



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Evaluación de nuevos marcadores urinarios en la
nefropatía diabética temprana en un modelo
murino de diabetes.**

T E S I S

Que presenta

QFI Luis Arturo Hernández Carmona

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de Farmacología

Directores de la tesis:

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Dra. Luz Graciela Cervantes
Pérez

Ciudad de México

Diciembre, 2019

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias bajo la tutoría del Dr. José Luis Reyes Sánchez fue realizada bajo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CVU 721293 y la cotutoría de la Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez del departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

El comité tutorial que asesoró el presente proyecto estuvo conformado por:

Dra. Liliana Favari Perozzi. Departamento de Farmacología del CINVESTAV

Dr. Pablo Muriel de la Torre. Departamento de Farmacología del CINVESTAV

Dra. María Estela Meléndez Camargo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
IPN.

Agradezco a los auxiliares de investigación: Dr. Rafael Rodríguez Muñoz y
QFB María del Carmen Namorado Tonix por todo su apoyo en el laboratorio, su
compromiso y aporte a este trabajo.

Agradecimientos

Al Dr. José Luis Reyes Sánchez por abrirme las puertas de su laboratorio, a todas las enseñanzas, a buscar la excelencia en mi trabajo. Todas sus enseñanzas enriquecieron enormemente mi formación científica. También les agradezco que no sólo me brindó su apoyo en el aspecto académico sino también en el ámbito personal y moral, por todo su apoyo le estaré inmensamente agradecido para toda mi vida. ¡MUCHAS GRACIAS!

A mi cotutora Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez por todo su apoyo en este trabajo, su compromiso y aporte a este trabajo.

A mi comité tutorial a la Dra. Liliana Favari Perozzi, Dr. Pablo Muriel de la Torre y la Dra. María Estela Meléndez Camargo, muchas gracias por todo su apoyo.

Al Dr. Rafael Rodríguez Muñoz por brindarme sus enseñanzas del WB, por todas sus opiniones constructivas ¡Muchas, muchas gracias!

A la QFB María del Carmen Namorado Tonix por todo su apoyo en la realización de experimentos del modelo de diabetes tipo 1, por su apoyo incondicional, por su gran amistad, muchísimas gracias Carmelita.

Al Sr. Arturo Vinicio Mena V. por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A Esther Vargas Sánchez por todo su apoyo ¡Muchas, muchas gracias!

A mis compañeros y amigos de la maestría Claudia, Consuelo, Rubén, Wili, Raúl, Tania, Alejandra, Irina, Andrea, Lorena, Rocío, Edith, Marlene, Brenda, Dr. Pérez, QFB Elsa, muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia conformada por mi mamá, hermana, mi sobrina hermosa y Eder. Por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible todo esto. ¡Muchas gracias, los amo!

Luis Arturo Hernández Carmona

RESUMEN

Introducción. La hiperglucemia se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre (≥ 126 mg/dL en ayuno) y con el transcurso del tiempo estos niveles de glucosa dañan la microvasculatura renal. La nefropatía diabética es la complicación final de esta patología, en donde se presentan alteraciones morfológicas y funcionales bien caracterizadas. En la actualidad, no existe un marcador urinario temprano y específico que permita determinar el riesgo para desarrollar nefropatía diabética una vez que la diabetes es diagnosticada.

Objetivo. Evaluar claudina-5 (Cln-5), ocludina, claudina-2 (Cln-2), contrantransportador Na^+ /glucosa (SGLT-2 y SGLT-1), claudina-16 (Cln-16) y acuaporina-2 (AQP-2) como marcadores urinarios específicos de daño renal en un modelo murino con nefropatía diabética temprana.

Metodología. Se indujo diabetes tipo 1 a ratas Wistar mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg). Las ratas diabéticas fueron sacrificadas a los 7, 14 y 21 días posteriores a la inducción. Se realizó la determinación de proteinuria y creatinina como pruebas de función renal. Mediante Western blot se analizó la expresión de Cln-5, ocludina, Cln-2, SGLT-2, SGLT-1, Cln-16, AQP-2, KIM-1 (Kidney Injury molecule-1), THP (Tamm Horsfall protein), NGAL (Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), albuminuria y $\beta 2$ – microglobulina.

Resultados. Se encontró un incremento en la excreción urinaria de Cln-5, ocludina, Cln-2, SGLT-2, SGLT-1, Cln-16 y AQP-2 en las tres semanas de daño con Nefropatía diabética y la presencia de KIM-1, THP, NGAL, albuminuria y $\beta 2$ – microglobulina en la orina como marcadores que confirman la presencia de daño.

Conclusión. Estos resultados sugieren a Cln-5, ocludina, Cln-2, SGLT-2, SGLT-1, Cln-16 y AQP-2 como marcadores urinarios nuevos de nefropatía diabética que permiten predecir el riesgo para desarrollar nefropatía diabética.

