

Detección del SARS-CoV-2 en células renales del aparato yuxtaglomerular en casos fallecidos con la COVID-19

Detection of SARS-CoV-2 in renal cells of the juxtaglomerular apparatus in deceased COVID-19 cases

Anabel Alfonso-Falcón^{1a}, Viviana Falcón-Cama^{2a}, Teresita Montero-González³, Jorge Berlanga-Acosta², Carlos Gutiérrez-Gutiérrez⁴, Nelson Acosta-Rivero^{5*}

¹Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas (ICBP) Victoria de Girón. La Habana, Cuba. Correo electrónico: draanabelalfonsonef@gmail.com. ORCID: 0000-0002-0883-5534.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (CIGB). La Habana, Cuba. Correo electrónico: viviana.falcon@cigb.edu.cu. ORCID:0000-0002-3795-9966.

³Hospital “Luis Díaz Soto”. La Habana, Cuba. Correo electrónico: teresamg@infomed.sld.cu. ORCID: 0000-0003-3372-6791.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (CIGB). La Habana, Cuba. Correo electrónico: jorge.berlanga@cigb.edu.cu. ORCID: 0000-0002-9465-2872..

⁴Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ). La Habana, Cuba. Correo electrónico: carlosgutierrezdoble@gmail.com. ORCID: 0000-0002-8963-2703.

⁵Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. Correo electrónico: nelson.acosta@fbio.uh.cu. ORCID: 0000-0001-8779-8358.

a: Ambos autores tienen igual contribución y deben considerarse primeros autores.

*Autor de Correspondencia.

DrC. Nelson Acosta Rivero. Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Tel: 53778367. Correo electrónico: nelson.acosta@fbio.uh.cu.

RESUMEN

Introducción: La infección por el SARS-CoV-2 y la lesión del tejido renal se asociaron con la morbilidad y mortalidad de la COVID-19. Por esto, el análisis de las autopsias de los individuos fallecidos por la COVID-19 y el posible impacto del SARS-CoV-2 en los diferentes órganos es valioso para entender la diseminación viral y la patogénesis de la infección. En un estudio previo, observamos la presencia del SARS-CoV-2 en muestras de tejidos de casos fallecidos con la COVID-19 y su relación con factores propios del hospedero. El presente trabajo tuvo como **objetivo** la detección del SARS-CoV-2 y caracterización de muestras adicionales de tejido renal de individuos fallecidos con la COVID-19.

Métodos: Se analizaron muestras de tejido renal a partir de autopsias de 5 individuos fallecidos con COVID-19. Las mismas se estudiaron mediante microscopías óptica (MO), electrónica de transmisión (MET) y de fluorescencia confocal (MFC) con la utilización de anticuerpos específicos para el SARS-CoV-2.

Resultados: Los análisis de tejidos renales mediante MO y MET mostraron la presencia de fibrosis intersticial en todas las muestras. Esto se relacionó con la detección del SARS-CoV-2 mediante MFC en células importantes para el funcionamiento renal y el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y órganos, como las células intersticiales o semejantes a fibroblastos y las células del complejo yuxtaglomerular.

Conclusión: Estos resultados pudieran tener implicación en la desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) por el SARS-CoV-2, el daño renal, y en el desarrollo de fibrosis y la patogénesis de la COVID-19.

Palabras clave: SARS-CoV-2; COVID-19; aparato yuxtaglomerular; fibrosis intersticial renal

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2's infection and injury of renal tissue has been associated with morbidity and mortality of COVID-19. So, autopsy analysis of deceased individuals with COVID-19 and the possible impact of SARS-CoV-2 in various organs are worth to understand viral spread and the pathogenesis of infection. Previously, we have shown SARS-CoV-2 in tissue samples of deceased cases with COVID-19 and its relationship with host factors. This work **aimed** at SARS-CoV-2's detection and characterization of additional samples of renal tissues from individuals who died with COVID-19.

Methods: Renal tissue samples from autopsies of 5 deceased individuals with COVID-19 were analyzed. They were studied through optical (MO), transmission electronic (MET) and fluorescence confocal (MFC) microscopy using antibodies specific for SARS-CoV-2.

Results: Renal tissue analysis using MO and MET showed the presence of interstitial fibrosis in all samples. This finding was related with detection of SARS-CoV-2 by MFC in cells important for both renal functions and homeostasis maintenance of tissues and organs, such as interstitial or fibroblast-like cells and cells of yuxtaglomerular complex.

Conclusion: These results may have implications for deregulation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) by SARS-CoV-2, for renal damage as well as fibrosis development and pathogenesis of COVID-19.

Estos resultados pudieran tener implicación en la desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) por el SARS-CoV-2, el daño renal, y en el desarrollo de fibrosis y la patogénesis de la COVID-19.

