$$\text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \log(E) \times C$$

Donde N_0 y E son la cantidad inicial de mRNA y la eficiencia de amplificaci3n, respectivamente y se estiman de la curva de regi3n lineal de los datos de fluorescencia transformados [$\log(\text{fluorescencia})$ vs ciclos], como: $N_0 = 10^{\text{intercepto}}$ y $E = 10^{\text{pendiente}}$. La expresi3n de cada gen se determin3 como la expresi3n relativa a la del gen GAPDH.

7.5 An3lisis estad3stico

Se verific3 la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianza mediante la prueba de Brown-Forsythe. Todos los resultados se expresaron como media \pm error est3ndar. Para la estimaci3n de la cantidad inicial de mRNA y la eficiencia de amplificaci3n de los ensayos de RT-PCR el ajuste de la curva de regi3n lineal de los datos de fluorescencia transformados versus el n3mero de ciclos de amplificaci3n se realiz3 mediante el

método de los mínimos cuadrados seleccionándose la recta de menor error residual y mejor ajuste al modelo. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante análisis de varianza de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey. La relación entre la expresión de los RNA circulares y la de los genes que codifican las proteínas de interés se determinó mediante análisis de correlación y el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson. 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.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores diseñados para amplificar los transcritos estudiados

Gen o circRNAs	Secuencia de los cebadores
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC-3' R: 5'-CCA ATA CGA CCA AAT CCG TTG-3'
<i>Fibronectina 1</i>	F: 5'-CTG GCC AGT CCT ACA ACC AG-3' R: 5'-CAT GAA GCA CTC AAT TGG GCA-3'
<i>c-Jun</i>	F: 5'-GAG CTG GAG CGC CTG ATA AT-3' R: 5'-CCC TCC TGC TCA TCT GTC AC-3'
<i>c-Fos</i>	F: 5'-TAC TAC CAC TCA CCC GCA GA-3' R: 5'-CGT GGG AAT GAA GTT GGC AC-3'
<i>RAGE</i>	F: 5'-GCC ACT GGT GCT GAA GTG TA-3' R: 5'-GGA GAC AGG ACC TTC CAA GC-3'
hsa_circ_0001666	F: 5'-AGC TGT CAA GGA GTG GTT TGT-3' R: 5'-ACC TCT CAC ACC CAT AAC TGA-3'
hsa_circ_0001821	F: 5'-TTG GGT CTC CCT ATG GAA TG-3' R: 5'-CAA AAG ATC AGG CCT CAA GC-3'
hsa_circ_0001461	F: 5'-ATG AGG ACG CCA GAA GAG AT-3' R: 5'-CAA ATG TCT CCC CAT TGC TT-3'
hsa_circ_0000811	F: 5'-TGC TGA TGT CTG GCA AGA AG-3' R: 5'-CAA GAC GAT GCC AAA TTT CC-3'
hsa_circ_0001784	F: 5'-AGA ACA TGG GTC TGG GAA AA-3' R: 5'-CGC TTC ATG CAG TAA TCT GG-3'

8. RESULTADOS

8.1 Identificación de los circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa

El análisis integrado del conjunto de datos GSE43574 publicado por Memzack y colaboradores (Memczak S., *et al* 2013) a partir de datos de secuenciación, reveló 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM). Estos circRNAs, se encontraban distribuidos en 19 cromosomas, siendo el cromosoma 1 el que codificaba la mayor cantidad de ellos, 13 de los 60, seguido del cromosoma 17 con 7. Sin embargo, no se pudo determinar la localización cromosómica de los circRNAs circ-000771 y circ-001001 (Figura 8).

Posteriormente, analizamos el origen genómico de los 60 circRNAs, encontrándose que el 83.3 % de los circRNAs son de origen exónico/secuencia codificante (CDS), por otro lado, solo el 6.6 % de los circRNAs de origen intergénico, el 3.3 % de origen exónico e intergénico y el 5% de origen intrónico (Figura 9).

8.2 Predicción de los miRNAs y mRNAs blancos de los circRNAs expresados en HEK293

Existen tres procesos claves que influyen sobre la fisiopatología de la ND, los cuales son, la inflamación, la fibrosis y la hipertrofia renal. En particular, la inflamación mediada a través de la vía del factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$); la fibrosis a través de la vía del factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) y la hipertrofia través de la vía Janus cinasa 2 (JAK2), están reguladas por la interacción AGE/RAGE (Figura 10). La activación de NF- $\kappa\beta$, a consecuencia de la interacción AGE/RAGE, promueve la expresión de citocinas proinflamatorias. Por otra parte, a concentraciones elevadas de glucosa intracelular se sobre-expresa TGF- β 1 a nivel renal, promoviendo la producción de matriz extracelular, la proliferación y la hipertrofia, lo que conlleva al engrosamiento de la membrana basal, y generación de fibrosis en el túbulointersticial. Finalmente, la activación de la vía JAK2 promueve la producción de colágeno

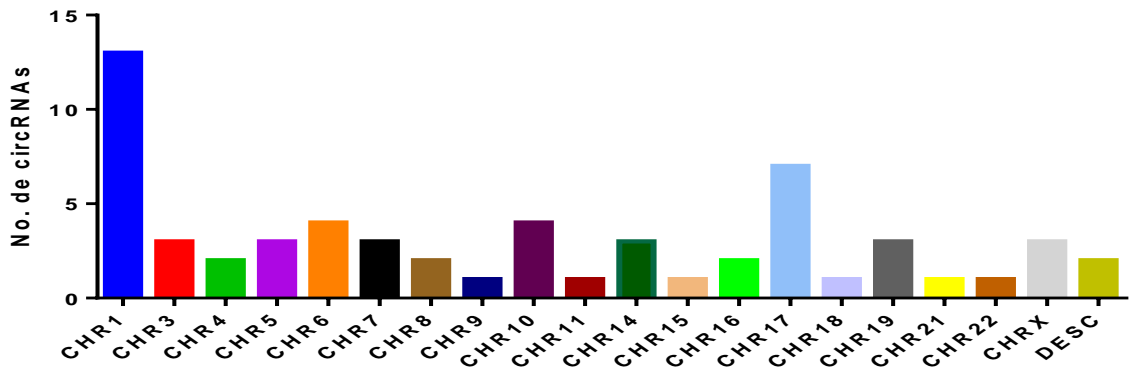


Figura 8. Distribución cromosómica de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM). Datos obtenidos de Memzack S., et al 2013.

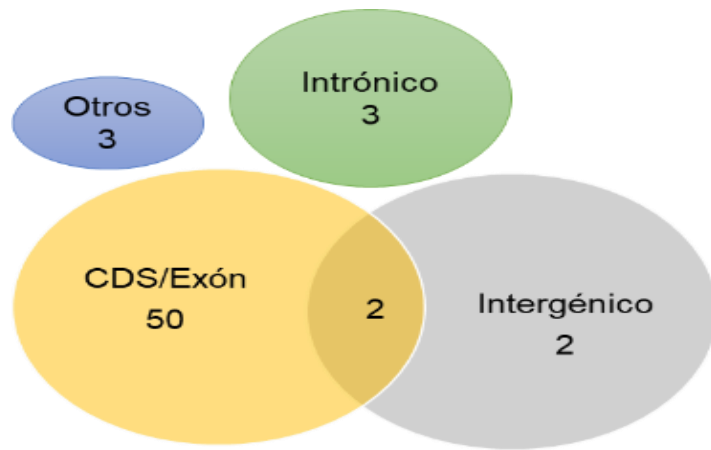


Figura 9. Origen genómico de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM).

y la subsecuente hipertrofia renal. Por esta razón, previo a la predicción de las interacciones de los circRNAs con los miRNAs blancos se delimitó el conjunto de los posibles mRNA blancos a los de las proteínas involucrados en las tres vías de señalización mencionadas. Específicamente, se seleccionaron solo los 11 mRNA de los genes que codifican a las proteínas c-Jun, c-Fos, AGER, JAK2, MAPK8, MAPK9, NFK β 1, PI3K, STAT1, STAT3 y TGF- β 1 para realizar este estudio (Figura 10).

A continuación, se realizó la predicción de los miRNAs blancos de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM), utilizando 3 bases de datos: circAtlas, CircInteractome y circBank. Se seleccionaron solo los miRNAs blancos que coincidieran en al menos dos bases de datos. Como resultado solamente seis miRNAs fueron predichos en las tres bases de datos (miRNA-127-5p, miRNA-217, miRNA-136-5p, miRNA-127-5p, miRNA-215-3p y miRNA-7-5p), mientras que 77 miRNAs fueron predichos en dos bases de datos para un total de 83 pares circRNAs-miRNAs (Figura 11A). Posteriormente, se identificaron los mRNAs blancos involucrados en los tres procesos claves observados en la ND (inflamación, fibrosis e hipertrofia), de los 83 miRNAs identificados previamente, utilizando las bases de datos TargetScan, miRTarBase y miRDB. Se predijeron 10 pares miRNA-mRNA en las 3 bases de datos (miRNA-1827/*TGFB1*, miRNA-508-3p/*NFKB1*, miRNA-1244/*MAPK8*, miRNA-95-5p/*MAPK8*, miRNA-562/*MAPK8*, miRNA-766/*MAPK8*, miRNA-1264/*MAPK8*, miRNA-18a-3p/*STAT3* y miRNA-507/*MAPK8*) y 24 pares miRNA-mRNA en dos bases de datos (Figura 11B). La predicción de la energía libre mínima de las interacciones, mediante el software RNAhybrid, reveló valores menores a -40 kcal/mol para todos los pares miRNA/mRNA analizados, lo cual sugirió que se establecían interacciones estables. Una de las interacciones predichas más estables fue la del miR-766-5p/*MAPK9* que tiene un ΔG de -108.9 kcal/mol (Figura 12A). Por otra parte, se analizó la energía libre total de unión, para los 34 pares miRNA/mRNA mediante el software RNAup, con un punto de corte de $\Delta G < -4$ kcal/mol, donde podemos observar que la interacción más favorable es la del par miR-1227-5p/*TGF β 1*, con una energía libre total de unión de -17,38 kcal / mol, lo que sugirió que la accesibilidad del miRNA por sus mRNA blancos es adecuada y en todos los casos es un proceso espontáneo (Figura 12B).

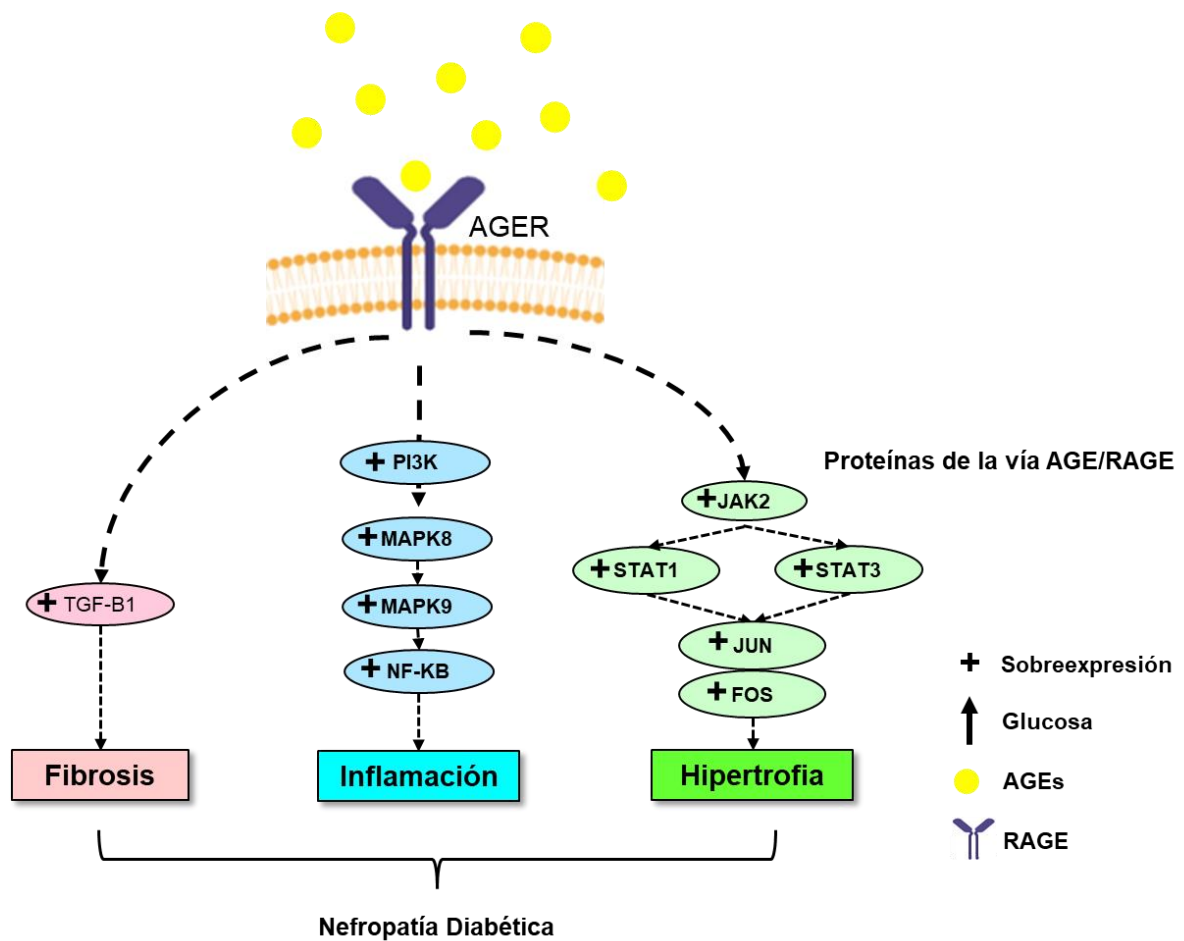


Figura 10. Genes blancos que fueron seleccionados para realizar este estudio. Los genes representados codifican a proteínas de las vías NF- κ β , JAK-STAT y TGF- β 1 del eje AGE/RAGE implicadas en los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia, respectivamente, como consecuencia del incremento sostenido de las concentraciones de glucosa.

Por otra parte, se analizó si los pares miRNA/mRNA predichos presentaban sitios de interacción canónicos. De manera interesante, el 35.2 % de los pares de miRNA/mRNA analizados presentaron más de dos sitios de interacción canónicos. De ellos, 8 pares miRNAs/mRNAs presentaron dos sitios de interacción canónica en la región 3'UTR de su blanco. Finalmente, 4 pares miRNA/mRNA presentaron tres sitios de interacción en la región 3'UTR de su blanco, por ejemplo, el miR-507 que tiene como blanco el mRNA de MAPK8, presentó en su región 3' UTR los tres tipos de interacción 8mer/7mer-m8/7mer-A1 (Figura 12C).

8.4 Construcción de la red circRNAs-miRNAs-mRNAs

Para comprender el papel de los circRNAs, miRNAs y sus mRNAs en ND, construimos una red de circRNA-miRNA-mRNA con la información de los 34 pares circRNA-miRNAs y mRNAs blancos identificados previamente (Figura 13A). La red está compuesta por 18 nodos de circRNA interactuando con 23 nodos de miRNA y a su vez estos últimos con 10 nodos de mRNA para un total de 57 aristas. Finalmente, agrupamos las redes de correulación en los 3 procesos principales involucrados en ND, Hipertrofia, Inflamación y Fibrosis. (Figura 13B). Como resultado se predijo que dos circRNA (circ_0001632 y circ_0001742) regulaban los procesos de inflamación, fibrosis e hipertrofia, mientras que otros tres (circ_0000154, circ_0000263 y circ_0000639) estaban implicados en la regulación de la inflamación e hipertrofia y solo uno (circ_0000012) en inflamación y fibrosis. Los 12 circRNA restantes regulaban inflamación o hipertrofia (Figura 13C).

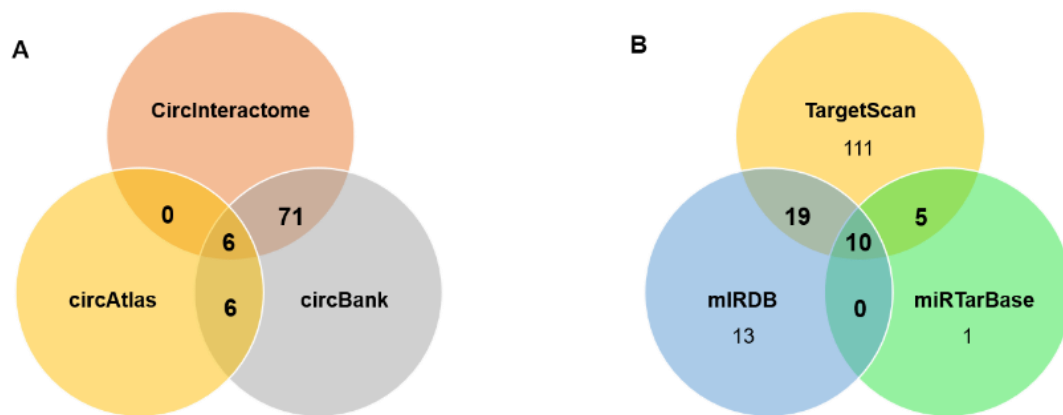


Figura 11. Predicción de los miRNAs y mRNAs. A) Predicción de los miRNAs blancos de los 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM), utilizando 3 bases de datos circAtlas, CircInteractome y circBank, B) Predicción de los mRNAs blancos, involucradas en ND, de los 83 miRNAs utilizando las bases de datos TargetScan, miRTarBase y miRDB.