PALABRAS CLAVE: Nefropatía diabética, estreptozotocina, KIM-1 (Kidney injury molecule-1), THP (Tamm Horsfall protein), NGAL (Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), $\beta 2$ – microglobulina, claudina-5 (Cln-5), ocludina, claudina-2 (Cln-2), contrantransportador Na^+ /glucosa SGLT-2, SGLT-1, claudina-16 (Cln-16) y acuaporina-2 (AQP-2).

ABSTRACT

Introduction. Hyperglycemia is characterized by high blood glucose concentrations (≥ 126 mg / dL) and over time these glucose levels damage renal microvasculature. Diabetic nephropathy is the final complication of this pathology, where well-characterized morphological and functional alterations occur. Currently there is no specific and early urinary marker that allows determining the risk of developing diabetic nephropathy once diabetes is established. **Objective.** To evaluate claudin-5 (Cln-5), occludin, claudin-2 (Cln-2), sodium glucose cotransporters (SGLT-2 and SGLT-1), claudin- 16 (Cln-16) and aquaporin-2 (AQP-2) as a specific urinary marker of renal damage in a murine model of early diabetic nephropathy. **Methodology.** Type 1 diabetes was induced in Wistar rats by administration of streptozotocin (60 mg / kg, ip). Diabetic rats were sacrificed 21 days after induction. Proteinuria and creatinine were determined as renal function tests. Western blotting analyzed the urinary logs of Cln-5, occludin, Cln-2, SGLT-2, SGLT-1, Cln-16, AQP-2, KIM-1 (Kidney Injury molecule-1), THP (Tamm Horsfall protein), NGAL, albumin and $\beta 2$ -microglobulin. **Results.** An increase in the urinary excretion of Cln-5, occludin, Cln-2, Cln-16, SGLT-2, SGLT-1 and AQP-2 was found in the three weeks of damage with diabetic nephropathy and the presence of KIM-1, THP (Tamm Horsfall protein), NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), albumin and $\beta 2$ -microglobulin in the urine as markers that confirm the presence of damage. **Conclusion.** These results suggest Cln-5, occludin, Cln-2, SGLT-2, SGLT-1, Cln16 and AQP-2 as a new urinary markers of diabetic nephropathy that allow to predict the risk of developing diabetic nephropathy.

KEY WORDS: Diabetic nephropathy, streptozotocin, KIM-1 (Kidney Injury molecule-1), THP (Tamm Horsfall protein), NGAL, $\beta 2$ -microglobulin, claudin-5 (Cln-5), occludin, claudin-2 (Cln-2), sodium glucose cotransporters (SGLT-2 and SGLT-1), claudin- 16 (Cln-16) and aquaporin-2 (AQP-2).

Abreviaturas

ANOVA	Ánalysis de varianza	KIM-1	Kidney Injury molecule-1
TCA	Ácido Tricloroacético	kDa	Kilodalton
AQP	Acuaporina	NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos
GLWCC	Aminoácidos con un motivo común	LEC	Líquido extracelular
ECL	Asa extracelular	MBG	Membrana basal glomerular
PC	Células principales	JAM's	Moléculas de la adhesión de la unión
CP	Células principales	ASDN	Nefrona distal sensible a aldosterona
Cl _n	Claudina	DN	Nefropatía diabética
CD	Conducto colector	No.	Número
SGLT	Contransportador de Na ⁺ /glucosa	OMS	Organización Mundial de la Salud
CT	Control	eNOS	Óxido nítrico endotelial
HMIT	Cotransportador de H ⁺ /myo-inositol	ADH	rama ascendente delgada de Henle
uCr	Creatinina urinaria	AGH	rama ascendente gruesa de Henle
AGE's	Productos avanzados de glicosilación	DH	rama descendente delgada de Henle
DBT	Diabetes	LSR	Receptor estimulado por lipólisis
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1	ADA	Sociedad americana de la diabetes
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2	THP	Tamm Horsfall protein
ERT	Enfermedad renal en fase terminal	TFG	Tasa de filtración glomerular
EEM	Error estandar de la media	GLUT	Transportador de glucosa
ERO	Especie reactiva de oxígeno	TC	Túbulo colector
STZ	Estreptozotocina	TCN	Túbulo conector
G	Glomérulo	TD	Túbulo distal
GPI	Glucosilfosfatidilinositol	TP	Túbulo proximal
g.p.c.	Gramos de peso corporal	UE	Unión estrecha
ADH	Hormona antidiurética	WB	Western Blot
i.p.	Intraperitoneal	ZO	Zónula occludens