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; yuxtaglomerular apparatus; renal interstitial fibrosis

INTRODUCCIÓN

Desde el año 2019, la infección por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) que causa la enfermedad del coronavirus 19 (COVID-19), ha ocasionado un gran daño a la salud pública mundial.⁽¹⁾ El virus se propagó a otros países, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró como una pandemia.⁽¹⁾ A nivel mundial, se observó que aproximadamente el 20% de los pacientes con COVID-19 desarrollaron complicaciones graves, como la neumonía severa, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la sepsis y la muerte⁽²⁾.

La COVID-19 no solo afecta al sistema respiratorio, sino que también afecta directamente a órganos extrapulmonares.⁽³⁾ La detección del SARS-CoV-2 en diferentes órganos, indica que los sitios extrapulmonares de infección pueden contribuir con la patogenia de la enfermedad. Como resultado de la infección en el tejido renal, se planteó que la lesión renal aguda (LRA) es la segunda complicación más observada en la COVID-19 en los EE. UU. (22,2%)⁽⁴⁾ y en China (25,2%)⁽⁵⁾. El receptor principal del SARS-CoV-2 es la enzima convertidora de angiotensina (ECA) 2 (ECA2)⁽⁶⁾. La misma se expresa en numerosos tejidos, lo que contribuye al amplio tropismo viral y a la patogenia de la COVID-19⁽⁷⁾.

Debido a su origen, letalidad y al desarrollo de secuelas pos-agudas de la enfermedad, también conocidas como COVID persistente⁽⁸⁾, es necesario comprender las interacciones de este virus con su hospedero que están involucradas en los mecanismos de infección y en las complicaciones de la COVID-19. En especial, la identificación del tropismo celular viral, puede ser clave para la comprensión de la patogénesis, siendo relevante para conocer los mecanismos de infección del SARS-CoV-2 e identificar nuevas dianas terapéuticas. En un estudio previo, observamos la presencia del SARS-CoV-2 en muestras de tejidos de fallecidos con la COVID-19 y su relación con factores propios del hospedero⁽⁹⁾. El presente trabajo se enfocó en la detección del virus SARS-CoV-2 en muestras adicionales de tejido renal de fallecidos con la COVID-19.

MATERIALES Y MÉTODOS

Casos y muestras estudiadas

Las muestras del tejido renal analizadas, se obtuvieron de casos fallecidos con la COVID-19, siendo tres de ellas descritas en un estudio anterior (R, J y T) ⁽⁹⁾ y otras dos (N y E) provienen de otros pacientes fallecidos con la COVID-19. En todos los casos, se detectó el SARS-CoV-2 en muestras de exudados nasofaríngeos, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. El caso N tenía 70 años y falleció 8 días después del comienzo de los síntomas, y presentaba como principales comorbilidades insuficiencia vascular periférica y cardiopatía isquémica. El caso E tenía 80 años y falleció luego de 14 días del comienzo de los síntomas, y presentaba como principales comorbilidades enfermedad cerebrovascular y aterosclerosis. En todos los casos el análisis histológico de tejido pulmonar reveló evidencias distintivas de un patrón de daño alveolar agudo difuso (DAD) con predominio de la fase fibro-proliferativa.

Obtención de especímenes

La obtención de especímenes se describió anteriormente. ⁽⁹⁾ En resumen, se obtuvo el consentimiento informado por parte de los familiares de los fallecidos, y se realizó en todos los casos una autopsia limitada para la obtención de especímenes post mortem, por parte del departamento de anatomía patológica del Hospital “Luis Díaz Soto”, de La Habana. Este estudio recibió la aprobación de los Comités de ética del Hospital “Luis Díaz Soto” y del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Se obtuvieron muestras de tejido post mortem de pulmones y riñones, dentro de las 3 horas posteriores a la muerte. La autopsia se realizó siguiendo las recomendaciones y orientaciones sobre exámenes post mortem de casos de COVID-19, y los procedimientos establecidos por el Ministerio de Salud Pública de Cuba. Los tejidos se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS) durante 1 hora, y luego se procesaron de forma rutinaria en condiciones estándares de bioseguridad. Para preparar secciones congeladas, los tejidos se lavaron con sacarosa al 10% y 20% en PBS por 1 hora, y con sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C, y luego se

incluyeron en compuesto Tissue-Tek OCT (Sakura FineTek, Cat #4583, Tokio, Japón). Finalmente se hicieron cortes del tejido incluido de 8 μm mediante un Criomicrotomo (Bright Clinicut 60 Cryostat).