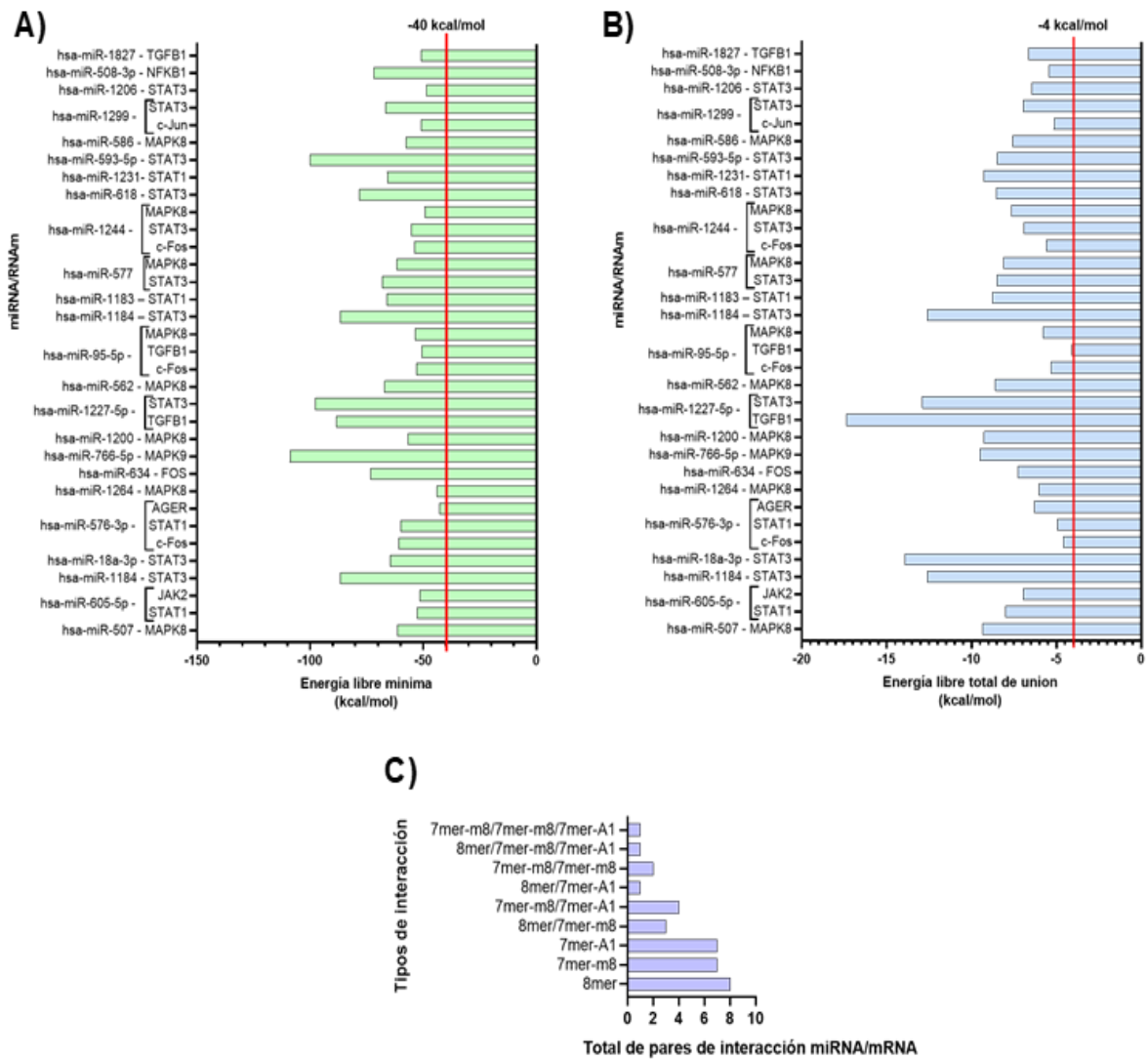


Figura 12. Predicción de la energía libre y los tipos de interacción miRNA-mRNA. A) Predicción de la energía libre mínima de los 34 pares miRNA-mRNA mediante el software RNAhybrid. B) Predicción de la energía libre de unión de los 34 pares miRNA-mRNA mediante el software RNAup. C) Predicción de los tipos de interacción canónicas 8mer, 7mer-1A y 7mer-8m. Estos sitios canónicos tienen una complementariedad de bases tipo Watson-Crick, entre la región 'semilla', en las posiciones 2 a 7 (u 8) desde el extremo 5' del miRNA y la región 3'-UTR del mRNA blanco. La línea roja en (A) y (B) señala el valor de energía libre mínima de -40 kcal/mol y de energía libre de unión de -4 kcal/mol, respectivamente.

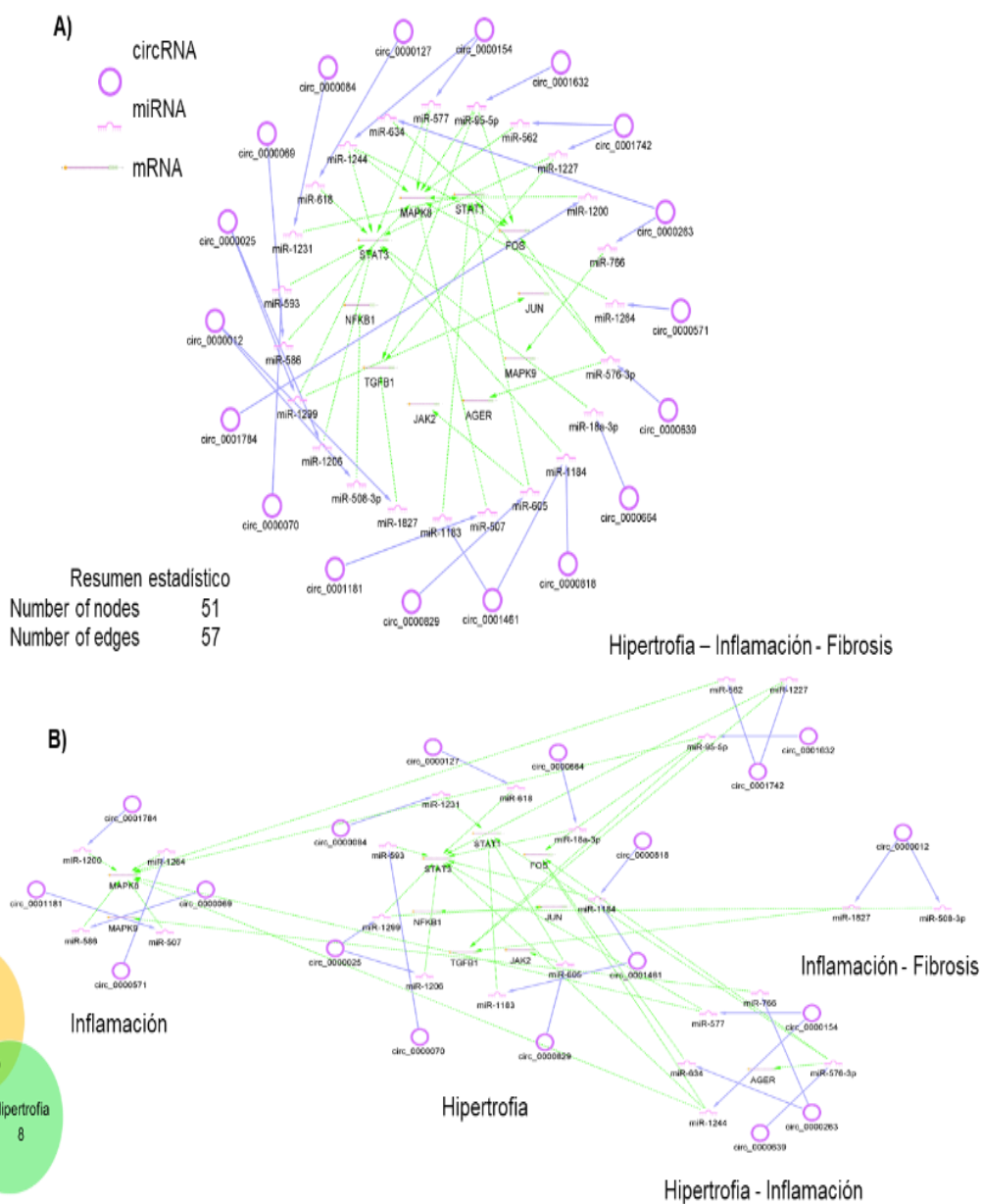


Figura 13. Red de coregulación de circRNA-miRNA-mRNA involucrada en los procesos de hipertrofia, inflamación y fibrosis renal mediada por hiperglucemia. A) Red global del eje de regulación circRNA-miRNA-mRNA; B) Redes agrupadas por cada proceso. Los circRNAs, miRNAs y mRNAs, están representados con su molécula respectivamente. circRNA, RNA circular; miRNA, microRNA.

8.5 Predicción de las proteínas blancos de los circRNAs expresados en HEK293

Para la predicción de los circRNAs candidatos a unirse a RAGE y/o proteínas de su vía de señalización se descargaron las secuencias de aminoácidos (aa) de la base de datos Uniprot de las 11 proteínas de interés (PI3K, NFKB1, TGF- β 1, RAGE, STAT3, STAT1, JAK2, MAPK8, MAPK9, c-Jun y c-Fos). Como control negativo, se seleccionaron 11 proteínas que no se unen a RNA (H2B, LIMA1, ACTB, HNF4 α , MC4R, PAX4, INSIG2, EGFP, Nkx22, TMM70 y RNOB2) y como control positivo 11 proteínas que se unen a RNA (FMRP, ZC3H7B, CELF4, eiF4E, FTO, RBFOX2, IGFBP3, FUS, SNRPA, PTBP1 y Sox2). Las secuencias de aa se utilizaron para predecir las regiones de unión a RNA mediante el software catRAPID, que utiliza un algoritmo que asigna una puntuación general de 0 a 1 a las regiones que son propensas de unirse a RNA. Si se obtienen valores mayores a 0.5 indica que la proteína se podría unir a RNA. Con el análisis realizado se pudo discriminar los controles negativos (Figura 14A) y positivos (Figura 14B) utilizados, los cuales alcanzaron una puntuación de 0.354 ± 0.033 y de 0.668 ± 0.067 (media \pm IC₉₅), respectivamente. Por esa razón, procedimos a utilizar el servidor catRAPID para evaluar la tendencia de las 11 proteínas en estudio a unirse a RNA. De manera interesante, los factores de transcripción c-Jun y c-Fos obtuvieron valores de 0.72 y 0.77 (Figura 14C), respectivamente, debido a la presencia de tres regiones clásicas, no clásicas y putativas de unión a RNA en c-Fos y 2 en c-Jun, lo cual sugirió que es posible la interacción entre circRNAs y estas proteínas. Una vez que se determinó que las proteínas c-Fos y c-Jun tenían regiones putativas de unión a RNA, se realizó un análisis por medio de la herramienta de software MEME para identificar motivos de unión a RNA en estas regiones. Para ello, se analizaron junto con una colección de secuencias de RRM (Anexo 1), encontrándose al menos un motivo RRM (similar al dominio LIG_NBox_RRM1) que está conservado en c-Fos (aa 217-226) y al menos en el 50% de la colección de secuencias analizadas (Figura 15A). En el caso de c-Jun se identificaron dos motivos RRM, uno similar al dominio SH3 LIG_G3BP_FGDF_1 en la región de los aa 193-202 (Figura 15B), y el segundo motivo RRM (Figura 15C) en la región de los aa 147-154 similar al dominio LIG_NBox_RRM1.

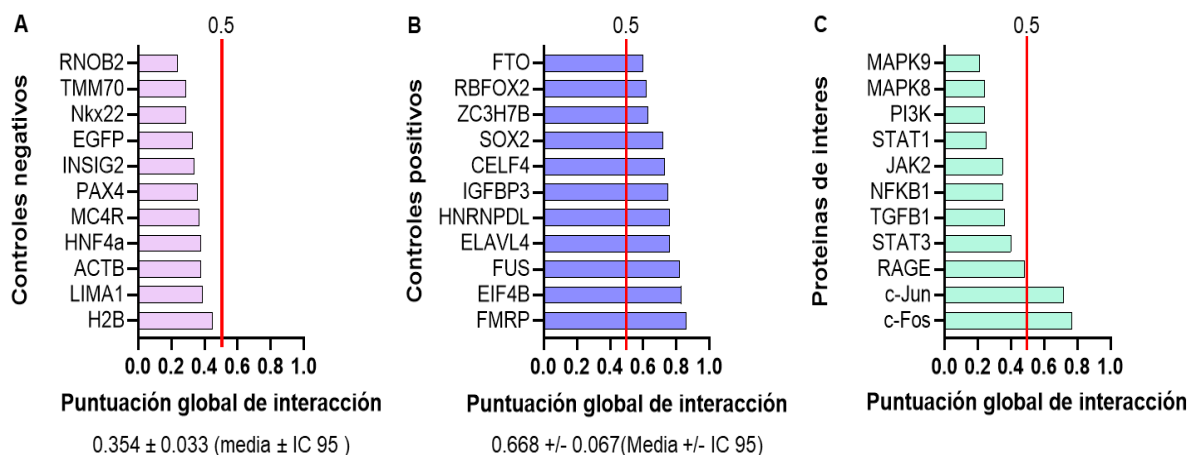


Figura 14. Predicción de regiones de unión a RNA de las proteínas de interés involucradas en la vía AGE-RAGE. A) Puntuación global de interacción de controles negativos. B) Puntuación global de interacción de controles positivos. C) Puntuación global de interacción de las proteínas de interés. Puntuaciones > 0.5 indica la presencia de regiones de unión a RNA. En la parte inferior de A y B se muestra el valor de la media ± IC₉₅ de la puntuación global de la interacción de los controles negativos y positivos, respectivamente.

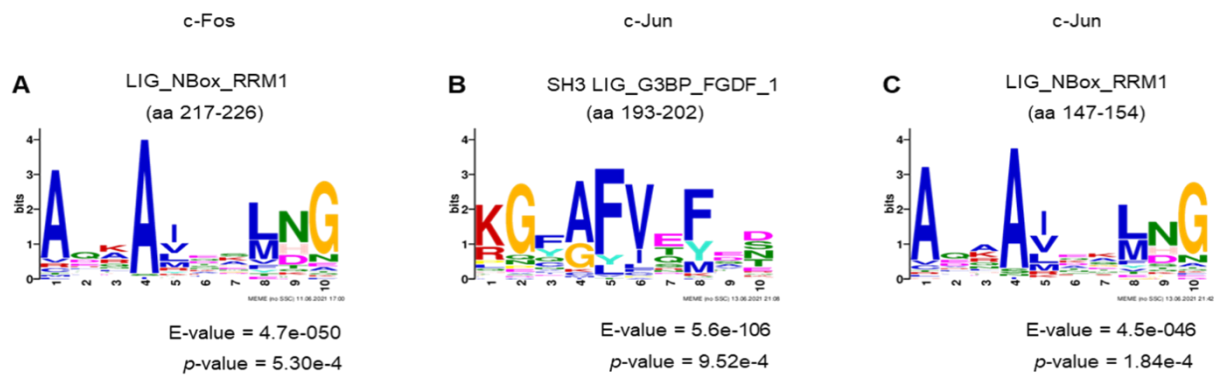


Figura 15. Motivos RRM conservados en c-Fos y c-Jun. A) Logo del motivo conservado en c-Fos B-C) Logos de los motivos conservados en c-Jun. Se empleó el programa MEME Suite 5.3.3. Se muestran los valores de p y E para cada uno.

Posteriormente, se realizó la búsqueda de interacciones circRNA-proteína mediante el software RPISeq. Las predicciones de RPISeq se basan en clasificadores Random Forest (RF) o Support Vector Machine (SVM) que utilizan solamente información de secuencia. Estos clasificadores están entrenados y probados en 2 conjuntos de datos de referencia de interacciones RNA-proteína, RPI2241 y RPI369, extraídos de PRIDB, una base de datos de complejos RNA-proteína. El software, de acuerdo con la probabilidad de ocurrencia de la interacción RNA-proteína les asigna una puntuación en la escala de 0 a 1, y sugiere que en aquellas que alcancen un valor ≥ 0.5 es probable que ocurran las interacciones. En este trabajo primero se procedió a buscar y descargar las secuencias de los 60 circRNAs expresados en HEK293 mediante la base de datos CircInteractome y la secuencia de aa de las 11 proteínas de interés involucradas en las tres vías de señalización (NF- κ B, TGF- β 1 y JAK2) reguladas por la interacción AGE-RAGE (Figura 16). A continuación, se realizó la predicción de interacción de cada par circRNA-proteína, y para mejorar la sensibilidad de las predicciones se tomó como punto de corte puntuaciones ≥ 0.8 . Los resultados obtenidos utilizando el clasificador SVM revelaron 54 circRNAs que posiblemente interactúan con al menos una de las 11 proteínas de interés, de estos solo 22 circRNAs interactúan con todas. Interesantemente, los circ_0000026, circ_0000775 y circ_0000966 interactúan con la proteína MAPK8, los circ_0000164 y circ_0001908 con PI3K, mientras que los circ_0001423 y circ_0001909 con ambas proteínas (Figura 16A). Se encontró también que 43 circRNA interactúan tanto con c-Jun como con c-Fos, mientras que únicamente dos circRNAs interactúan con c-Fos (Figura 16B). Los resultados obtenidos utilizando el clasificador RF y un punto de corte ≥ 0.8 mostraron 34 circRNAs que posiblemente interactúan con al menos una de las 11 proteínas de interés. Dentro de esas interacciones, los circ_0001276 y circ_0001345 solamente las establecen con RAGE, los circ_0001470 y circ_0001633 con STAT3, los circ_0000211 y circ_0000704 con c-Jun y finalmente los circ_0000769 y circ_0000779 interactúan únicamente con JAK2 (Figura 16C). Utilizando el clasificador RF y un valor de punto de corte ≥ 0.8 se encontraron 5 circRNA que interactúan con c-Jun y con c-Fos, 10 con c-Jun y solamente 3 con c-Fos (Figura 16D). Interesantemente, para el circ_0001908 se predijo, con ambos clasificadores, que interactúa con la proteína PI3K.

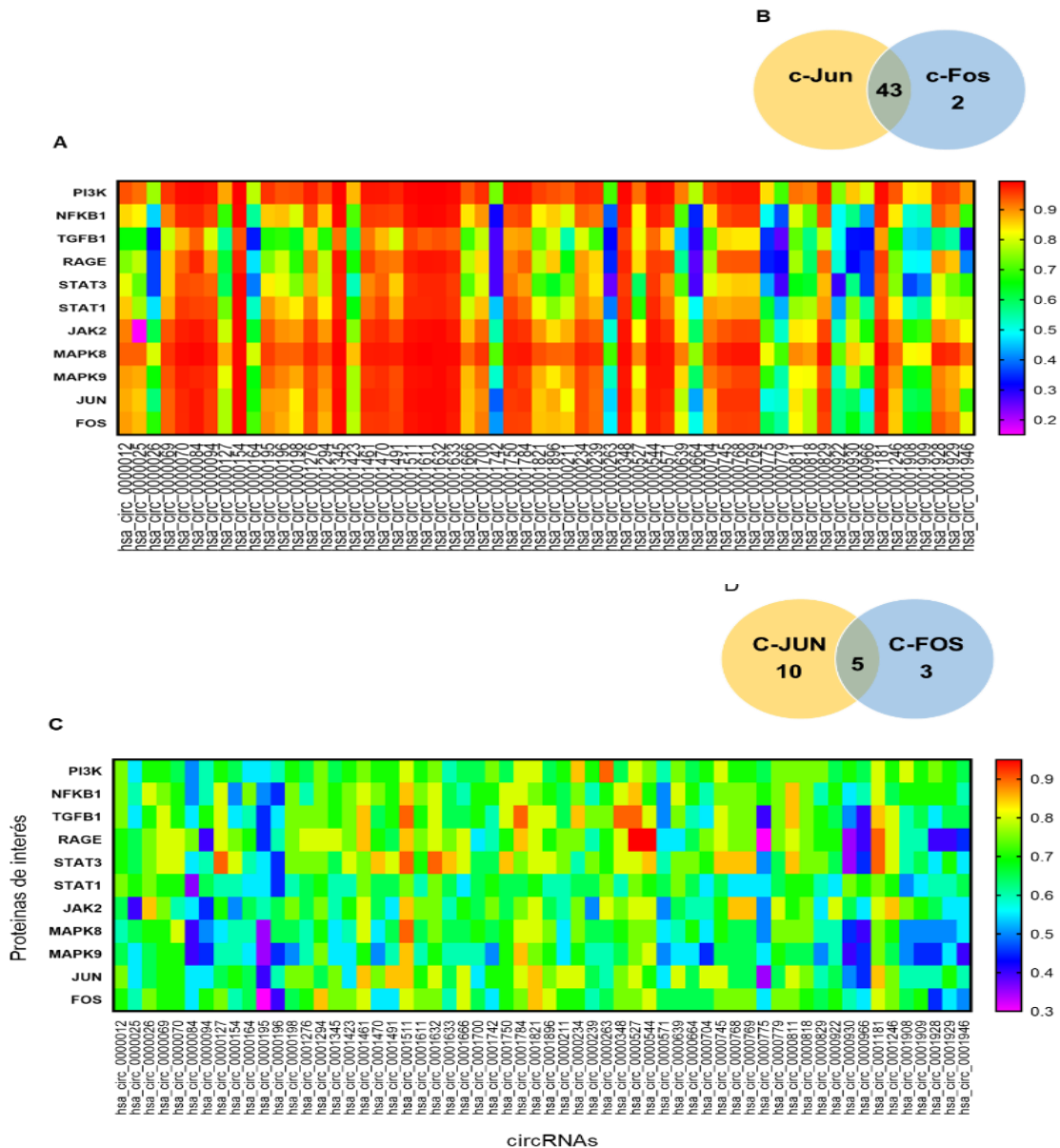


Figura 16. Mapas de calor de la probabilidad de las interacciones entre los circRNAs expresados en HEK293 y las proteínas implicadas en las vías de señalización NF- κ B, TG β -1 y JAK2. A) La probabilidad de las interacciones se estimó con el clasificador SVM; B) Diagrama de Venn de las interacciones con puntuaciones ≥ 0.8 predichas mediante el clasificador SVM entre los circRNAs analizados y c-Jun y/o c-Fos; C) La probabilidad de las interacciones se estimó con el clasificador RF; D) Diagrama de Venn de las interacciones con puntuaciones ≥ 0.8 predichas mediante el clasificador RF entre los circRNAs analizados y c-Jun y/o c-Fos. A la derecha de A) y B) se muestra la escala de colores. Las predicciones se realizaron con el software RPIseq.

Al filtrar los datos de las interacciones por el criterio de que se obtuvieran puntuaciones con un valor ≥ 0.8 , simultáneamente con los dos clasificadores, encontramos 17 circRNAs que interactuaban con c-Jun y/o c-Fos. Cinco de esos círculos interactuaban con c-Fos y c-Jun, mientras que tres solo lo hacían con c-Fos y nueve con c-Jun. Utilizando el software RBPsuite se predijo que esos 17 circRNAs tienen motivos de unión a RBP, algunos conocidos y otros no conocidos (Tabla 3). Finalmente, se seleccionaron cinco de los 17 circRNAs que interactúan *in silico* con c-Jun y/o c-Fos con puntuaciones superiores a 0.8 con los dos clasificadores (circ_0001666, circ_0001821, circ_0001461, circ_0000811 y circ_0001784) para analizar su expresión en la línea celular AD-293 a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y de CML.

Los resultados hasta ahora obtenidos mediante el análisis *in silico* permiten proponer que los factores de transcripción c-Jun y c-Fos tienen motivos RRM los cuales podrían estar interactuando con circRNAs.

8.6 Los circRNAs y sus genes parentales

Diferentes estudios han demostrado que tanto los circRNAs, localizados en el citoplasma como en el núcleo pueden regular la transcripción de sus genes parentales a través de la regulación de la expresión de diferentes factores de transcripción (Shao T., *et al* 2020). Considerando que en este trabajo se identificaron 17 circRNAs que probablemente interactúen con c-Jun y/o c-Fos, los cuales componen el factor de transcripción AP-1, identificamos los genes parentales de cada uno de los 17 circRNAs y analizamos su expresión en tejido de riñón sano de 122 individuos, mediante la base de datos Expression Atlas, y si los promotores de esos genes tenían sitios de unión a c-Jun y/o c-Fos. En condiciones fisiológicas encontramos que en tejido de riñón hay una mayor expresión de los genes parentales FAT1(circ_0001461), SMARCC1(circ_0001294) y PRRC2B (circ_0001896) (Figura 17, Tabla 4). Interesantemente, Zheng y colaboradores demostraron que FAT1 se sobreexpresa en pacientes con ND en comparación con el grupo control (sanos), sin embargo, los mecanismos moleculares de la participación de FAT1 en la enfermedad aún no están dilucidadas (Zheng M., *et al* 2012).

Tabla 3. CircRNAs que interactúan *in silico* con c-Jun y/o c-Fos y motivos de unión a RBP predichos en su secuencia

RNA circular	Proteínas con que interactúa <i>in silico</i>	Motivos de unión a RBP predichos	
		Conocidos	Desconocidos
hsa_circ_0001181	c-Fos y c-Jun	3	17
hsa_circ_0001511	c-Fos y c-Jun	12	19
hsa_circ_0001666	c-Fos y c-Jun	12	21
hsa_circ_0001821	c-Fos y c-Jun	10	16
hsa_circ_0001461	c-Fos y c-Jun	13	23
hsa_circ_0001896	c-Fos	12	16
hsa_circ_0001294	c-Fos	13	18
hsa_circ_0000544	c-Fos	16	19
hsa_circ_0000211	c-Jun	12	19
hsa_circ_0000811	c-Jun	12	17
hsa_circ_0001632	c-Jun	13	22
hsa_circ_0001491	c-Jun	7	22
hsa_circ_0001784	c-Jun	12	23
hsa_circ_0000234	c-Jun	8	25
hsa_circ_0000527	c-Jun	17	20
hsa_circ_0000704	c-Jun	7	23
hsa_circ_0000745	c-Jun	10	19

Se muestran los circRNAs que, mediante el análisis con el software RPISeq, obtuvieron puntuaciones con un valor ≥ 0.8 simultáneamente con los clasificadores SVM y RF. En negritas se señalan los circRNAs que seleccionamos para realizar los análisis experimentales

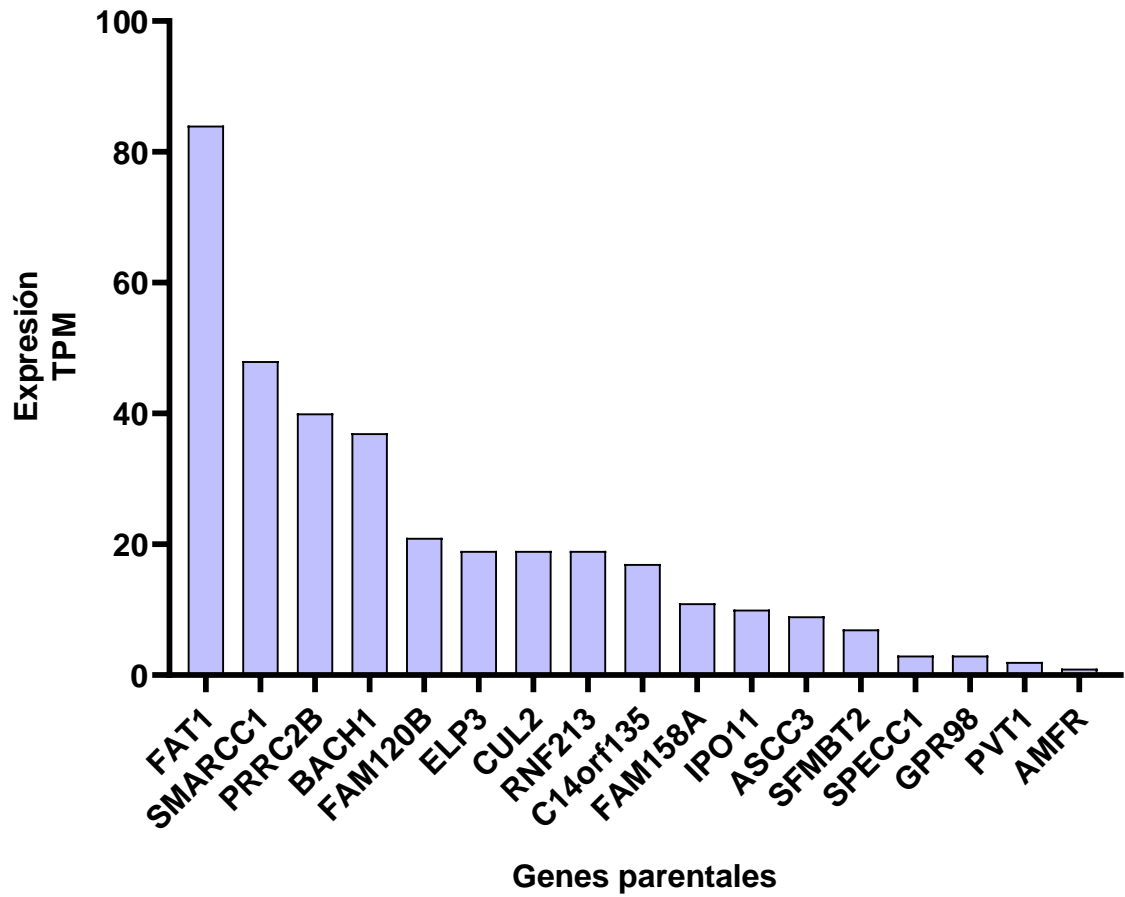


Figura 17. Análisis *in silico* de la expresión de los genes parentales de los circRNAs en tejido de riñón sano mediante la base de datos Expression Atlas. TPM: transcritos por millón.

Tabla 4. Genes parentales de los 17 circRNAs y evidencias de su relación con la fisiopatología de la diabetes mellitus y/o nefropatía diabética

circRNAs	Gen parental	Codifica	Evidencias	Referencia
circ_0001461	FAT1	Protocadherina FAT1	Se sobreexpresa en pacientes con ND	Zheng M., <i>et al</i> 2012
circ_0001294	SMARCC1	Familia de proteínas SWI/SNF,	Desconocida	N/A
circ_0001896	PRRC2B	Proteína PRRC2B	Desconocida	N/A
circ_0001181	BACH1	Factor de transcripción que pertenece a la familia tipo cap 'n' collar	La hiperglucemia promueve la sobreexpresión de BACH1, regulando la EndMT en ND	Li X., <i>et al</i> 2022
circ_0001666	FAM120B	Familia con similitud de secuencia 120B	El SNP (rs924043) se asocia con la DM, se encuentra en una región intergénica y alberga múltiples genes, incluidos <i>FAM120B</i> .	Bradfield, J. P., <i>et al</i> 2011
circ_0001784	ELP3	Complejo proteico elongador 3	Desconocida	N/A
circ_0000234	CUL2	Cullina 2	CUL2 se sobreexpresa en células progenitoras endoteliales tratadas con ácido fólico de pacientes con DTM1.	Lu Y., <i>et al</i> 2020
circ_0000811	RNF213	E3 ubiquitina-proteína ligasa RNF213	La inhibición de RNF213 mejora la tolerancia a la glucosa al proteger las células β de los islotes en ratones KO/Akita.	Kobayashi H., <i>et al</i> 2013
circ_0000544	C14orf135	Pecanex 4	Desconocida	N/A
circ_0000527	FAM158A	Subunidad 9 del complejo proteico de la membrana del RE	Desconocida	N/A

circ_0001491	IPO11	Importin-11	Las variantes genéticas en HSD17B3, SMAD3 e IPO11 afectan los lípidos circulantes en respuesta al fenofibrato en pacientes con DMT2.	Rotroff D., <i>et al</i> 2018
circ_0001632	ASCC3	La subunidad 3 del complejo 1 cointegrador de la señal de activación	Desconocida	N/A
circ_0000211	SFMBT2	Scm Like con 4 dominios Mbt-2	La privación de la glucosa de glucosa activa la expresión de <i>sfmbt2</i> a través del estrés oxidativo y la inhibición de la desacetilación de histonas en líneas celulares de ratón B/CMBA.Ov.	Druz A., <i>et al</i> 2012
circ_0000745	SPECC1	Cytospin-B	Desconocida	N/A
circ_0001511	GPR98	Receptor asociado a proteínas G 98	Desconocida	N/A
circ_0001821	PVT1	Oncogén Pvt1	El silenciamiento del lncRNAPVT1 inhibe el daño de los podocitos y la apoptosis en ND mediante la regulación positiva de FOXA1	Liu D., <i>et al</i> 2019
circ_0000704	AMFR	Receptor del factor de motilidad autocrina	Desconocida	N/A

8.7 Regulación de la expresión de los genes parentales de los circRNAs por los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y AP-1

Posteriormente, analizamos si los genes parentales de los 17 circRNAs presentaban sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y AP-1. De manera interesante, encontramos que los 17 genes parentales de los circRNAs presentan sitios de unión para los 3 factores de transcripción (Figura 18). En conjunto, estos resultados sugirieron que los circRNAs estudiados si son capaces de interactuar con c-Jun y/o c-Fos, funcionando como esponja de estos, podrían regular la transcripción de sus genes parentales y a su vez la de los circRNAs a los cuales les dan origen. Es decir, se podría establecer una red de correulación negativa de la expresión de los genes parentales de los circRNAs, de estas moléculas circulares y probablemente de otros genes que su transcripción fuera regulada por c-Jun y c-Fos si realmente los circRNAs candidatos a unirse a estos factores de transcripción lo hicieran efectivamente. Debe destacarse que como no se disponen de datos de expresión en células renales de esos genes en condiciones de altas concentraciones de glucosa, ni de los circRNAs, sería imposible plantearse una hipótesis razonable acerca la correulación de la expresión de los circRNAs y sus genes parentales. No obstante, es un dato para considerar para estudios posteriores.