Tinción tricrómica de Picro Mallory del tejido renal

Se utilizó procedimiento descrito por Lendrum y col.⁽¹⁰⁾ Las secciones de tejido se lavaron con PBS y agua destilada, y se tiñeron con Hematoxilina. Después se añadió solución de ácido pícrico y se lavó con agua destilada. Entonces las muestras se tiñeron con solución de “Fucsina Ponceau” y se lavaron con agua acética. Además, se utilizó la solución del diferenciador de la tinción de color rojo y se lavó con agua acética y con agua destilada. Posteriormente, las muestras se tiñeron con solución del azul de anilina y se lavaron con agua acética. Entonces, se utilizó la solución del diferenciador del color azul y se lavó con agua acética. Finalmente, las muestras se deshidrataron con etanol, se aclararon con xilol y se montaron con cubre-objetos para su visualización en microscopio óptico (Olympus BX-53 BH).

Tinción de inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal del tejido renal

La tinción de inmunofluorescencia y el análisis de microscopía confocal de secciones congeladas del tejido renal, se realizaron como se describió anteriormente ⁽⁹⁾. Las secciones de tejido se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tween 20 al 0,5 % (T20) en PBS (PBS+T20 al 0,5 %) y se saturaron con solución de albúmina bovina (BSA) al 2 % en PBS+T20 al 0,1 % durante 30 min. Para detectar la proteína de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2, las secciones se incubaron con anticuerpos IgG monoclonales de ratón específicos para la NC (SINO Biologicals, # de catálogo 40143-MM05) o anticuerpos policlonales de conejo específicos contra la NC del SARS-CoV-2 descritos previamente ⁽⁹⁾, durante 2 horas a 27 °C o toda la noche a 4 °C (PBS+T20 0,1%). Después de lavar con PBS+T20 al 0,1 %, las muestras se incubaron durante 1 hora a 27 °C con uno de los siguientes anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo o IgG anti-ratón, de cabra conjugadas

con fluoresceína (KPL; # de catálogo 172-1506, y 02-18-18, respectivamente); IgG anti-conejo o IgG anti-ratón, de cabra conjugadas con Alexa Flúor 647 (Cell Signaling; # de catálogo 4414S, y 4410S, respectivamente) (PBS+T20 0,1%, dependiendo de la combinación de anticuerpos primarios y secundarios utilizada). Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS+T20 al 0,1%, los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino,2-fenilindol (DAPI) (1 mg/ml) (KPL; # de catálogo 1-03-01), y la preparación se cubrió con un cubreobjetos en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, # de catálogo H-1000). Las muestras se analizaron usando un microscopio de fluorescencia de barrido láser Olympus FV1000 IX81 (Olympus Corporation, Japón) y el software de imágenes FlowView Viewer v3.1. También se tomaron imágenes con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). Las imágenes se procesaron utilizando el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto Fiji ⁽¹¹⁾.

Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó en las muestras procesadas de la siguiente forma: los fragmentos de tejidos se fijaron en solución tamponada de 0,1 Molar de cacodilato de sodio (pH 7,4) (CNa) y glutaraldehído al 3,2% por 1 hora a temperatura ambiente, y después se pasó a CNa toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las muestras se fijaron en solución de tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en resina Spurr (Sigma-Aldrich). Entonces, se prepararon secciones ultrafinas (400–500 Å) de tejido mediante cortes con un ultramicrotomo (NOVA, LKB), que se colocaron en rejillas con tamaño de malla 400. Éstas se tiñeron con soluciones de acetato de uranilo y de citrato de plomo, y se visualizaron en un microscopio de escaneo electrónico (MIRA3-TESCAN, TESCAN) a 25 kV utilizando un detector de transmisión electrónica.

Resultados

Anteriormente se describió que en las muestras de pulmón del caso T no se detectó la NC. ⁽⁹⁾ Por otro lado, el análisis de las muestras de riñón de este caso, mostró poca fibrosis intersticial y no se detectó NC en las mismas (Figura 1). Resultó interesante que las nuevas

muestras del tejido renal analizadas en este trabajo (casos N y E) mostraron la presencia de fibrosis intersticial (Figura 2C,D) con un patrón similar al de las muestras de los casos R y J (Figura 2A,B).⁽⁹⁾ Otras características anómalas, también evidenciadas mediante MET, incluyeron el daño del epitelio tubular con ampliación del lumen tubular, oclusión del lumen microvascular en los capilares peritubulares con presencia de numerosos eritrocitos y daño endotelial (Figuras 2 y 3).