8.8 Predicción de la unión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs

Los cambios en la expresión de los miRNAs pueden ocurrir debido a cambios en la expresión de sus genes parentales. Varios estudios han sugerido vínculos entre la expresión de miRNAs y los factores de transcripción, es por eso, que buscamos sitios de unión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los 23 miRNAs (Figura 19). Encontramos que los promotores de 5 miRNAs (miR-618, miR-1227, miR-1200, miR-576, miR-593) tienen sitios de unión para c-Fos, mientras que, los promotores de 8 miRNAs (miR-1183, miR-1227, miR-1200, miR-576, miR-18a, miR-593, miR-586, miR-605) presentan sitios de unión para c-Jun. Este hallazgo sugiere que c-Fos y c-Jun, podrían regular la transcripción de estos miRNAs. Es importante destacar, que los miR-1183 y miR-1200, son blancos predichos de los

circ_0001461y circ_0001784, respectivamente. Estos dos últimos circRNAs están dentro de los 5 circRNAs seleccionados para continuar el estudio, dado que interactúan *in silico* con c-Jun y/o c-Fos, por lo que podrían estar participando en una posible regulación por *feedback*.

8.9 Determinación del tiempo óptimo de exposición a CML a partir del cual se activa la vía AGE-RAGE en la línea celular AD-293

Para determinar el tiempo óptimo a partir del cual se activa la vía AGE-RAGE las células AD-293 se cultivaron a concentraciones elevadas de glucosa (30 mM) y 50 µg/ml de N-ε-carboxi-metil-lisina (CML) durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) y se cuantificó la expresión de RAGE. La concentración de CML utilizada fue similar a la reportada por Holik y colaboradores ya que en células SH-SY5Y es capaz de incrementar la expresión de *RAGE* y activarlo sin afectar la viabilidad celular (Holik A., *et al* 2013). Como control utilizamos células expuestas a bajas concentraciones de glucosa (5.5 mM) y a un medio con alta osmolaridad, como la que provoca las altas concentraciones de glucosa, pero en el que la concentración de D-glucosa era 5.5 mM y de L-glucosa 24.5 mM.

Los resultados obtenidos mostraron que a las 48 h de incubación con glucosa 30 mM y 50 µg/ml de CML se incrementaba significativamente la expresión de *RAGE* ($p=0.05$) semejante a lo que ocurría después de mantener las células durante 72 h continuas de crecimiento en condiciones fisiológicas, probablemente por la acumulación de desechos tóxicos (Figura 20). Como consecuencia de estos resultados se concluyó que a concentraciones de 50 µg/ml de CML y 48 h se activaba la vía AGE-RAGE y se decidió analizar el efecto de diferentes concentraciones de CML a ese mismo tiempo de incubación para optimizar las condiciones activación de la vía y realizar el resto de los experimentos.

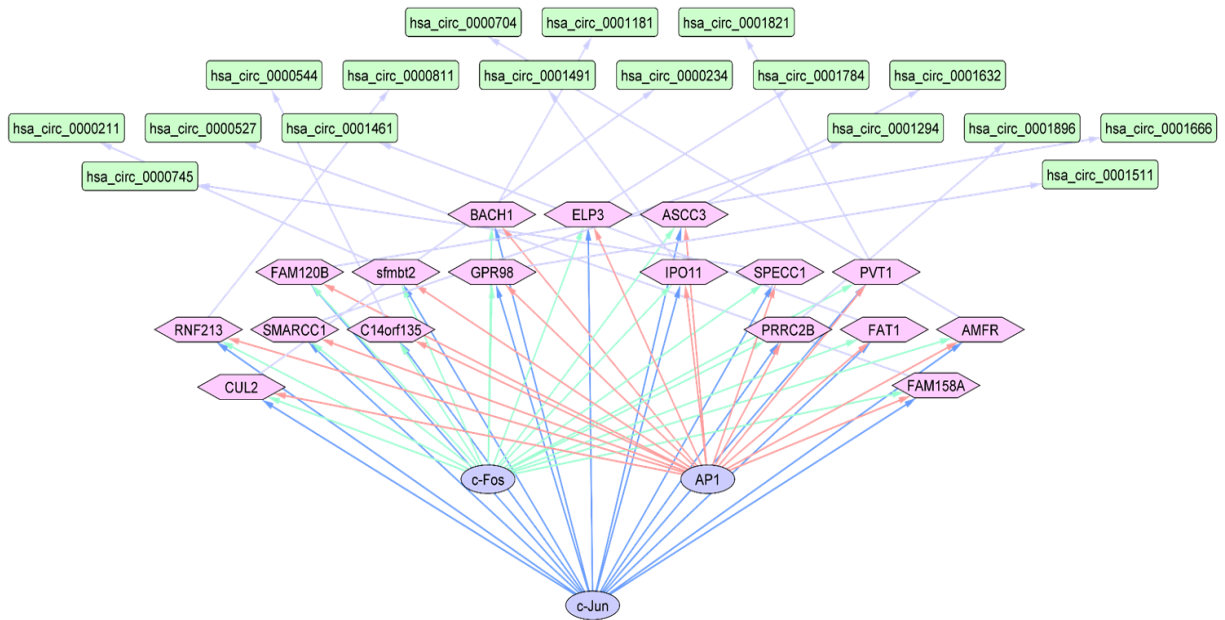


Figura 18. Los genes parentales de los 17 circRNAs presentan sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y AP-1. El análisis se realizó mediante la base de datos de biogrid LASAGNA.



Figura 19. Predicción de la unión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos en los promotores de los miRNAs. En círculo amarillo se encuentra los factores de transcripción c-Jun y c-Fos; en rectángulo verde los miRNAs.

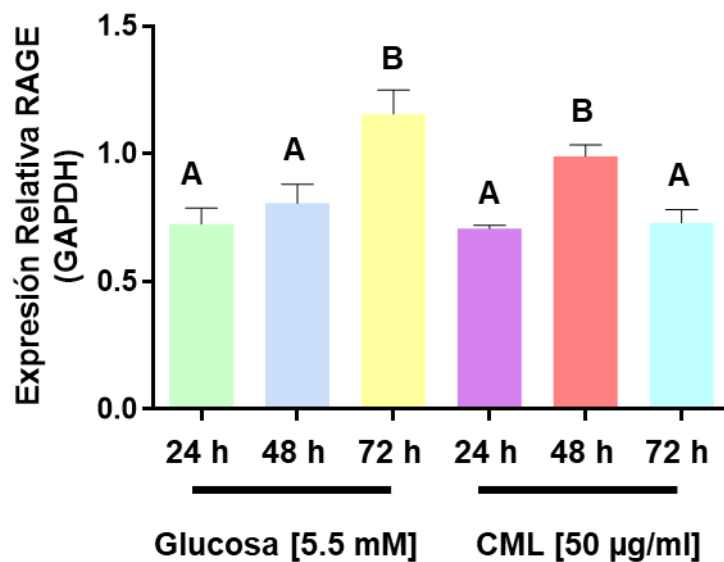


Figura 20. Expresión relativa de *RAGE* en la línea celular AD-293 tratada con CML (50 µg/ml) durante diferentes tiempos de incubación. Los datos de expresión relativa se analizaron estadísticamente mediante la prueba ANOVA de una vía. Los datos se expresaron media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a un nivel de significancia de 0.05.

8.10 Efecto de la exposición a concentraciones elevadas de glucosa y CML durante 48 h sobre la viabilidad celular en la línea AD-293

Se investigó el efecto de concentraciones elevadas de glucosa (HG), así como, concentraciones elevadas de glucosa (HG) más N- ϵ -carboxi-metil-lisina (CML) a diferentes concentraciones [25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$] sobre la viabilidad celular de la línea celular AD-293, después de 48 h de tratamiento. Los datos mostraron que ninguno de los tratamientos afectó la viabilidad celular ($p = 0.0976$) (Figura 21), por lo tanto, se prosiguió a realizar el análisis de la expresión de los circRNAs y los genes que codifican RAGE, c-Jun, c-Fos y Fibronectina en la línea celular AD-293 en estas condiciones.

8.11 Efecto de la concentración de glucosa y CML sobre la expresión de los circRNAs en la línea celular AD-293

Posteriormente, analizamos la expresión de los cinco circRNAs (circ_0001666, circ_0001821, circ_0001461, circ_0000811 y circ_0001784) seleccionados, que presentaron sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun y c-Fos, en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h. Como control utilizamos células expuestas a bajas concentraciones de glucosa (5.5 mM) y a un medio con alta osmolaridad, como la que provoca las altas concentraciones de glucosa, pero en el que la concentración de D-glucosa era 5.5 mM y de L-glucosa 24.5 mM.

Los resultados mostraron que el circ-000461 se sobreexpresa a altas concentraciones de glucosa, así como con alta glucosa + CML a 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, a 100 $\mu\text{g/ml}$ se reprime su expresión en comparación con el control (baja glucosa). Asimismo, los circ-0001666, el circ_0001784 y circ_0001821, mostraron una tendencia similar al sobreexpresarse con el tratamiento de alta glucosa + CML a 25 o 50 μM $\mu\text{g/ml}$ en comparación con bajas concentraciones de glucosa. Finalmente, el circ_0000811 solo se sobreexpresaba en alta glucosa + CML (25 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 22).

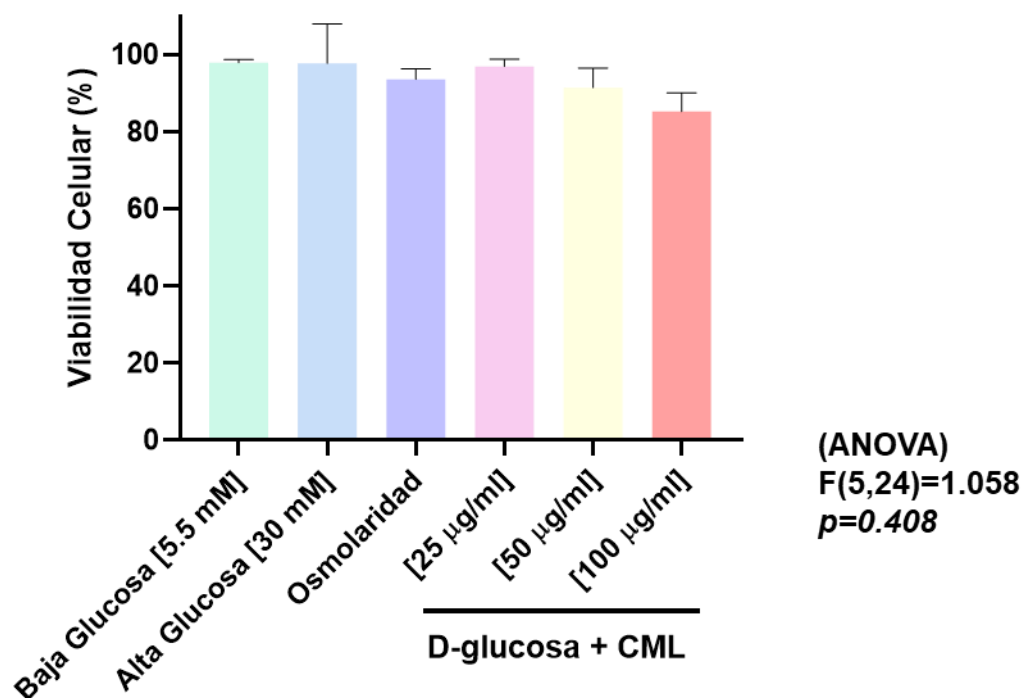


Figura 21. Viabilidad celular en la línea celular AD-293 cultivada bajo el tratamiento de concentraciones altas de glucosa (HG) y CML [25, 50 y 100 µg/ml]. A. Se muestran la media y error estándar de la media del porcentaje de células viables, determinadas por ensayo MTT, después de 48h de tratamiento bajo las condiciones mencionadas. Se realizaron cinco réplicas independientes por grupo. Los datos relativos a la viabilidad celular se analizaron estadísticamente mediante la prueba ANOVA de una vía a un nivel de significancia de 0.05.

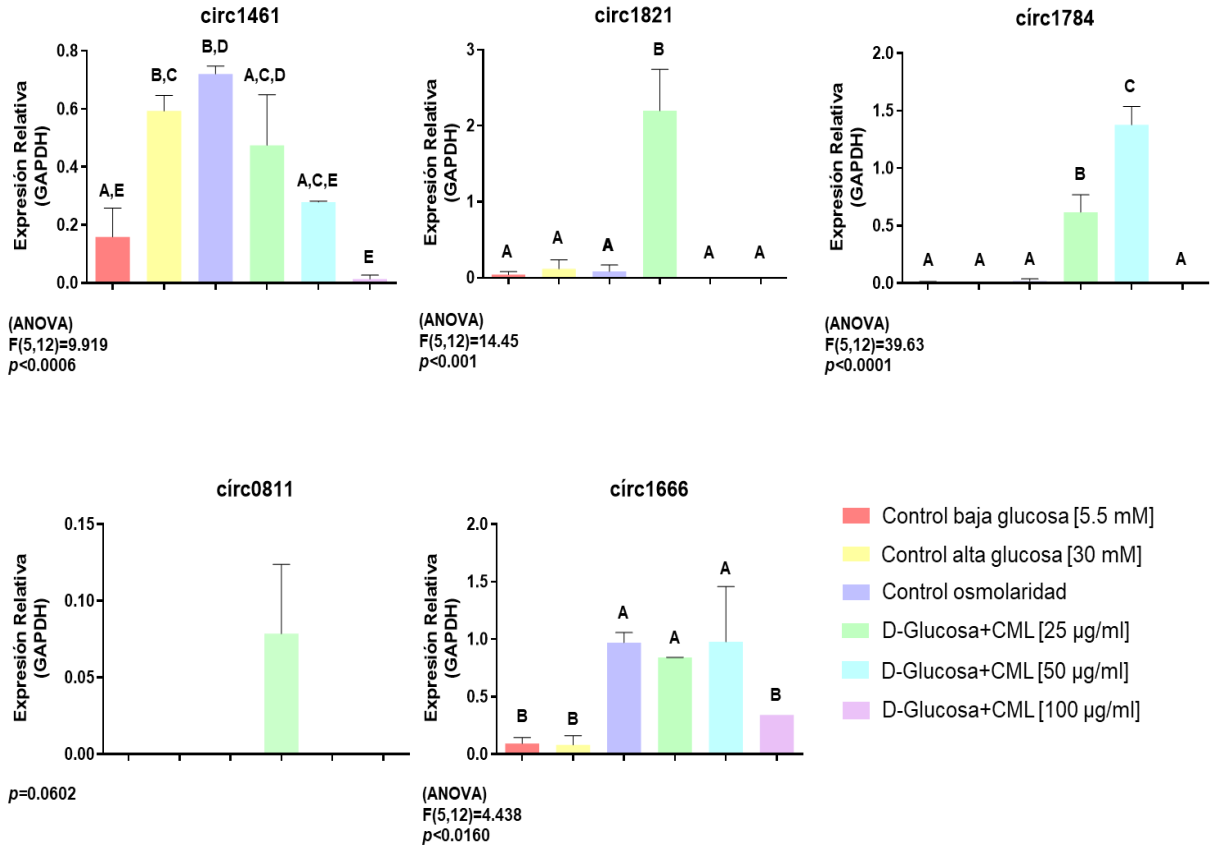


Figura 22. Expresión de los circRNAs en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa y CML (25, 50 y 100 µg/ml). Los datos relativos a la expresión de los circRNAs se analizaron estadísticamente mediante la prueba ANOVA de una vía. Las barras representan la media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Las letras indican diferencias estadísticas a un nivel de significancia menor a 0.05, entre los diferentes tratamientos.

8.12 Efecto de la concentración de glucosa y CML sobre la expresión de *RAGE*, *c-Jun*, *c-Fos* y *fibronectina 1* en la línea celular AD-293

El análisis de la expresión de *RAGE* confirmó los resultados iniciales donde se sobreexpresó significativamente con los tratamientos de CML 50 µg/ml a las 48 h (Figura 20). Por el contrario, a 25 y 50 µg de CML/ml no se encontraron diferencias en la expresión de *RAGE*, sin embargo, si se reprimió cuando se incrementó la concentración de CML [100 µg/ml], con respecto al tratamiento solamente con alta glucosa (30 mM) ($p < 0.05$) (Figura 23). Por otra parte, el incremento en el grupo de osmolaridad (Figura 23) no modificó la expresión de *RAGE*, por lo que los efectos anteriores debieron ser solamente atribuibles al incremento en la concentración de D-Glucosa y la presencia de AGEs. Estos resultados sugirieron que la exposición a 25 y 50 µg de CML/ml activa la vía AGE-RAGE y que en esas condiciones experimentales podrían estudiarse como se modula la expresión de los circRNAs seleccionados y sus proteínas blanco.

Además, analizamos la expresión de los factores de transcripción *c-Jun* y *c-Fos*. Nuestros datos mostraron que la expresión del factor de transcripción *c-Jun* se reprimió con los diferentes tratamientos en comparación con el control (baja glucosa). Esto podría sugerir, que los circRNAs al poseer sitios de unión para este factor de transcripción, pudieran regularlo de manera negativa y estar actuando como esponjas de *c-Jun* (Figura 23). Finalmente, analizamos la expresión de *Fibronectina-1* debido a que es una proteína presente en la matriz extracelular y su acumulación en el glomérulo en ND se ha asociado con el deterioro de la función renal en estos pacientes. De manera interesante, nuestros datos mostraron una sobreexpresión de *Fibronectina 1* a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y con alta glucosa + diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 µg/ml) en comparación con el control (Figura 22). Sugiriendo, que su sobreexpresión contribuye a la expansión mesangial y promueve la fibrosis, hipertrofia e inflamación en ND.