Por otro lado, la Figura 4 resume los principales hallazgos observados a nivel de la corteza renal, en las muestras analizadas mediante la microscopía de fluorescencia confocal. La proteína de la NC se detectó en las células epiteliales tubulares, células intersticiales peritubulares, en el glomérulo y en el aparato yuxtaglomerular. En algunas secciones no se detectó la NC (Figura 5A). La localización de la proteína NC del SARS-CoV-2 en el aparato yuxtaglomerular, incluyó a las células yuxtaglomerulares y a las células mesangiales extraglomerulares y también a las células de la mácula densa (Figuras 4 y 5). Resultó interesante que, en la mayoría de las muestras estudiadas, se observó un patrón de tinción de NC en el aparato yuxtaglomerular, y no en el glomérulo renal (Figura 5B-D).

DISCUSIÓN

La presencia del SARS-CoV-2 en el tejido renal de fallecidos con la COVID-19, coincide con lo reportado anteriormente ⁽⁷⁾. Particularmente, lo relacionado con la detección del virus SARS-CoV-2 en diferentes tipos de células renales como: las células epiteliales tubulares, las células endoteliales, los podocitos y las células mesangiales. Esto es indicativo del amplio tropismo celular reportado para el SARS-CoV-2 en el tejido renal ⁽⁷⁾. Además, nuestros hallazgos identificaron al SARS-CoV-2 en otras poblaciones de células de gran importancia para el funcionamiento renal y el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y órganos, como las células intersticiales o semejantes a fibroblastos y las células del aparato yuxtaglomerular.⁽⁹⁾ La presencia del SARS-CoV-2 en estos tipos celulares no se había identificado anteriormente en otros laboratorios⁽⁷⁾ por lo que constituye un resultado novedoso de nuestro grupo.

La expresión de ECA2 en el tejido renal puede contribuir a la infección por el SARS-CoV-2. ⁽⁷⁾ Aunque este receptor no se estudió en este trabajo, en el estudio anterior ECA2 se detectó en las muestras renales de los casos R y J lo que apoya los resultados observados ⁽⁹⁾. Anteriormente, se había identificado la infección por el SARS-CoV-2 de las células epiteliales tubulares y endoteliales como un aspecto que contribuye al daño renal y a la patogénesis de la COVID-19. ⁽¹²⁾ El presente trabajo mostró evidencias del daño en las células epiteliales tubulares y endoteliales e indicó la presencia del SARS-CoV-2 en las células tubulares. Esto unido a las evidencias previas de la detección del SARS-CoV-2 en células endoteliales renales en las muestras de los casos R y J ⁽⁹⁾, sugiere el posible daño viral causado en las células epiteliales y endoteliales, y su contribución a la patogenia de la COVID-19.

Por otro lado, las células semejantes a fibroblastos forman la masa principal de células intersticiales, que realizan varias funciones endocrinas en diferentes zonas renales y son un elemento central en el desarrollo de fibrosis ⁽¹³⁾. Es relevante, que la localización de la NC en las células intersticiales renales, se asoció con la detección de fibrosis en el intersticio renal. ⁽⁹⁾ Se reconoce que, las características anómalas observadas en los casos estudiados, en particular la fibrosis intersticial, podrían estar relacionadas con la combinación de la edad y las comorbilidades en estos pacientes ⁽¹⁴⁾. No obstante, la infección por el SARS-CoV-2 y la lesión viral directa, también podrían contribuir al daño del tejido renal.

Resulta interesante que la presencia del SARS-CoV-2 en el aparato yuxtaglomerular, pudiera afectar una función crucial de las células que lo constituyen, que es la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), involucrado en el control de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos ⁽¹⁵⁾. En este sentido, el SRAA es particularmente relevante en el contexto de la infección por el SARS-CoV-2, debido a su interacción con su receptor ECA2, que es un regulador clave del SRAA. Las interacciones entre los diferentes tipos celulares del aparato yuxtaglomerular, conduce a la síntesis y liberación de la renina por las células yuxtaglomerulares hacia el torrente sanguíneo ⁽¹³⁾. La renina promueve la hidrólisis del angiotensinógeno para formar la angiotensina I (Ang I). La misma se procesa por la ECA para formar la angiotensina II (Ang II) que desencadena sus efectos mediante los receptores de Ang II de tipo 1 (AT1R) ⁽¹⁶⁾. Estos efectos incluyen la vasoconstricción, el incremento de la

presión arterial, la síntesis y liberación de la aldosterona, la reabsorción de sodio, y promueven inflamación y fibrosis.

Por otro lado, las respuestas biológicas mediadas por la Ang II se inhiben por la ECA2, que procesa la Ang I y la Ang II para formar los péptidos ANG1-9 y ANG1-7, respectivamente. Estos interactúan con el receptor MAS para promover la vasodilatación, y los efectos anti-inflamatorios y antifibróticos. Es por esto, que el balance tisular entre las actividades de la ECA y la ECA2, regula las funciones efectoras del SRAA. Se propuso que la infección por el SARS-CoV-2 puede disminuir los efectos de la ECA2, y favorecer los relacionados con la actividad de la ECA ⁽¹⁷⁾. Esta observación sugiere que la patogénesis de la infección por el SARS-CoV-2 puede estar relacionada en parte con un desbalance de la red regulatoria de ECA-ECA2, de manera que la actividad de la ECA prevalece, contribuyendo a los efectos fibróticos.

En base a nuestros hallazgos, nos gustaría proponer nuevos elementos que apoyan la hipótesis de la desregulación del SRAA. Primero, la interacción del SARS-CoV-2 con las células semejantes a fibroblastos, puede tener un efecto pro-fibrótico directo. Segundo, la infección por el SARS-CoV-2 de las células del aparato yuxtaglomerular, incluyendo a las células intersticiales yuxtaglomerulares, puede interferir directamente con la regulación de la activación del SRAA. Esto puede ser especialmente relevante, puesto que el tejido renal es una fuente muy importante de producción de ANG1-7 ⁽¹⁸⁾. En estas condiciones hipotéticas, la disponibilidad limitada de ANG1-7 y ANG1-9, puede disminuir de manera importante sus efectos biológicos, predominando las respuestas pro-inflamatorias y pro-fibróticas, inducidas por el SARS-CoV-2. Las evidencias recientes que reportaron niveles disminuidos de Ang II y de ANG1-7 en pacientes con la COVID-19, a pesar de un incremento de la ECA2, apoyan nuestra hipótesis ⁽¹⁹⁾.

En este contexto, donde la infección renal por el SARS-CoV-2 influye por varias vías en los mecanismos de fibrosis, esta pudiera relacionarse con el desarrollo de la COVID persistente, que incluye la aparición o progresión de la enfermedad renal crónica ⁽²⁰⁾, especialmente en pacientes con comorbilidades, como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares.

En este aspecto se necesitan más estudios para comprender las implicaciones funcionales de la invasión por el SARS-CoV-2 en los diferentes tejidos, especialmente en los riñones, en la regulación del SRAA y en la patogénesis viral.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia del SARS-CoV-2 en células intersticiales o semejantes a fibroblastos y del aparato yuxtaglomerular, en el tejido renal con fibrosis intersticial de fallecidos con la COVID-19. Estos resultados pudieran tener implicación en la desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) por el SARS-CoV-2 y en el desarrollo de fibrosis. Este conocimiento es importante para comprender los mecanismos patogénicos del SARS-CoV-2, las secuelas de la enfermedad y el desarrollo de nuevas terapias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

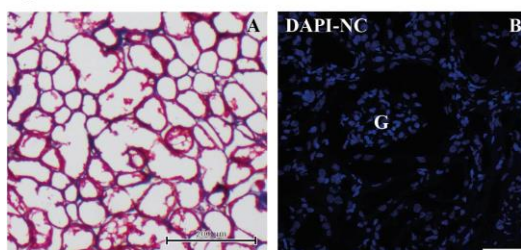
1. Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat Coronaviruses in China. *Viruses*. 2019, Mar 2; 11 (3): 210. Doi: 10.3390/v11030210. PMID: 30832341; PMCID: PMC6466186.
2. Wang C., Horby P.W., Hayden F.G., Gao G.F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 395: 2020, 470–473.
3. Bradley B.T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S.L., Xu H., y col. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet*. 2020, 396: 320-332. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)31305-2.
4. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., y col. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA*. 2020, 323:2052–2059. Doi: 10.1001/jama.2020.6775.
5. Yu Y., Xu D., Fu S., Zhang J., Yang X., Xu L., y col. Patients with COVID-19 in 19 ICUs in Wuhan, China: a cross-sectional study. *Critical Care*. 2020, 24:129.
6. Maranduca, M.A., Vamesu, C.G., Tanase, D.M., Clim, A.; Drochioi, I.C.; Pinzariu, A.C., y col. The RAAS Axis and SARS-CoV-2: From Oral to Systemic Manifestations. *Medicina*. 2022, 58, 1717. <https://doi.org/10.3390/medicina58121717>.
7. Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindenmeyer M.T., Sperhake J.P., Wong M.N., Allweiss L., y col. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*, 2020. 383:590-2. DOI: 10.1056/NEJMc2011400.
8. Lazar M., Sandulescu M., Barbu E.C., Chitu-Tisu C.E., Andreescu D.I., Anton A.N., y col. The Role of Cytokines and Molecular Pathways in Lung Fibrosis Following SARS-CoV-2 Infection: A Physiopathologic (Re)view. *Biomedicines*, 2024. 12: 639.
9. Falcón-Cama V., Montero-González T., Acosta-Medina E.F., Guillen-Nieto G., Berlanga-Acosta J., Fernández-Ortega C., y col. Evidence of SARS-CoV-2 infection in postmortem lung, kidney, and liver samples, revealing cellular targets involved in COVID-19 pathogenesis. *Arch Virol*, 2023. 168: 96.
10. Lendrum, A.C., Fraser, D.S., Slidders, W., Henderson, R. Studies on the character and staining of fibrin. *J Clin Pathol*, 1962. 15: 401-13.
11. Bolte S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*. 2006 Dec, 224 (Pt3): 213–32. Doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x. PMID: 17210054.