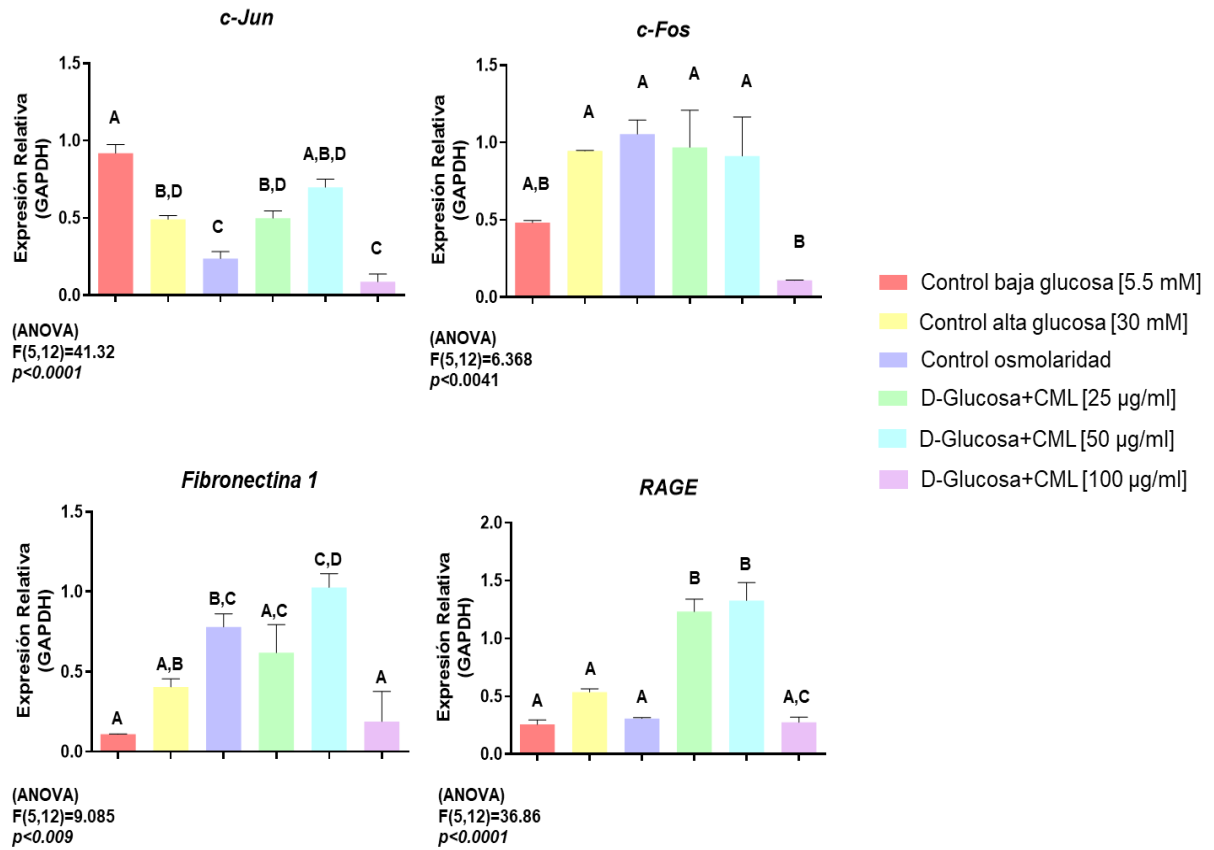


Figura 23. Expresión de *RAGE*, *c-Jun*, *c-Fos* y *fibronectina 1* en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa y CML (25, 50 y 100 µg/ml). Los datos relativos a la expresión de los circRNAs se analizaron estadísticamente mediante la prueba ANOVA de una vía. Las barras representan la media de tres experimentos independientes ± error estándar. Las letras indican diferencias estadísticas a un nivel de significancia menor a 0.05, entre los diferentes tratamientos.

8.13 Correlación entre los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1784, circ_1461, circ_0811, circ_1821) y *RAGE*, *c-Jun*, *c-Fos* y *fibronectina 1* en la línea celular AD-293

Los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1784, circ_1461, circ_0811, circ_1821) se compararon con los niveles de expresión de *RAGE*, *c-Jun*, *c-Fos* y *fibronectina 1* con el fin de determinar el grado de su coexpresión en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa y CML (25, 50 y 100 µg/ml). Curiosamente, el análisis de correlación del circ_1784 con *c-Jun* generó una correlación positiva ($r = 1$, $p = 0.005$), sin embargo, con los niveles de expresión de *fibronectina 1* expuesta a 25 µM o 50 µg de CML/ml, generó una correlación negativa ($r = -1$, $p = 0.0018$ y $r = -1$, $p = 0.0018$, respectivamente), lo cual indicaría que mientras la expresión del circ_1784 aumenta disminuye la expresión de *fibronectina*. A continuación, se analizó la correlación entre los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1461 y circ_0811) y los mRNAs (*RAGE* y *c-Fos*). Se encontró una correlación positiva entre la expresión de los circRNAs (circ_1461 y circ_0811) y la de *RAGE* ($r = 1$; $p = 0.0006$ y $r = 1$; $p = 0.0025$, respectivamente), lo cual podría sugerir que tanto los circRNAs como *RAGE*, podrían contribuir al desarrollo de ND. Por otra parte, la correlación entre la expresión de los circRNAs (circ_1461 y circ_0811) y de *c-Fos* fue negativa ($r = -1$, $p = 0.0005$ y $r = -1$, $p = 0.0037$, respectivamente), esto podría indicar que estos circRNAs podrían actuar como esponjas del factor de transcripción *c-Fos*, por lo tanto, el nivel de expresión de los circRNAs es inversamente proporcional a los niveles de expresión de *c-Fos*. Finalmente, la expresión relativa de circ_1821 se correlacionó positivamente con la de *fibronectina1* ($r = 1$, $p = 0.0006$), por lo tanto, estos datos sugirieron que la sobreexpresión tanto de *fibronectina1* como la del circRNA contribuyen a la expansión mesangial y promueve la fibrosis, hipertrofia e inflamación en ND (Figura 24).

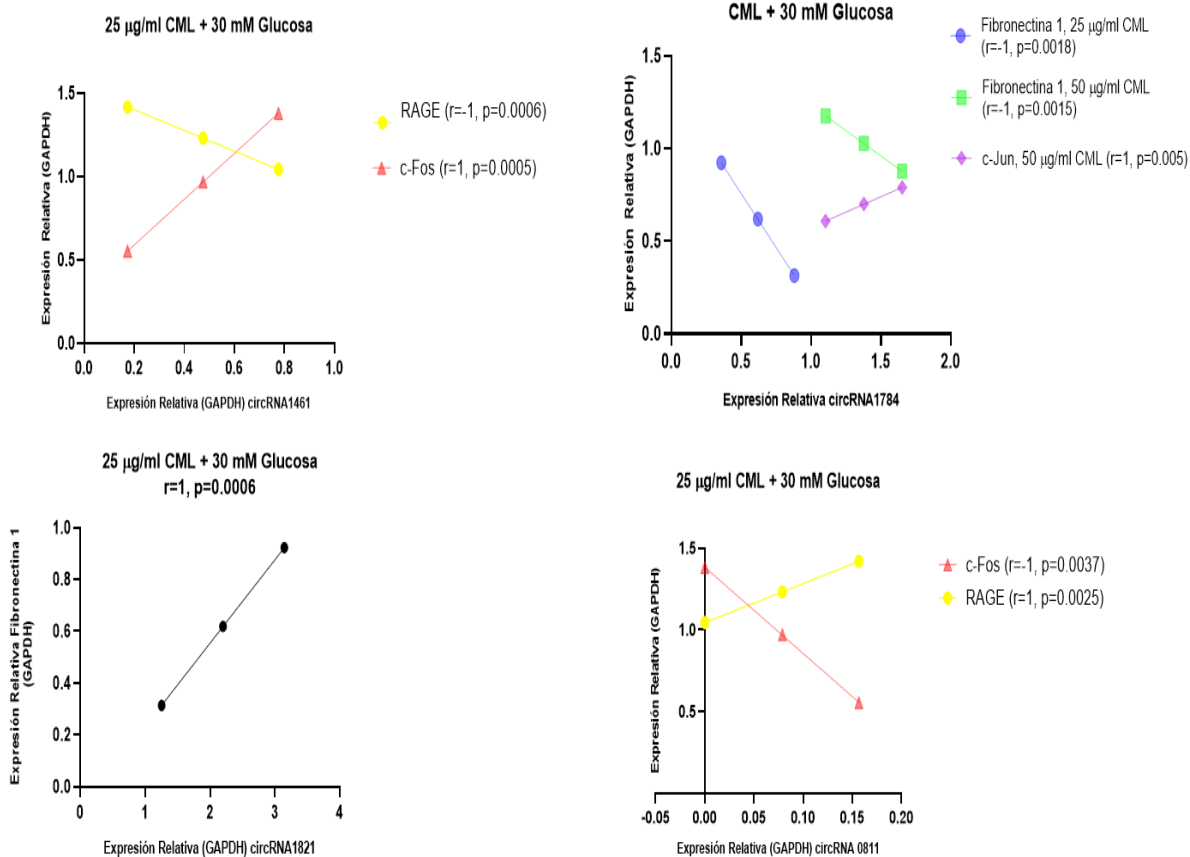


Figura 24. Correlación entre los niveles de expresión de los circRNAs (circ_1784, circ_1461, circ_0811, circ_1821) y RAGE, c-Jun, c-Fos y fibronectina 1 en la línea celular AD-293. Se evaluó la correlación en los casos: 1) circ_1784 con fibronectina 1 y c-Jun; 2) circ_1461 con RAGE y c-Fos; 3). circ_0811 con RAGE y c-Fos y 4) circ_1821 con fibronectina 1. Solo se muestran las correlaciones significativas ($p < 0.05$), r coeficiente de correlación de Pearson.

9 DISCUSIÓN

Los circRNAs son reguladores esenciales en el desarrollo de la DM y en sus complicaciones relacionadas. La ND es una de las complicaciones más frecuentes y graves de la DM y se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos (Valencia W., y Florez H. 2017). Usando el enfoque de RNAseq, se ha encontrado que los circRNAs son reguladores novedosos en la ND. De manera interesante, los datos GSE43574 publicados por Memczak y colaboradores (Memczak S., *et al* 2013) a partir de datos de secuenciación, reveló 60 circRNAs expresados en la línea celular HEK293 cultivada a altas concentraciones de glucosa (25 mM), los cuales fueron analizados en el presente proyecto. Nosotros analizamos la clasificación de los 60 circRNAs expresados en la línea celular H3K293 a altas concentraciones de glucosa; la mayoría de los estudios existentes, los clasifican en circRNAs exónicos, circRNAs intergenicos, circRNAs intrónicos y circRNAs exón-intrón, centrándose en sus componentes (Zhao Z., y Shen J., 2017). Encontramos mediante análisis *in silico* que el 83.3 % de los circRNAs son de origen exónico/secuencia codificante (CDS) y se ha demostrado que estos circRNAs contienen exones generados en el proceso exón *skipping* en secuencias de pre-mRNA, y es probable que sean transportados al citoplasma por el sistema de exportación nuclear, o que escapen de los núcleos durante la división celular (Suzuki, H., y Tsukahara, T. 2014). Además, se ha demostrado que la localización citosólica de los circRNAs también puede respaldar su función portranscripcional (Zhao Z., y Shen J., 2017). Además, encontramos que solo el 6.6 % de los circRNAs son de origen intergénico, los cuales se encuentran entre dos genes y el 3.3 % es de origen exónico e intergénico, los cuales se circularizan con intrones 'retenidos' entre los exones, y podrían sobreexpresarse con sus secuencias complementarias flanqueantes. El restante, 5% de los circRNAs estudiados son de origen intrónico; los cuales están compuestos por dos o más intrones conectados y son raros en células eucariotas, lo cual coincide con nuestros datos. De manera interesante se ha encontrado, que los circRNAs de origen exónico e intergénico y los de origen intrónico, tienen la función de promover la transcripción de sus genes parentales (Li Z., *et al* 2015). El mecanismo de RNA endógeno competitivo de circRNAs se ha confirmado en muchos estudios.

Recientemente, se ha demostrado que los ejes de regulación circRNA/miRNA/mRNA podrían regular la progresión de la ND, por ejemplo, el circ_0037128 se sobreexpresa, tanto en la línea celular SV40-MES13 de células mesangiales de ratón expuestas a altos niveles de glucosa como en el modelo de ratón de ND y actúa como esponja del miR-17-3p, que tiene como blanco a *AKT3*, promoviendo así la proliferación celular y la fibrosis a través del eje circ_0037128 / miR-17-3p / *AKT3* (Wang Q., *et al* 2021). En este estudio, analizamos los miRNAs y mRNA blancos de los 60 circRNAs, encontrando múltiples pares de interacción, por ejemplo, miRNA-1827/*TGFB1*, miRNA-508-3p/*NFKβ1*, miRNA-1244/*MAPK8*, miRNA-1264/*MAPK8*, miRNA-18a-3p/*STAT3* y miRNA-507/*MAPK8*. De manera interesante, los pares de interacción miR-508-3p/*NFKβ1* y miR-1299/ *STAT3* ya han sido validados experimentalmente mediante ensayos de luciferasa en las líneas celulares MKN28, MGC-803 y SGC-7901 de cáncer gástrico y en la línea celular HCT-116 de cáncer colorectal, respectivamente (Huang A., *et al* 2020; Wang M., *et al* 2017). La predicción de la energía libre mínima de las interacciones sugirió que se establecen interacciones estables. Una de las interacciones predichas más estables fue la del miR-766-5p/*MAPK9*. Por otra parte, se analizó la energía libre total de unión, lo que sugirió que la accesibilidad del miRNA por sus mRNA blancos es adecuada y en todos los casos es un proceso espontáneo. Al analizar, si los pares miRNA/mRNA predichos presentaban sitios de interacción canónicos, de manera interesante, encontramos que el 35.2 % de los pares de miRNA/mRNA analizados presentaron más de dos sitios de interacción canónicos, por ejemplo, el miR-507 que tiene como blanco el mRNA de *MAPK8*, presentó en su región 3' UTR los tres tipos de interacción 8mer/7mer-m8/7mer-A1 (Witkos T., *et al* 2011). Este resultado sugirió que las secuencias semillas de los mRNA blancos estaban conservadas evolutivamente. Posteriormente, establecimos una red de correulación, donde encontramos 34 ejes de regulación circRNAs/miRNAs/mRNAs. Además, encontramos que los ejes de regulación circ_0001632/miR-95-5p/*MAPK8*, circ_0001742/miR-562/*MAPK8*, circ_0001742/miR-1227/*MAPK8* y circ_0001742/miR-1227/*TGFB1* participan en los procesos de inflamación, hipertrofia y fibrosis involucrados en el desarrollo de la ND. De manera interesante encontramos que *MAPK8* fue el principal mRNA blanco predicho en los tres procesos involucrados en el desarrollo de ND. Este resultado concuerda con los estudios previos, donde se ha

demostrado que la vía de señalización de las MAPKs está relacionada con los procesos inflamatorios, oxidativos y apoptóticos y, por lo tanto, tiene un papel crucial en el desarrollo de la ND (Zarubin T., y Han J. 2005). Entre los mecanismos propuestos para explicar la activación de las MAPKs en la ND se encuentran la insulina, los niveles elevados de glucosa, el estrés oxidativo, la inflamación y la angiotensina II (Fujita H., *et al* 2004; Susztak K., *et al* 2006). La presencia de insulina en ambas situaciones puede provocar daño renal a través de la activación de la vía MAPK (Dai T., *et al* 2006). Junto con la hiperinsulinemia, los niveles altos de glucosa activan la cascada de MAPK a través de muchos enfoques, como la vía de los polioles, el estrés oxidativo y la acumulación de AGEs (Navarro-González J., y Mora-Fernández C. 2008). Por otra parte, la activación de los componentes de MAPK también está mediada por la inflamación y viceversa. Las citocinas inflamatorias y los factores de crecimiento, como IL-1 y TNF- α , se asocian con fibrosis intersticial en pacientes diabéticos y modelos experimentales (Susztak K., *et al* 2006). Recientemente, se ha demostrado que la estructura terciaria única de los circRNAs puede ejercer un efecto sobre su capacidad de unión a proteínas (Conlon E., & Manley J. 2017). Por ende, hicimos la predicción de los circRNAs candidatos a unirse a RAGE y/o a las 11 proteínas de interés (PI3K, NF- κ B, TGF- β 1, RAGE, STAT3, STAT1, JAK2, MAPK8, MAPK9, c-Jun y c-Fos). Encontramos que los factores de transcripción c-Jun y c-Fos tienen motivos RRM los cuales podrían estar interactuando con los circRNAs.