12. Akilesh S., Nast C.C., Yamashita M., Henriksen K., Charu V., Troxell M.L., y col. *Correlación clinicopatológica multicéntrica de biopsias renales realizadas en pacientes con COVID-19 que presentan insuficiencia renal aguda lesiones o proteinuria.* *AJKD*, 2021. 77: 82–93.
13. Kurtz A. *Endocrine functions of the renal interstitium.* *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 2017. Doi: 10.1007/s00424-017-2008-9.
14. Hommos M.S., Glasscock R.J., Rule A.D. *Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging.* *J Am Soc Nephrol*, 2017. 28. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017040421>).
15. Schnermann J.B., Briggs J.P. *Function of the Juxtaglomerular Apparatus: CONTROL OF GLOMERULAR HEMODYNAMICS AND RENIN SECRETION.* In: *The Kidney*, Giebisch S.a. (ed.), 2008. pp. 589-626.
16. Furuhashi M., Moniwa N., Takizawa H., Ura, N., Shimamoto, K. *Potential differential effects of renin-angiotensin system inhibitors on SARS-CoV-2 infection and lung injury in COVID-19.* *Hypertens Res.* 2020 Aug; 43 (8): 837-840. Doi: 10.1038/s41440-020-0478-1. Epub. 2020, May 20. PMID: 32433641; PMCID: PMC7237878.
17. Katharina Lanza K., Pérez L.G., Costa L.B., Cordeiro T.M., Palmeira V.A., Ribeiro V.T., y col. *Covid-19: the renin–angiotensin system imbalance hypothesis.* *Clinical Science.* 2020, 134: 1259–1264.
18. Pinheiro S.V., Simoes E., Silva A.C. *Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney.* *Int J Hypertens* 2012: 414128.
19. Silva M.G., Corradi G.R., Pérez-Duhalde J.I., Núñez M., Cela E.M., Gonzáles-Maglio D.H., y col. *Plasmatic renin-angiotensin system in normotensive and hypertensive patients hospitalized with COVID-19.* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022. 152: 113201.
20. Jayaraman, P., Rajagopal, M., Paranjpe, I., Suarez-Farinas, M., Liharska, L.E., Thompson, R.C., y col. *Peripheral Transcriptomics in Acute and Long-Term Kidney Dysfunction in SARS-CoV-2 Infection.* *Kidney360*, 2025. 6: 921–936.

Pie de Figuras

Figura 1. Imágenes representativas de la tinción Tricrómica de Picro Mallory y Microscopía de Fluorescencia Confocal en secciones de tejido renal del caso T fallecido con la COVID-19.

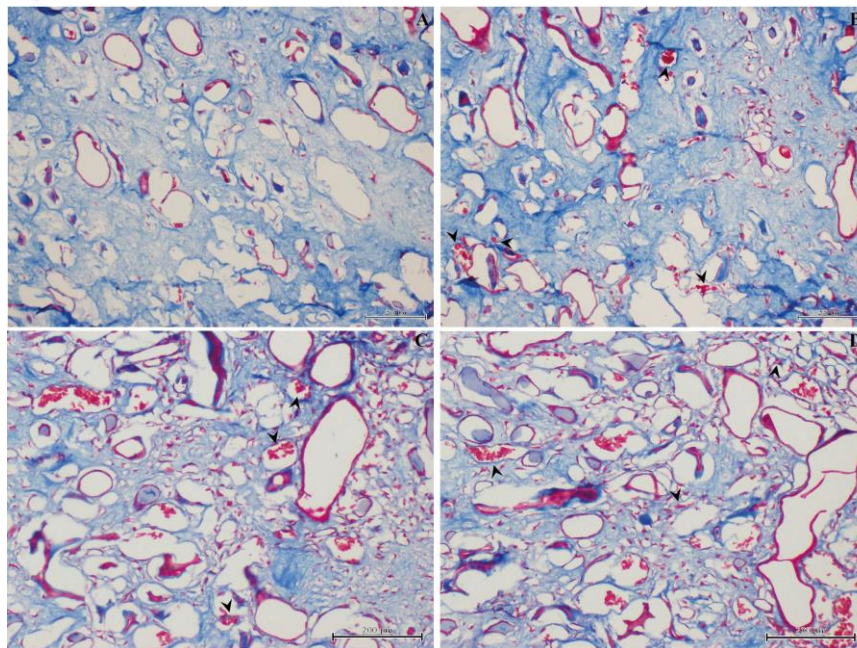
Figura 1



A) Tinción Tricrómica de Picro Mallory, que muestra escasa presencia de fibrosis intersticial en el tejido renal (tinción azul). **Barra:** 200 μm . **B).** Microscopía de Fluorescencia Confocal de sección de la zona glomerular del tejido renal, donde no se detectó la proteína de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2. Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). Glomérulo (G). **Barra:** 50 μm .

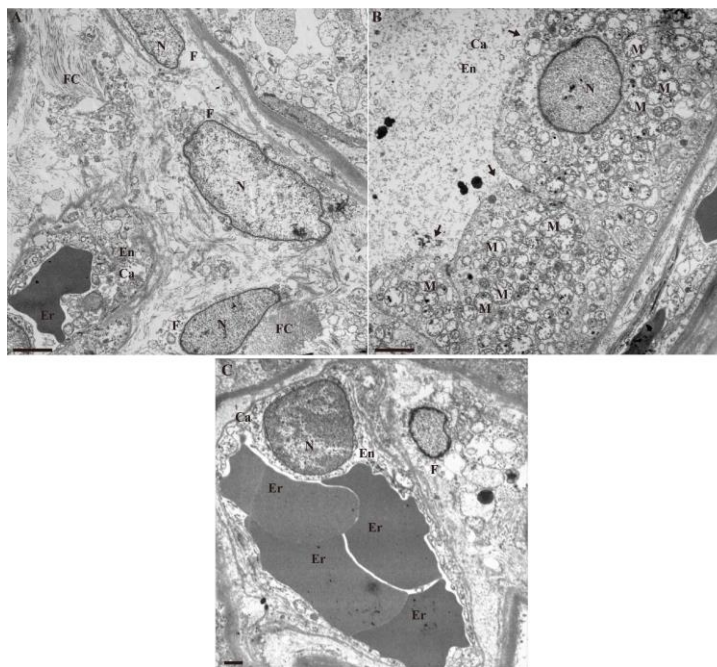
Figura 2. Imágenes representativas de la tinción Tricrómica de Picro Mallory en muestras de tejido renal de pacientes fallecidos con la COVID-19.

Figura 2



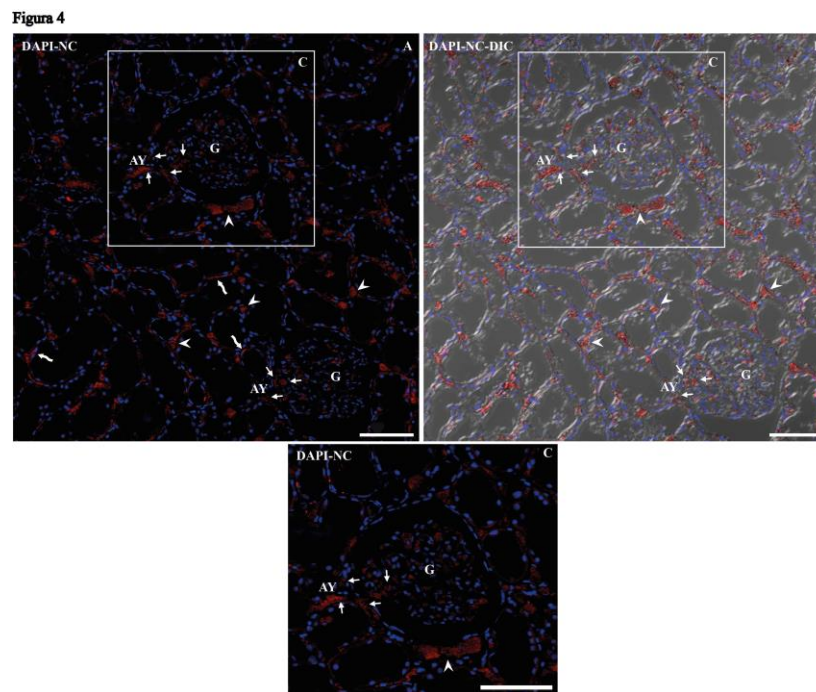
Secciones de zona intermedia entre corteza y médula renal donde se muestra la presencia de fibrosis intersticial (tinción azul) en los casos R (A), J (B), N (C) y E (D). Nótese, también, daño del epitelio tubular, con dilatación y oclusión de lumen microvascular con presencia de eritrocitos (cabeza de flechas). Tinción del colágeno en azul. **Barras:** 200 μm.

Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión (MET) en muestras de tejido renal del paciente R, fallecido con la COVID-19.