Por otra parte, se ha demostrado que los circRNAs funcionan como reguladores transcripcionales. Estudios recientes sugieren que los circRNAs pueden regular transcripcionalmente a sus genes parentales. Los circRNAs que están enriquecidos en el núcleo pueden interactuar con las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas U1 (snRNP) que luego se unen a Pol II en el promotor de sus genes parentales y, por tanto, modular positivamente la expresión génica (Li Z., *et al* 2015). Por ende, nosotros analizamos la expresión de los genes parentales de los 17 circRNAs que probablemente interactúan con c-Jun y/o c-Fos, como una posible hipótesis, de que estos circRNAs puedan regular a sus genes parentales. Esto resulta interesante, ya que en el 2013 Zhang y colaboradores demostraron que los circRNAs intrónicos (ci-ankrd52, ci-mcm5 y ci-sirt7) pueden funcionar como reguladores positivos de la transcripción de sus genes parentales al interactuar con la RNA Pol II y la inhibición de

la expresión de estos circRNAs, también inhibe la expresión de sus genes parentales (Zhang Y., *et al* 2013). De manera interesante, encontramos que los genes parentales de 3 circRNAs FAT1(circ_0001461), SMARCC1(circ_0001294) y PRRC2B (circ_0001896) presentaron una mayor expresión, por ende, es posible que estos circRNAs pueden estar regulando la transcripción de sus genes parentales o bien que los factores de transcripción c-Jun/c-Fos estén regulando su transcripción. Es importante destacar la participación de estos genes parentales en la progresión de la ND, en el 2012 Zheng y colaboradores demostraron que FAT1 se sobreexpresa en pacientes con ND en comparación con el grupo control, sin embargo, los mecanismos moleculares de la participación de FAT1 en la enfermedad aún no están dilucidadas (Zheng M., *et al* 2012). Por otra parte, se ha demostrado que el silenciamiento de PVT1 inhibe el daño de los podocitos y la apoptosis en ND mediante la regulación positiva de FOXA1 (Liu D., *et al* 2019).

En el presente estudio analizamos la expresión de cinco circRNAs (circ_0001666, circ_0001821, circ_0001461, circ_0000811 y circ_0001784) en la línea celular AD-293 expuesta a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 µg/ml), los cuales mostraron sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun y c-Fos. El circ_1461 sobreexpresó en altas concentraciones de glucosa (30 mM) y diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 µg/ml) en comparación con el grupo control. De igual manera, el circ_0001461 se encuentra sobreexpresado en las líneas celulares de carcinoma de células escamosas oral y tejidos tumorales. Además, la inhibición del circ_0001461 suprimió la proliferación celular, la migración y la invasión *in vitro*, a través de la modulación de la vía miR-145/TLR4/NF-κB (Ai Y., *et al* 2021). Por lo tanto, el circ_0001461 podría participar en la progresión del desarrollo de la ND. Otro de los circRNAs analizados fue el circ_0001666, que encontramos que se sobreexpresa en altas concentraciones de glucosa y diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 µg/ml) en comparación con el grupo control. Similarmente, el circ_0001666 se sobreexpresa en tejidos y líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas y promueve la migración e invasión de células *in vitro* e *in vivo* (Wang X., *et al* 2022). Finalmente, el circ_0001821 se sobreexpresó en altas concentraciones de glucosa y diferentes concentraciones de CML (25, 50 y 100 µg/ml) en comparación con el grupo control. Se ha demostrado que

el circ_0001821 aumenta su expresión en los tejidos de la médula ósea y las líneas celulares de mieloma múltiple en comparación con los controles normales, y su expresión se relacionó con la de hemoglobina, la de MG- β 2, la de globulina y con la magnitud de la lesión ósea (Liu L., *et al* 2021).

Finalmente, al analizar la expresión de *RAGE* encontramos que se sobreexpresó a altas concentraciones de glucosa y con CML a 25 y 50 μ M, sugiriendo que la vía AGE-RAGE se podría estar activando en esas condiciones. Estos datos concuerdan con lo previamente reportado por Holik y colaboradores donde ellos demostraron que la expresión de *RAGE* aumenta después de la exposición con CML en la línea celular SH-SY5Y, lo que resulta en la activación de la vía de señalización AGE-RAGE (Holik A., *et al* 2013). Además, se ha demostrado que existe una relación entre la expresión de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y la expresión de *RAGE* en pacientes con ND (Suzuki D., *et al* 2006). De igual manera se analizó la expresión de los factores de transcripción *c-Jun* y *c-Fos*. Nuestros datos mostraron que la expresión del factor de transcripción *c-Jun* se reprimió con los diferentes tratamientos en comparación con el control. Esto podría sugerir, que los circRNAs al poseer sitios de unión para este factor de transcripción, pudieran estar regulándolo de manera negativa y estar actuando como esponjas de *c-Jun*. Sin embargo, *c-Fos* se sobreexpresó a altas concentraciones de glucosa y con las diferentes concentraciones de CML, similar a lo previamente reportado, donde se ha demostrado que *c-Fos* se sobreexpresa a altas concentraciones de glucosa en células mesangiales (Kreisberg J., *et al* 1994). Cabe resaltar que los factores de transcripción *c-Jun* y *c-Fos*, forman el complejo AP-1 el cual media la activación inducida por hiperglucemia del promotor TGF- β 1 en células mesangiales (Weigert C., *et al* 2020). Por último, se analizó la expresión de fibronectina debido a que es una proteína presente en la matriz extracelular y su acumulación en el glomérulo en ND se ha asociado con el deterioro de la función renal en estos pacientes. La fibronectina se sobreexpresó después del tratamiento con altas concentraciones de glucosa y con CML a diferentes concentraciones, y su sobreexpresión se mantiene a las 24 y 48 h, lo que es consistente con lo reportado previamente (Kreisberg, J. I., *et al* 1994) en células mesangiales cultivadas con altas concentraciones de glucosa, sugiriendo que la sobreexpresión de *fibronectina*

contribuye a la expansión mesangial y promueve la fibrosis, hipertrofia e inflamación en ND.

En conjunto, los hallazgos realizados en este trabajo sugieren que los circ_0001461, circ0001666, circ_0001821 podrían promover el desarrollo de la ND.

10 CONCLUSIONES

1-En la línea celular HEK293 se predijeron 34 interacciones entre circRNA-miRNAs que tienen como blancos a los mRNAs de los genes que codifican proteínas de las vías de PI3K, JAK-2 y TGF- β del eje AGE-RAGE, y que, por sus características termodinámicas, determinadas *in silico*, son estables por lo que proponemos que pudieran modular esas vías.

2-Los pares de circRNA-miRNA identificados en la línea celular HEK293 interactúan *in silico* con mRNAs de los genes que codifican proteínas de más de una vía (JAK-2 o TGF- β) del eje AGE-RAGE, por lo que es probable que la modulación de estas dos vías se interrelaciona a través de la interacción con los circRNAs.

3-Se predijeron motivos RBM en los factores de transcripción c-Jun y c-Fos, los cuales podrían establecer interacciones con RNAs funcionales como los circRNAs; por lo que es razonable pensar que la expresión de estos factores de transcripción podría estar modulada por la expresión de estas moléculas.

4-Los promotores de los genes parentales de los circRNAs 1784, 1461, 1666, 1821 y 0811 y de los miRNAs que interactúan con ellos poseen sitios de unión para los factores de transcripción c-Jun y c-Fos, de acuerdo con los análisis realizados *in silico*, por lo que la expresión de los genes blancos de estas moléculas podría coregularse a través de la modulación de la expresión de los genes parentales de los circRNAs y/o de los miRNAs con los que interactúan.

5- Los circRNAs 1784, 1461, 1666, 1821 y 0811 se expresan diferencialmente en la línea celular AD-293 cuando se somete a concentraciones elevadas de glucosa y N- ϵ -carboxi-metil-lisina por lo que su expresión podría correlacionar con la de *c-Jun*, *c-Fos*, y *fibronectina 1* las cuales son proteínas que podrían modular y/o participar en los

procesos de fibrosis e hipertrofia cuando se activa el eje AGE-AGE de acuerdo con las predicciones *in silico*.

11 PERSPECTIVAS

Analizar la expresión de todos los circRNAs que se determinaron que pueden interactuar con c-Jun y c-Fos.

Comprobar experimentalmente las interacciones predichas en la red de correulación circRNA-miRNA-mRNA de genes que codifican proteínas de la vía AGE-RAGE propuesta en este trabajo.

Comprobar experimentalmente las interacciones predichas entre circRNAs-c-Jun y/o c-Fos.

Comprobar experimentalmente la regulación que podrían ejercer los circRNAs estudiados sobre la expresión de sus genes parentales.

Analizar experimentalmente si c-Jun y c-Fos modulan la expresión de los miRNA blancos de los circRNAs estudiados que potencialmente interactúan con esos factores de transcripción.

12 REFERENCIAS

1. Abdelmohsen, K., Panda, A. C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D. B., De, S., Kim, J., Noh, J. H., Kim, K. M., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2017). Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA biology*, 14(3), 361–369. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1279788>
2. Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., & Ziegler, A. G. (2005). Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2, S25–S31. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s25
3. Akhmetshina, A., Palumbo, K., Dees, C., Bergmann, C., Venalis, P., Zerr, P., Horn, A., Kireva, T., Beyer, C., Zwerina, J., Schneider, H., Sadowski, A., Riener, M. O., MacDougald, O. A., Distler, O., Schett, G., & Distler, J. H. (2012). Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nature communications*, 3, 735. <https://doi.org/10.1038/ncomms1734>
4. American Diabetes Association (2003). Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* Jan; s94-s98.9. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2007.S94>
5. ATLAS DE LA DIABETES DE LA FID (2019). 9a edición.
6. Barrett, S. P., & Salzman, J. (2016). Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development (Cambridge, England)*, 143(11), 1838–1847. <https://doi.org/10.1242/dev.128074>
7. Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., & Nawroth, P. P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 83(11), 876–886. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>
8. Bradfield, J. P., Qu, H. Q., Wang, K., Zhang, H., Sleiman, P. M., Kim, C. E., Mentch, F. D., Qiu, H., Glessner, J. T., Thomas, K. A., Frackelton, E. C., Chiavacci, R. M., Imielinski, M., Monos, D. S., Pandey, R., Bakay, M., Grant, S. F., Polychronakos, C., & Hakonarson, H. (2011). A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. *PLoS genetics*, 7(9), e1002293. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002293>

9. Brownlee M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine*, 46, 223–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.46.1.223>
10. Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
11. Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
12. Brownlee, M., Cerami, A., & Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England journal of medicine*, 318(20), 1315–1321. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805193182007>
13. Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(4), 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrm782>
14. Chau, B. N., Xin, C., Hartner, J., Ren, S., Castano, A. P., Linn, G., Li, J., Tran, P. T., Kaimal, V., Huang, X., Chang, A. N., Li, S., Kalra, A., Grafals, M., Portilla, D., MacKenna, D. A., Orkin, S. H., & Duffield, J. S. (2012). MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Science translational medicine*, 4(121), 121ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003205>
15. Chen L. L. (2016). The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(4), 205–211. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.32>
16. Chen, L. L., & Yang, L. (2015). Regulation of circRNA biogenesis. *RNA biology*, 12(4), 381–388. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020271>
17. Chung, A. C., Zhang, H., Kong, Y. Z., Tan, J. J., Huang, X. R., Kopp, J. B. and Lan, H. Y. (2010) Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF- β -independent Smad3 signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 249–260
18. Cipolletta, E., Campanile, A., Santulli, G., Sanzari, E., Leosco, D., Campiglia, P., Trimarco, B., & Iaccarino, G. (2009). The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta adrenergic receptor-induced insulin resistance. *Cardiovascular research*, 84(3), 407–415. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp252>

19. Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews. Nephrology*, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
20. Conlon, E. G., & Manley, J. L. (2017). RNA-binding proteins in neurodegeneration: mechanisms in aggregate. *Genes & development*, 31(15), 1509–1528. <https://doi.org/10.1101/gad.304055.117>
21. Crook, M. A., Pickup, J. C., Lumb, P. J., Giorgino, F., Webb, D. J., Fuller, J. H., & EURODIAB IDDM Complications Study Group (2001). Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Complications Study. *Diabetes care*, 24(2), 316–322. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.2.316>
22. Dai, H., Liu, Q., & Liu, B. (2017). Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *Journal of diabetes research*, 2017, 2615286. <https://doi.org/10.1155/2017/2615286>
23. Dai, T., Natarajan, R., Nast, C. C., LaPage, J., Chuang, P., Sim, J., Tong, L., Chamberlin, M., Wang, S., & Adler, S. G. (2006). Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. *Kidney international*, 69(5), 806–814. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000033Ai>,
24. de Boer, I. H., Rue, T. C., Hall, Y. N., Heagerty, P. J., Weiss, N. S., & Himmelfarb, J. (2011). Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA*, 305(24), 2532–2539. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.861>
25. Donath, M. Y. and Shoelson, S. E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 98–107
26. Donath, M. Y., Ehse, J. A., Maedler, K., Schumann, D. M., Ellingsgaard, H., Eppler, E., & Reinecke, M. (2005). Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2, S108–S113. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s108
27. Druz, A., Betenbaugh, M., & Shiloach, J. (2012). Glucose depletion activates mmu-miR-466h-5p expression through oxidative stress and inhibition of histone

- deacetylation. *Nucleic acids research*, 40(15), 7291–7302.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks452>
28. Dugani, C. B., & Klip, A. (2005). Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO reports*, 6(12), 1137–1142.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400584>
29. Eidem, T. M., Kugel, J. F., & Goodrich, J. A. (2016). Noncoding RNAs: Regulators of the Mammalian Transcription Machinery. *Journal of molecular biology*, 428(12), 2652–2659. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.019>
30. Eroles, P., Tormo, E., Pineda, B., Espin, E., & Lluch, A. (2016). MicroRNAs in Breast Cancer: One More Turn in Regulation. *Current drug targets*, 17(9), 1083–1100. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150213114103>
31. Farese, R. V., Sajan, M. P., & Standaert, M. L. (2005). Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 2), 350–353. <https://doi.org/10.1042/BST0330350>
32. Fathallah, N., Slim, R., Larif, S., Hmouda, H., & Ben Salem, C. (2015). Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. *Drug safety*, 38(12), 1153–1168. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0339-z>
33. Fuentes-Nava A.G. (2017). Non enzymatic glycation: it's role in DM and aging. *Revista Medicina e Investigación UAEMéx / ISSN: 2594-0600 / Vol. 5 Núm. 1. .* 75-81
34. Fujita, H., Omori, S., Ishikura, K., Hida, M., & Awazu, M. (2004). ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 286(1), F120–F126. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00351.2002>
35. Fukami, K., Yamagishi, S., Ueda, S., & Okuda, S. (2007). Novel therapeutic targets for diabetic nephropathy. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 7(2), 83–92. <https://doi.org/10.2174/187153007780832118>
36. Galler, A., Müller, G., Schinzel, R., Kratzsch, J., Kiess, W., & Münch, G. (2003). Impact of metabolic control and serum lipids on the concentration of advanced glycation end products in the serum of children and adolescents with type 1 diabetes, as determined by fluorescence spectroscopy and nepsilon-

- (carboxymethyl)lysine ELISA. *Diabetes care*, 26(9), 2609–2615.
<https://doi.org/10.2337/diacare.26.9.2609>
37. Gao, Y., Wang, J., & Zhao, F. (2015). CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome biology*, 16(1), 4.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0571-3>
38. García-Chapa, E. G., Leal-Ugarte, E., Peralta-Leal, V., Durán-González, J., & Meza-Espinoza, J. P. (2017). Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. *BioMed research international*, 2017, 3937893.
<https://doi.org/10.1155/2017/3937893>
39. Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in molecular medicine*, 12(12), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.006>
40. Genuth, S., Sun, W., Cleary, P., Sell, D. R., Dahms, W., Malone, J., Sivitz, W., Monnier, V. M., & DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group (2005). Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54(11), 3103–3111.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3103>
41. Gheith, O., Farouk, N., Nampoory, N., Halim, M. A., & Al-Otaibi, T. (2015). Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *Journal of nephro pharmacology*, 5(1), 49–56.
42. Giannico, G., Cortes, P., Baccora, M. H., Hassett, C., Taube, D. W., & Yee, J. (2007). Glibenclamide prevents increased extracellular matrix formation induced by high glucose concentration in mesangial cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 292(1), F57–F65.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00210.2006>
43. Goldfarb, S., & Ziyadeh, F. N. (2001). TGF-beta: a crucial component of the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 112, 27–33.
44. Greene, J., Baird, A. M., Brady, L., Lim, M., Gray, S. G., McDermott, R., & Finn, S. P. (2017). Circular RNAs: Biogenesis, Function and Role in Human Diseases.