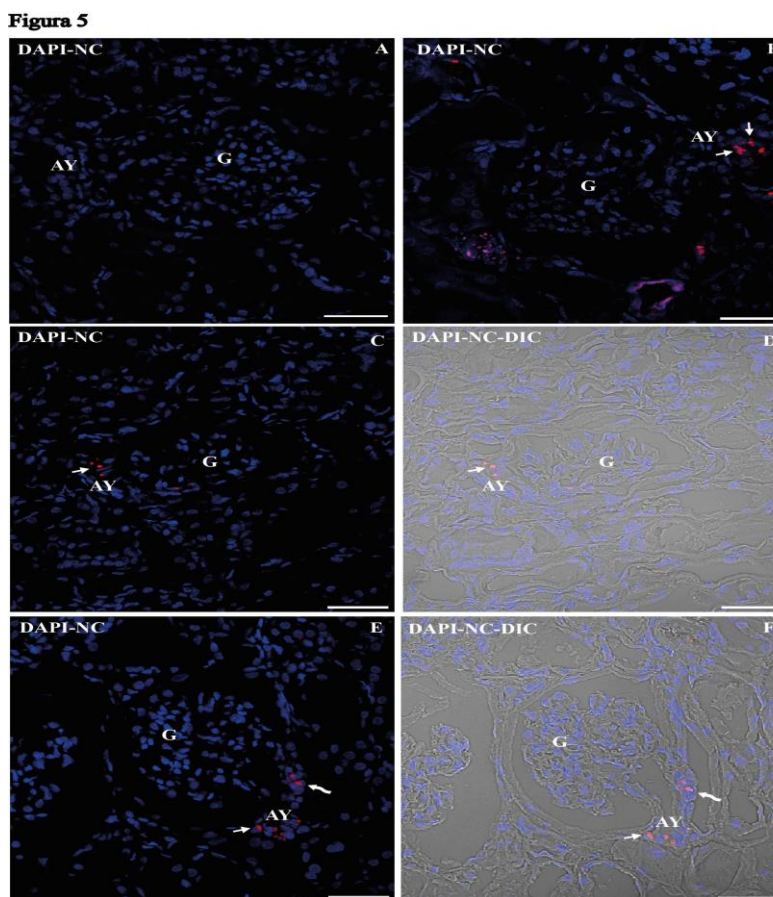
A) Células semejantes a fibroblastos (F) en el intersticio peritubular, y abundantes fibras de colágeno (FC). Note parte de un capilar sanguíneo (Ca) con oclusión del lumen microvascular, donde se observa parte de una célula endotelial (En) dilatada y un eritrocito (Er). **B)** Región peritubular cortical que muestra las células tubulares dañadas con aumento de volumen de las mitocondrias (M), ruptura de la membrana celular y salida de debris celular al medio extracelular (flechas). **Barras:** 2 μm . **C)** Región peritubular de la corteza renal donde se observa un capilar sanguíneo (Ca) con oclusión del lumen microvascular, numerosos eritrocitos (Er) y parte de una célula endotelial (En). Núcleo (N). **Barra:** 1 μm .

Figura 4. Estudio de la presencia de la proteína de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2 en secciones de tejido renal de un paciente fallecido (N) con la COVID-19 mediante la Microscopía de Fluorescencia Confocal.



A, B, C) Sección de la corteza renal donde se muestra la presencia de la NC (rojo) localizada en las células epiteliales tubulares (flechas curvas), en células intersticiales peritubulares (cabeza de flechas) y en el glomérulo (G) (flechas). También, la NC se detectó en el aparato yuxtaglomerular (AY) (flechas), a nivel de las células yuxtaglomerulares de la arteria aferente, células mesangiales extraglomerulares y de la mácula densa. **B)** Las células del tejido se analizaron mediante óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC). **C)** Ampliación de cuadro en A y B. Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). **Barras:** 100 μ m.

Figura 5. Estudio de la presencia de la proteína de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2 en secciones de tejido renal de casos fallecidos (R, J, E) con la COVID-19 mediante la Microscopía de Fluorescencia Confocal.



Secciones de la corteza renal: **A, B)** Secciones del tejido renal del paciente R, donde no se detectó la NC (**A**); y donde se observó la NC (rojo) en la mácula densa del aparato yuxtaglomerular (AY) (flechas) (**B**); **C, D)** Secciones del tejido renal del paciente J donde la NC se localizó en las células mesangiales extraglomerulares del AY (flechas); **E, F)** Secciones del tejido renal del paciente E donde la NC se localizó en las células perivasculares (flechas curvas) y mesangiales extraglomerulares (flechas) del AY. **D, F)** Las células del tejido se analizaron mediante óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC). Glomérulo (G). Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). **Barras:** 50 μ m.