- Frontiers in molecular biosciences, 4, 38.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00038>
45. Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome biology*, 15(7), 409. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>
46. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
47. Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 495(7441), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature11993>
48. Harja, E., Bu, D. X., Hudson, B. I., Chang, J. S., Shen, X., Hallam, K., Kalea, A. Z., Lu, Y., Rosario, R. H., Oruganti, S., Nikolla, Z., Belov, D., Lalla, E., Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2008). Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(1), 183–194. <https://doi.org/10.1172/JCI32703>
49. Hegab, Z., Gibbons, S., Neyses, L., & Mamas, M. A. (2012). Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World journal of cardiology*, 4(4), 90–102. <https://doi.org/10.4330/wjc.v4.i4.90>
50. Hentze, M. W., & Preiss, T. (2013). Circular RNAs: splicing's enigma variations. *The EMBO journal*, 32(7), 923–925. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.53>
51. Holik, A. K., Rohm, B., Somoza, M. M., & Somoza, V. (2013). N(ε)-Carboxymethyllysine (CML), a Maillard reaction product, stimulates serotonin release and activates the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in SH-SY5Y cells. *Food & function*, 4(7), 1111–1120. <https://doi.org/10.1039/c3fo60097a>
52. Hsieh, C. L., Yang, M. H., Chyau, C. C., Chiu, C. H., Wang, H. E., Lin, Y. C., Chiu, W. T., & Peng, R. Y. (2007). Kinetic analysis on the sensitivity of glucose- or glyoxal-induced LDL glycation to the inhibitory effect of *Psidium guajava*

- extract in a physiomimic system. *Bio Systems*, 88(1-2), 92–100.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2006.04.004>
53. Hu, F., Sha, W., Dai, H., Yang, X., Hu, P., Chu, Y., Qiu, X., & Bu, S. (2021). Lower expression of Hsa_circRNA_102682 in diabetic hyperhomocysteinemia negatively related to creatinemia is associated with TGF- β and CTGF. *Journal of clinical laboratory analysis*, 35(8), e23860. <https://doi.org/10.1002/jcla.23860>
54. Hu, W., Han, Q., Zhao, L., & Wang, L. (2019). Circular RNA circRNA_15698 aggravates the extracellular matrix of diabetic nephropathy mesangial cells via miR-185/TGF- β 1. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1469–1476. <https://doi.org/10.1002/jcp.26959>
55. Huang, A., Zheng, H., Wu, Z., Chen, M., & Huang, Y. (2020). Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification. *Theranostics*, 10(8), 3503–3517. <https://doi.org/10.7150/thno.42174>
56. Hudson, B. I., Stickland, M. H., Futers, T. S., & Grant, P. J. (2001). Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*, 50(6), 1505–1511. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1505>
57. Hung, P. H., Hsu, Y. C., Chen, T. H., & Lin, C. L. (2021). Recent Advances in Diabetic Kidney Diseases: From Kidney Injury to Kidney Fibrosis. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11857. <https://doi.org/10.3390/ijms222111857>
58. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Seventh Edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021
59. Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F., & Sharpless, N. E. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(2), 141–157. <https://doi.org/10.1261/rna.035667.112>
60. Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F., & Sharpless, N. E. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(2), 141–157. <https://doi.org/10.1261/rna.035667.112>

61. Jin, J., Sun, H., Shi, C., Yang, H., Wu, Y., Li, W., Dong, Y. H., Cai, L., & Meng, X. M. (2020). Circular RNA in renal diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(12), 6523–6533. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15295>
62. Jin, J., Sun, H., Shi, C., Yang, H., Wu, Y., Li, W., Dong, Y. H., Cai, L., & Meng, X. M. (2020). Circular RNA in renal diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(12), 6523–6533. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15295>
63. Kim, E., Kim, Y. K., & Lee, S. V. (2021). Emerging functions of circular RNA in aging. *Trends in genetics : TIG*, 37(9), 819–829. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.014>
64. Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., Qu, W., Taguchi, A., Du Yan, S., Hofmann, M., Yan, S. F., Pischetsrieder, M., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1999). N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 274(44), 31740–31749. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31740>
65. Kobayashi, H., Yamazaki, S., Takashima, S., Liu, W., Okuda, H., Yan, J., Fujii, Y., Hitomi, T., Harada, K. H., Habu, T., & Koizumi, A. (2013). Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(3), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.015>
66. 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. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.249>
67. Kriz, W., & Lemley, K. V. (2015). A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26(2), 258–269. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030278>
68. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N. Y.)*, 294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

69. Lasda, E., & Parker, R. (2014). Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* (New York, N.Y.), 20(12), 1829–1842. <https://doi.org/10.1261/rna.047126.114>
70. Lee, J. Y., Yang, J. W., Han, B. G., Choi, S. O., & Kim, J. S. (2019). Adiponectin for the treatment of diabetic nephropathy. *The Korean journal of internal medicine*, 34(3), 480–491. <https://doi.org/10.3904/kjim.2019.109>
71. Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (New York, N.Y.), 294(5543), 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
72. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
73. Li, X., Lu, L., Hou, W., Wang, F., Huang, T., Meng, Z., & Zhu, M. (2022). The SETD8/ELK1/bach1 complex regulates hyperglycaemia-mediated EndMT in diabetic nephropathy. *Journal of translational medicine*, 20(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03352-4>
74. Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P., Chang, Z., Wu, Q., Zhao, Y., Jia, Y., Xu, P., Liu, H., & Shan, G. (2015). Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology*, 22(3), 256–264. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2959>
75. Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P., Chang, Z., Wu, Q., Zhao, Y., Jia, Y., Xu, P., Liu, H., & Shan, G. (2015). Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology*, 22(3), 256–264. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2959>
76. Lim, A. K., & Tesch, G. H. (2012). Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators of inflammation*, 2012, 146154. <https://doi.org/10.1155/2012/146154>
77. Lin, C. L., Wang, J. Y., Huang, Y. T., Kuo, Y. H., Surendran, K., & Wang, F. S. (2006). Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(10), 2812–2820. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005121355>

78. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
79. Liu, D. W., Zhang, J. H., Liu, F. X., Wang, X. T., Pan, S. K., Jiang, D. K., Zhao, Z. H., & Liu, Z. S. (2019). Silencing of long noncoding RNA PVT1 inhibits podocyte damage and apoptosis in diabetic nephropathy by upregulating FOXA1. *Experimental & molecular medicine*, 51(8), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0259-6>
80. Liu, J., Duan, P., Xu, C., Xu, D., Liu, Y., & Jiang, J. (2021). CircRNA circ-ITCH improves renal inflammation and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by regulating the miR-33a-5p/SIRT6 axis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 70(7), 835–846. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01485-8>
81. Liu, L., Zhang, F., & Li, J. (2021). CircRNA circ_0001821 predicts an unfavorable prognosis and promotes the proliferation of multiple myeloma. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 26(1), 716–723. <https://doi.org/10.1080/16078454.2021.1974199>
82. Liu, R., Zhang, M., & Ge, Y. (2021). Circular RNA HIPK3 exacerbates diabetic nephropathy and promotes proliferation by sponging miR-185. *Gene*, 765, 145065. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145065>
83. Lu, Y., Yang, Q., Hu, W., & Dong, J. (2020). Identification of the Key Genes Involved in the Effect of Folic Acid on Endothelial Progenitor Cell Transcriptome of Patients with Type 1 Diabetes. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2020, 4542689.
84. Maedler K. (2008). Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes, obesity & metabolism*, 10(5), 408–420. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00718.x>
85. Makino, H., Yamasaki, Y., Haramoto, T., Shikata, K., Hironaka, K., Ota, Z. and Kanwar, Y. S. (1993) Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. *Lab. Invest.* 68, 45–55

86. McClelland, A. D., Herman-Edelstein, M., Komers, R., Jha, J. C., Winbanks, C. E., Hagiwara, S., Gregorevic, P., Kantharidis, P., & Cooper, M. E. (2015). miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7. *Clinical science (London, England : 1979)*, 129(12), 1237–1249. <https://doi.org/10.1042/CS20150427>
87. Melendez-Ramirez, L. Y., Richards, R. J., & Cefalu, W. T. (2010). Complications of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 39(3), 625–640. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.009>
88. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F., & Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495(7441), 333–338. <https://doi.org/10.1038/nature11928>
89. Moreno FA, Aguilera A, Valdés E. (2000). Nefropatía diabética. *Medicine*. 8: 1001-1008.
90. Navarro-Gonzalez, J. F., Mora-Fernandez, C., Muros de Fuentes, M. and Garcia-Perez, J. (2011) Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 327–340
91. Navarro-González, J. F., Sánchez-Niño, M. D., Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Ferri, C., Pérez-Delgado, N., Górriz, J. L., Martínez-Castelao, A., Ortiz, A., & Mora-Fernández, C. (2018). Effects of Pentoxifylline on Soluble Klotho Concentrations and Renal Tubular Cell Expression in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes care*, 41(8), 1817–1820. <https://doi.org/10.2337/dc18-0078>
92. Nenna, A., Spadaccio, C., Lusini, M., Ulianich, L., Chello, M., & Nappi, F. (2015). Basic and Clinical Research Against Advanced Glycation End Products (AGEs): New Compounds to Tackle Cardiovascular Disease and Diabetic Complications. *Recent advances in cardiovascular drug discovery*, 10(1), 10–33. <https://doi.org/10.2174/1574890110666151104120039>
93. Papadopoulou-Marketou, N., Paschou, S. A., Marketos, N., Adamidi, S., Adamidis, S., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Minerva medica*, 109(3), 218–228. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.17.05496-9>

94. Peng, F., Gong, W., Li, S., Yin, B., Zhao, C., Liu, W., Chen, X., Luo, C., Huang, Q., Chen, T., Sun, L., Fang, S., Zhou, W., Li, Z., & Long, H. (2020). circRNA_010383 Acts as a Sponge for miR-135a and its Downregulated Expression Contributes to Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, db200203. Advance online publication. <https://doi.org/10.2337/db200203>
95. Petkovic, S., & Müller, S. (2015). RNA circularization strategies in vivo and in vitro. *Nucleic acids research*, 43(4), 2454–2465. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv045>
96. Pun, P. B., & Murphy, M. P. (2012). Pathological significance of mitochondrial glycation. *International journal of cell biology*, 2012, 843505. <https://doi.org/10.1155/2012/843505>
97. Raimundo, M., & Lopes, J. A. (2011). Metabolic syndrome, chronic kidney disease, and cardiovascular disease: a dynamic and life-threatening triad. *Cardiology research and practice*, 2011, 747861. <https://doi.org/10.4061/2011/747861>
98. Ramasamy, R., Yan, S. F. and Schmidt, A. M. (2011) Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1243, 88–102
99. Rotroff, D. M., Pijut, S. S., Marvel, S. W., Jack, J. R., Havener, T. M., Pujol, A., Schluter, A., Graf, G. A., Ginsberg, H. N., Shah, H. S., Gao, H., Morieri, M. L., Doria, A., Mychaleckyi, J. C., McLeod, H. L., Buse, J. B., Wagner, M. J., Motsinger-Reif, A. A., & ACCORD/ACCORDion Investigators (2018). Genetic Variants in HSD17B3, SMAD3, and IPO11 Impact Circulating Lipids in Response to Fenofibrate in Individuals With Type 2 Diabetes. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 103(4), 712–721. <https://doi.org/10.1002/cpt.798>
100. Schalkwijk, C. G., & Miyata, T. (2012). Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino acids*, 42(4), 1193–1204. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0779-9>
101. Shang, J., Wang, L., Zhang, Y., Zhang, S., Ning, L., Zhao, J., Cheng, G., Liu, D., Xiao, J., & Zhao, Z. (2019). Chemerin/ChemR23 axis promotes

- inflammation of glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(5), 3417–3428. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14237>
102. Shao, T., Pan, Y. H., & Xiong, X. D. (2020). Circular RNA: an important player with multiple facets to regulate its parental gene expression. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 23, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.11.008>
103. Song, J., Wei, H., Tang, Z., Li, X., Lv, X., Luo, H., Wu, S., & Zou, C. (2021). circ_0001461 promotes oral squamous cell carcinoma progression through miR-145/TLR4/NF- κ B axis. *Biochemical and biophysical research communications*, 566, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.009>
104. Sourris, K. C. and Forbes, J. M. (2009) Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy: are these receptors valid therapeutic targets. *Curr. Drug Targets* 10, 42–50
105. Srivastava, S. P., Hedayat, A. F., Kanasaki, K., & Goodwin, J. E. (2019). microRNA Crosstalk Influences Epithelial-to-Mesenchymal, Endothelial-to-Mesenchymal, and Macrophage-to-Mesenchymal Transitions in the Kidney. *Frontiers in pharmacology*, 10, 904. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00904>
106. Srivastava, S. P., Koya, D., & Kanasaki, K. (2013). MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *BioMed research international*, 2013, 125469. <https://doi.org/10.1155/2013/125469>
107. Stöckli, J., & James, D. E. (2009). Insulin action under arrestin. *Cell metabolism*, 9(3), 213–214. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.005>
108. Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M., & Böttinger, E. P. (2006). Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 55(1), 225–233.
109. Suzuki, D., Toyoda, M., Yamamoto, N., Miyauchi, M., Kato, M., Kimura, M., Maruyama, M., Honma, M., Umezono, T., & 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 (Tokyo, Japan), 45(7), 435–441.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.45.1557>

110. Suzuki, H., & Tsukahara, T. (2014). A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs. *International journal of molecular sciences*, 15(6), 9331–9342. <https://doi.org/10.3390/ijms15069331>
111. Tabit, C. E., Chung, W. B., Hamburg, N. M., & Vita, J. A. (2010). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 11(1), 61–74. <https://doi.org/10.1007/s11154-010-9134-4>
112. Tavafi M. (2015). Suggestions for attenuation of renal ischemia reperfusion injury based on mechanisms involved in epithelial cells damages. *Journal of nephro pharmacology*, 4(1), 1–3.
113. Thornalley, P. J., Langborg, A., & Minhas, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *The Biochemical journal*, 344 Pt 1(Pt 1), 109–116.
114. Udler, M. S., Kim, J., von Grotthuss, M., Bonàs-Guarch, S., Cole, J. B., Chiou, J., Christopher D. Anderson on behalf of METASTROKE and the ISGC, Boehnke, M., Laakso, M., Atzmon, G., Glaser, B., Mercader, J. M., Gaulton, K., Flannick, J., Getz, G., & Florez, J. C. (2018). Type 2 diabetes genetic loci informed by multi-trait associations point to disease mechanisms and subtypes: A soft clustering analysis. *PLoS medicine*, 15(9), e1002654. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002654>
115. Umanath, K., & Lewis, J. B. (2018). Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 71(6), 884–895. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.10.026>
116. Valencia, W. M., & Florez, H. (2017). How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. *BMJ (Clinical research ed.)*, 356, i6505. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6505>
117. Valencia, W. M., & Florez, H. (2017). How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. *BMJ (Clinical research ed.)*, 356, i6505. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6505>

118. Vinik, A. I., Nevoret, M. L., Casellini, C., & Parson, H. (2013). Diabetic neuropathy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 42(4), 747–787. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.06.001>
119. Vlassara, H., & Striker, G. E. (2013). Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 42(4), 697–719. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.07.005>
120. Wang, J., Yang, S., Li, W., Zhao, M., & Li, K. (2021). Circ_0000491 Promotes Apoptosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis in High Glucose-Induced Mesangial Cells by Regulating miR-455-3p/Hmgb1 Axis. *Nephron*, 1–12. Advance online publication. <https://doi.org/10.1159/000516870>
121. Wang, M., Yu, F., Wu, W., Zhang, Y., Chang, W., Ponnusamy, M., Wang, K., & Li, P. (2017). Circular RNAs: A novel type of non-coding RNA and their potential implications in antiviral immunity. *International journal of biological sciences*, 13(12), 1497–1506. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22531>
122. Wang, Q., Cang, Z., Shen, L., Peng, W., Xi, L., Jiang, X., Ge, X., Xu, B., & Huang, S. (2021). circ_0037128/miR-17-3p/AKT3 axis promotes the development of diabetic nephropathy. *Gene*, 765, 145076. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145076>
123. Wang, X., Li, R., Feng, L., Wang, J., Qi, Q., Wei, W., & Yu, Z. (2022). Hsa_circ_0001666 promotes non-small cell lung cancer migration and invasion through miR-1184/miR-548l/AGO1 axis. *Molecular therapy oncolytics*, 24, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.02.011>
124. Wang, Y., Qi, Y., Ji, T., Tang, B., Li, X., Zheng, P., & Bai, S. (2021). Circ_LARP4 regulates high glucose-induced cell proliferation, apoptosis, and fibrosis in mouse mesangial cells. *Gene*, 765, 145114. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145114>
125. Weigert, C., Sauer, U., Brodbeck, K., Pfeiffer, A., Häring, H. U., & Schleicher, E. D. (2000). AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(11), 2007–2016. <https://doi.org/10.1681/ASN.V11112007>

126. Welsh, G. I., Hers, I., Berwick, D. C., Dell, G., Wherlock, M., Birkin, R., Leney, S., & Tavaré, J. M. (2005). Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 2), 346–349. <https://doi.org/10.1042/BST0330346>
127. Witkos, T. M., Koscianska, E., & Krzyzosiak, W. J. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Current molecular medicine*, 11(2), 93–109. <https://doi.org/10.2174/156652411794859250>
128. Wong, C. K., Wade-Vallance, A. K., Luciani, D. S., Brindle, P. K., Lynn, F. C., & Gibson, W. T. (2018). The p300 and CBP Transcriptional Coactivators Are Required for β -Cell and α -Cell Proliferation. *Diabetes*, 67(3), 412–422. <https://doi.org/10.2337/db17-0237>
129. World Health Organization. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: Switzerland; Available at: Available from: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf>.
130. Xie, J., Reverdatto, S., Frolov, A., Hoffmann, R., Burz, D. S., & Shekhtman, A. (2008). Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *The Journal of biological chemistry*, 283(40), 27255–27269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801622200>
131. Yang, Q., Du, W. W., Wu, N., Yang, W., Awan, F. M., Fang, L., Ma, J., Li, X., Zeng, Y., Yang, Z., Dong, J., Khorshidi, A., & Yang, B. B. (2017). A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell death and differentiation*, 24(9), 1609–1620. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.86>
132. Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Watanabe, T., & Yamamoto, H. (2005). Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *Journal of pharmacological sciences*, 97(3), 305–311. <https://doi.org/10.1254/jphs.cpj04005x>
133. Yu, F. N., Hu, M. L., Wang, X. F., Li, X. P., Zhang, B. H., Lu, X. Q., & Wang, R. Q. (2019). Effects of microRNA-370 on mesangial cell proliferation and extracellular matrix accumulation by binding to canopy 1 in a rat model of

- diabetic nephropathy. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 6898–6907. <https://doi.org/10.1002/jcp.27448> (Retraction published *J Cell Physiol*. 2022 Mar;237(3):2006)
134. Yun, J., Ren, J., Liu, Y., Dai, L., Song, L., Ma, X., Luo, S., & 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. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00692-x>
135. Zarubin, T., & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*, 15(1), 11–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290257>
136. Zeng, S., Dun, H., Ippagunta, N., Rosario, R., Zhang, Q. Y., Lefkowitz, J., Yan, S. F., Schmidt, A. M., & Emond, J. C. (2009). Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Journal of hepatology*, 50(5), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.11.022>
137. Zeng, Y., Du, W. W., Wu, Y., Yang, Z., Awan, F. M., Li, X., Yang, W., Zhang, C., Yang, Q., Yee, A., Chen, Y., Yang, F., Sun, H., Huang, R., Yee, A. J., Li, R. K., Wu, Z., Backx, P. H., & Yang, B. B. (2017). A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. *Theranostics*, 7(16), 3842–3855. <https://doi.org/10.7150/thno.19764>
138. Zhang, X. O., Wang, H. B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L., & Yang, L. (2014). Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 159(1), 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>
139. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., Zhu, S., Yang, L., & Chen, L. L. (2013). Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 51(6), 792–806. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.017>
140. Zhao, L., Chen, H., Zeng, Y., Yang, K., Zhang, R., Li, Z., Yang, T., & Ruan, H. (2021). Circular RNA circ_0000712 regulates high glucose-induced apoptosis, inflammation, oxidative stress, and fibrosis in (DN) by targeting the

- miR-879-5p/SOX6 axis. *Endocrine journal*, 10.1507/endocrj.EJ20-0739.
Advance online publication. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ20-0739>
141. Zhao, Z. J., & Shen, J. (2017). Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer. *RNA biology*, 14(5), 514–521. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1122162>
142. Zheng, M., Lv, L. L., Cao, Y. H., Liu, H., Ni, J., Dai, H. Y., Liu, D., Lei, X. D., & Liu, B. C. (2012). A pilot trial assessing urinary gene expression profiling with an mRNA array for diabetic nephropathy. *PloS one*, 7(5), e34824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034824>

13 ANEXO 1. Las 66 secuencias que corresponden a regiones de unión a RNA ya validadas

3 secuencias putativas de unión a RNA que corresponden a Fos

2 secuencias putativas de unión a RNA que corresponden a Jun

1 motivo de unión a RNA de Fos obtenido por MEME

2 motivoS de unión a RNA de Jun obtenidos por MEME

>1spP52756-98-178

KTIMLRGLPITITESDIREMMESFEGPQPADVRLMKRKTGVSARGFAFVEFYHLQDAT
SWMEANQKKLVIQGKHIAMHYSNP

>2spP52756-231-315

DTIILRNIAPTHVVDSIMTALSPYASLAVNNIRLIKDKQTQQNRGFAFVQLSSAMDASQ
LLQILQSLHPPLKIDGKTIGVDFAKS

>3spP78332-456-536

RLIRLSGVPEDATKEEILNAFRTPDGMPVKNLQLKEYNTGYDYGVCVEFSLLEDAIG
CMEANQGTLMIQDKEVTLEYVSS

>4spP26599-59-143

RVIHIRKLPIDVTEGEVISLGLPFGKVTNLLMLKGKNQAFIEMNTEEAANTMVNYYTSV
TPVLRGQPPIYIQFSNHKELKTDSSPN

>5spP26599-184-260

LRIIVENLFYPVTLDVDLHQIFSKFGTVLKIITFTKNNQFQALLQYADPVSAQHAKLSLDG
QNIYNACCTLRIDFSKL

>6spP26599-337-411

SVLLVSNLNPVTPQSLFILFGVYGDVQRVKILFNKKENALVQMADGNQAQLAMSH
LNGHKLHGKPIRITLSKH

>7spP26599-454-529

ATLHLSNIPPSVSEEDLKVLFSNNGGVVKGFKFFQKDRKMALIQMGSVEEAVQALIDL
HNHDLGENHHLRVSFSSKS

>8spP43243-398-473

RVVHIMDFQRGKNLRYQLLQLVEPFGVISNHLILNKINEAFIEMATTEDAQAADVYYT
TTPALVFGKPVRVHLSQK

>9spP43243-496-571

RVIHLSNLPHSGYSDSAVLKLAEPYGKIKNYILMRMKSQAFIEMETREDAMAMVDHC
LKKALWFQGRVCVKVDLSEK

>10spO95319-40-123

IKMFVGGQIPRSWSEKELKELFEPYGAVYQINVLDRSQNPPQSKGCCFVTFYTRKAA
LEAQNALHNIKTLPGMHHPIQMKPADS

>11spO95319-132-212

RKLFIGMVSKKCNENDIRVMFSPFGQIEECRILRGPDGLSRGCAFVTFSTRAMAQNA
IKAMHQSQTMEGCSSPIVVKFADT

>12spO95319-423-501

ANLFIYHLPQEFGDQDILQMFMPFGNVISAKVFIDKQTNLSKCFGVSYDNPVSAQA
AIQAMNGFQIGMKRLKVQLKRS

>13spP26599-59-143

RVIHIRKLPIDVTEGEVISLGLPFGKVTNLLMLKGKNQAFIEMNTEEAANTMVNYYTSV
TPVLRGQPYYIQFSNHKELKTDSSPN

>14spP26599-184-260

LRIIVENLFYPVTLDVLDVHQIFSKFGTVLKIITFTKNNQFQALLQYADPVSAQHAKLSLDG
QNIYNACCTLRIDFSKL

>15spP26599-337-411

SVLLVSNLNPERVTPQSLFILFGVYGDVQRVKILFNKKENALVQMADGNQAQLAMSH
LNGHKLHGKPIRITLSKH

>16spP26599-454-529

ATLHLSNIPPSVSEEDLKVLFFSSNGGVVKGFKFFQKDRKMALIQMGSVEEAVQALIDL
HNHDLGENHHLRVSFSSKS

>17spP26368-149-231

RRLYVGNIPFGITEEAMMDFFNAQMRLGGLTQAPGNPVLAVQINQDKNFAFLEFRSV
DETTQAMAFDGIIFQGQSLKIRRPD

>18spP26368-259-337

HKLFIGGLPNYLNDDQVKELLTSFGPLKAFNLVKDSATGLSKGYAFCEYVDINVTQ
AIAGLNGMQLGDKKLLVQRASV

>19spP26368-385-466

LPEELLDEEYEEIVEDVRDECSKYGLVKSIEIPRPVDGVEVPGCGKIFVEFTSVFDC
QKAMQGLTGRKFANRVVVTKYCDP

>20spQ96T58-6-81

RHLWVGNLPENVREEKIIHFVKRYGRVESVKILPKRGSEGGVAAFVDFVDIKSAQKA
HNSVNKMGDRDLRTDYNEP

>21spQ96T58-335-415

FGIKVQNLVPRSTDTSLKDGLFHEFKKFGKVTSVQIHGTSEERYGLVFFRQQEDQEK
ALTASKGKLFFGMQIEVTAWIGPE

>22spQ96T58-438-513

RTLFIGNLEKTTTTYHDLRNIFQRFGEIVDIDIKKVNVPQYAFQYCDIASVCKAIKKM
DGEYLGNNRLKLGFGKS

>23spQ96T58-517-589

NCVWLDGLSSNVSDQYLTRHFCRYGPVVKVVFDRLLKGMALVLYNEIEYAQAQAVKET
KGRKIGGNKIKVDFANR

>24spQ15717-20-98

TNLIVNYLPQNMTQDELRSLSFSSIGEVESSAKLIRDKVAGHSLGYGFVNYVTAKDAER
AINTLNGLRLQSKTIKVSYP

>25spQ15717-106-186

ANLYISGLPRTMTQKDVEDMFSRFGRIINSRVLVDQTTGLSRGVAFIRFDKRSEAEAA
ITSFNHKKPPGSSEPITVKFAAN

>26spQ15717-244-322

WCIFIYNLGQDADEGILWQMFGPFGAVTNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYEEAA
MAIASLNGYRLGDKILQVSFKTN

>27spQ14966-676-751

SVLLITELPEDGCTEEDVRKLFQPFQKVNVLIVPYRKEAYLEMEFKEAITAIMKYIET
TPLTIKGSVKICVPGK

>28spQ14966-905-979

CVMLVSNLPNKGYSVEEVYDLAKPFGGLKDILILSSHKKAYIEINRKAESMVKFYTC
FPVLMMDGNQLSISMAPE

>29spQ15020-704-782

ITVFVSNLPYSMQEPDTKLRPLFEACGEVVQIRPIFSNRGDFRGYCYVEFKEEKSAL
QALEMDRKSVEGRPMFVSPCVD

>30spQ15020-801-878

HKLFISGLPFSCTKEELEEICKAHGTVKDLRLVTNRAGKPKGLAYVEYENESQASQA
VMKMDGMTIKENIIKVAISNP

>31spQ9Y580-10-87

RTLFGVGNLETKVTEELLFELFHQAGPVIKVKIPKDKDGKPKQFAFVNFKHEVSVPYAM
NLLNGIKLYGRPIKIQFRSG

>32spQ15434-56-129

TNLYIRGLQPGTTDQDLVKLCQPYGKIVSTKAILDKTTNKCKGYGFVDFDSPSAAQK
AVTALKASGVQAQMAKQ

>33spQ15434-135-220

TNLYISNLPLSMDEQELEGMLKPFQVISTRILRDTSGTSRQVGFARMESTEKCCEAI
THFNGKYIKTPPGVPAPSDPLLCKFADG

>34spP09012-10-89

HTIYINNLNEKIKKDELKKSLEYAIFSQFGQILDILVSRSLKMRGQAFVIFKEVSSATNAL
RSMQGFPPFYDKPMRIQYAKT

>35spP09012-208-282

HILFLTNLPEETNELMLSMLFNQFPGFKEVRLVPGRHDIAFVEFDNEVQAGAARDAL
QGFKITQNNAMKISFAKK

>36spO15056-889-968

DATVVVNLSQPTLEEKNEFPEDLRTELMQTLGSYGTIVLVRINQQGQMLVTFADSHSA
LSVLDVDGMKVKGRAVKIRPKTK

>37spQ9NWB1-117-193

KRLHVSNIPIFRFRDPDLRQMFGQFGKILDVEIIFNERGSKGFGFVTFENSADADRAR
EKLHGTVVEGRKIEVNNATA

>38spO95628-109-189

NLVFVVGLSQRLADPEVLKRPEYFGKFGKIHKVVINNSTSYAGSQGPSASAYVTYIR
SEDALRAIQCVNNVVVDGRTLKAS

>39spQ9UNP9-6-84

RVLYVGGLAEEVDDKVLHAAFIPFGDITDIQIPLDYETEKHRGFVFEFELAEDAAAAI
DNMNESELFGRRTIRVNLAKP

>40spQ9NW64-232-305

TTLVVGGLGDTITETDLRNHFYQFGEIRTITVVQRQQCAFIQFATRQAAEVAAEKSFN
KLIVNGRRLNVKWGRS

>41spP35637-285-371

NTIFVQGLGENVTIESVADYFKQIGIIKTNKKTGQPMINLYTDRETGKLGKGEATVSFDD
PPSAKAAIDWFDGKEFSGNPIKVSFATR

>42spQ96IZ5-309-387

KVLYLKNLSPRVTERDLVSLFARFQEKKGPPIQFRMMTGRMRGQAFITFPNKEIAWQ
ALHLVNGYKLGKILVIEFGKN

>43spQ13310-11-89

ASLYVGDHSDVTEAMLYEKFSPAGPVLRSIRVCRDMITRRSLGYAYVNFQQPADAE
RALDTMNFDVIKGPPIRIMWSQR

>44spQ13310-99-175

GNVFIKNLDKSIDNKALYDTFSAFGNILSCKVVCDENGSKGYAFVHFETQEAAADKAIE
KMNGMLLNDRKVFVGRFKS

>45spQ13310-191-268

TNVYIKNFGEEVDDESLKELFSQFGKTLVKVMRDPNGKSKGFGFVSYEKHEDANK
AVEEMNGKEISGKIIFVGRAQK

>46spQ13310-294-370

VNLYIKNLDDTIDDEKLRKEFSPFGSITSAKVMLEDGRSKGFGFVCFSSPEEATKAVT
EMNGRIVGSKPLYVALAQR

>47spQ8NDV7-1781-1853

NWLVLKNLTPQIDGSTLRITLCMQHGPLITFHLNLPHGALVRYSSKEEVVKAQKSLH
MCVLGNTTILAEFASE

>48spQ9P2N5-600-674

TKLEVKKIPQELNNITKLNEHFSKFGTIVNIQVAFKGDPEAALIQYLTNEEARKAISSTE
AVLNNRFIRVLWHRE

>44spP07910-16-87

SRVFIGNLNTLVVKKSDVEAIFSKYKIVGCSVHKGFAFVQYVNERNARA AVAGEDG
RMIAGQVLDINLAAE

>50spQ92904-40-115

NTVFGGIDVRMDETEIRSFARYGSVKEVKIITDRTGVSKGYGFVFFNDVDVQKIV
ESQINFHGKKLKLGPAIR

>51spP31942-16-93

GTVRLRGLPFGCSKEEIVQFFQGLEIVPNGITLTMDYQGRSTGEAFVQFASKEIAENA
LGKHKERIGHRYIEIFRSSR

>52spP31942-195-270

HFVHMRGLPFRATENDIANFFSPLNPIRVHIDIGADGRATGEADVEFVTHE DAVAAM
SKDKNNMQHRYIELFLNST

>53spQ8IZ69-73-146

FKLELQNVPRHASFSDVRRFLGRFGLQPHKTKLFGQPPCAFVTFRSAAERDKALRV
LHGALWKGRPLSVRLARP

>54spQ9BY77-280-351

TKMTVNNLHPRVTEEDIVELFCVCGALKRARLVHPGVAEVVFKKDDAITAYKKYNN
RCLDGQPMKCNLHMN

>55spO43251-121-197

KRLHVSNIPIFRFRDPDLRQMFGQFGKILDVEIIFNERGSKGFGFVTFENSADADRAR
EKLHGTVVEGRKIEVNNATA

>56spQ86U06-166-243

RTVFCMQLAARIRPRDLEDFFSAVGKVRDVRIISDRNSRRSKGIAYVEFCEIQSVPLAI
GLTGQRLLGVPIIVQASQA

>57spQ86U06-263-341

MRLYVGSLHFNITEDMLRGIFEPFGKIDNIVLMKSDTGRSKGYGFITFSSECARRA
LEQLNGFELAGRPMRVGHVTE

>58spQ13243-4-74

CRVFIGRLNPAAREKDVERFFKGYGRIRDIDLKRGFGFVEFEDPRDADDAVYELD GK
ELCSERV TIEHARA

>59spQ13243-108-181

NRLIVENLSSRVSWQDLKDFMRQAGEVTFADAHRPKLNEGVVEFASYGDLKNAIEK
LSGKEINGRKIKLIEGSK

>60spQ86U42-172-249

RSIYVGNVDYGATAEELEAHFHGCGSVNRVTILCDKFSGHPKGFAYIEFSDKESVRT
SLALDESLFRGRQIKVIPKRT

>61spQ9BZC1-54-135

IKLFIGQIPRNLDEKDLKPLFEEFGKIYELTVLKDRFTGMHKGCAFLTYCERESALKAQ
SALHEQKTLPGMNRPIQVKPADS

>62spQ9BZC1-152-232

RKLFVGM LNKQQSEDDVRRRLF EAFGNIEECTILRGPDGNSKGFV KYSSHAEQA
AINALHGSQTMPGASSSLVVKFADT

>63spQ9BZC1-404-479

PQPPMIPQQQREGPEGCNLFYHLPQEFGDAELMQMFLPFGFVSFDNPASAQTAI
QAMNGFQIGMKRLKVQLKRP

>64spP33240-16-94

RSVFVGNIPYEATEEQLKDIFSEVGPVVSFRLVYDRETGKPKGYGFCEYQDQETALS
AMRNLN GREFSGRALRVDNAAS

>65spQ9NVM6-178-249

KCKKEDESKGGYSKDVLLRLLQKYGEVLNLVLSSKKPGTAVVEFATVKAAELAVQNE
VGLVDNPLKISWLEG

>66126_176SOX2

TLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYSMMQD

>PUTATIVE_FOS90_145

TRAPHPFGVPAPSAGAYSRAGVVKTMTGGRAQSIGRRGKVEQLSPEEEEEKRRIRRE

>PUTATIVE_FOS200_257

HRPACKIPDDLGFPEEMSVASLDLTGGLPEVATPESEEAFTLPLLNDPEPKPSVEPV
K

>PUTATIVEFOS264_353

LKTEPFDDFLFPASSRPSGSETARVDPMDLSGSFYAADWEPLHSGSLGMGPMAT
ELEPLCTPVVTCTPSCCTAYTSSVFVFTYPEADSFPS

>PUTATIVEJUN144_215

APAVASVAGGSGSGGFSASLHSEPPVYANLSNPNPGALSSGGGAPSYGAAGLAFP
AQPQQQQQPPHHLPPQM

>PUTATIVEJUN65_115

DVGLLKLASPELERLIQSSNGHITTTPTPTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFV

>PUTATIVE_FOS_MOTIF_RESULTADO

AQKAIEKLNG

>PUTATIVE_JUN_MOTIF1_RESULTADO

KGFAFVEFED

>PUTATIVE_JUN_MOTIF2_RESULTADO

AQKAIEKLNG