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	SISTEMA RENAL.....	1
1.1.1	EL RIÑÓN Y LA NEFRONA	1
1.2	TRANSPORTE A TRAVES DEL EPITELIO TUBULAR RENAL	1
1.2.1	TRANSPORTE PARACELULAR	2
1.2.2	TRANSPORTE TRASCELULAR	5
1.3	DIABETES MELLITUS	10
1.3.1	COMPLICACIONES DE LA DIABETES	11
1.3.2	NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	12
1.4	BIOMARCADOR	14
1.4.1	BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL.....	14
2	JUSTIFICACIÓN.....	19
3	HIPÓTESIS.....	19
4	OBJETIVO.....	20
4.1	GENERAL.....	20
4.2	PARTICULARES.....	20
5	MATERIALES Y REACTIVOS.....	21
5.1	MATERIALES	21
5.2	REACTIVOS	21
5.2.1	INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL	21
5.2.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	21
5.2.3	CUANTIFICACIÓN DE CREATININA POR EL MÉTODO DE JAFFÉ.	21
6	METODOLOGÍA.....	22
6.1	MATERIAL BIOLÓGICO	22
6.2	MODELO DE DIABETES TIPO 1.....	22
6.3	GRUPOS EXPERIMENTALES	22
6.4	EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.....	22
6.4.1	FUNCIÓN RENAL	24

6.5	WESTERN BLOT	25
6.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
7	RESULTADOS	28
7.1	MODELO DE DIABETES TIPO 1 (DBT1)	28
7.2	LA DIABETES INDUCE PROTEINURIA Y ALTERACIONES EN LA FILTRACIÓN RENAL.....	30
7.3	MARCADORES QUE CONFIRMAN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA ..	31
7.4	PROTEÍNAS RENALES COMO POSIBLES MARCADORES DE NEFROPATÍA DIABÉTICA	33
8	DISCUSIÓN.....	36
9	CONCLUSIÓN.....	41
10	PERSPECTIVAS	42
11	REFERENCIAS	42
12	TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del epitelio tubular renal y de las vías de transporte transcelular y paracelular.....	2
Figura 2.	Las uniones estrechas están formadas por una matriz compleja de proteínas.	3
Figura 3.	Expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina, claudinas, ZO-1 y ZO-2 a lo largo de la nefrona.....	4
Figura 4.	Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal por los cotransportadores SGLT1 y SGLT2.....	8
Figura 5.	Proteínas de membrana que intervienen en la reabsorción de agua .	9
Figura 6.	Jaula metabólica.....	24
Figura 7.	La administración de estreptozotocina (STZ) induce las características clínicas y metabólicas de la diabetes.....	29
Figura 8.	La diabetes induce disfunción renal.....	30
Figura 9.	Evaluación de marcadores urinarios de daño renal en la nefropatía diabética temprana.....	32
Figura 10,	Evaluación de proteínas renales como posibles marcadores de nefropatía diabética temprana.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medición de proteínas y albúmina en orina de 24 horas.....16

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para Western blot (WB)..... 27

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA RENAL

El sistema renal representa un eje importante y fundamental para la homeostasis del organismo. Está formado por órganos denominados riñones, localizados en la cavidad retroperitoneal, los cuales están en comunicación con la vejiga mediante estructuras conocidas como uréteres. Dentro de las funciones más importantes que lleva a cabo el sistema renal se encuentran el mantenimiento del equilibrio entre el volumen del líquido extracelular (LEC) y la osmolaridad. También tiene otras funciones como la regulación del pH, el mantenimiento del balance de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^-), la excreción de sustancias de desecho (creatinina, urea, ácido úrico, fármacos, sustancias tóxicas entre otros), así como también, la producción y secreción hormonal (renina y eritropoyetina).¹

1.1.1 EL RIÑÓN Y LA NEFRONA

El riñón se divide macroscópicamente en dos zonas, una zona externa denominada corteza y una zona interna denominada médula. La nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón y está conformada por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle con sus segmentos grueso y delgado, el túbulo distal y los túbulos colectores. El riñón humano contiene aproximadamente entre 1- 1.5 millones de nefronas.²

Las nefronas realizan los procesos de filtración, reabsorción y secreción. Son responsables de la homeostasis de la sangre y del líquido extracelular. Su principal función es filtrar la sangre en los glomérulos, reabsorbiendo lo que es necesario, por mecanismos transcelulares y paracelulares.²

1.2 TRANSPORTE A TRAVÉS DEL EPITELIO TUBULAR RENAL

Las células epiteliales tubulares desempeñan un papel crítico en el manejo renal de solutos orgánicos e inorgánicos. La reabsorción y la secreción de solutos a través del epitelio tubular renal constituyen un aspecto fundamental de la fisiología celular del riñón. El transporte neto de solutos y H_2O a través de

este epitelio ocurre por medio de dos vías: la vía transcelular y la vía paracelular (Figura 1). El transporte transcelular es el movimiento regulado de solutos y agua desde la membrana apical a través del citoplasma y cruzando la membrana basolateral. Este proceso ocurre por transportadores y canales que se encuentran tanto en la membrana apical como en la basolateral, mientras que el transporte a través de la vía paracelular es regulado por las proteínas de la unión estrecha (UE).^{3, 4}

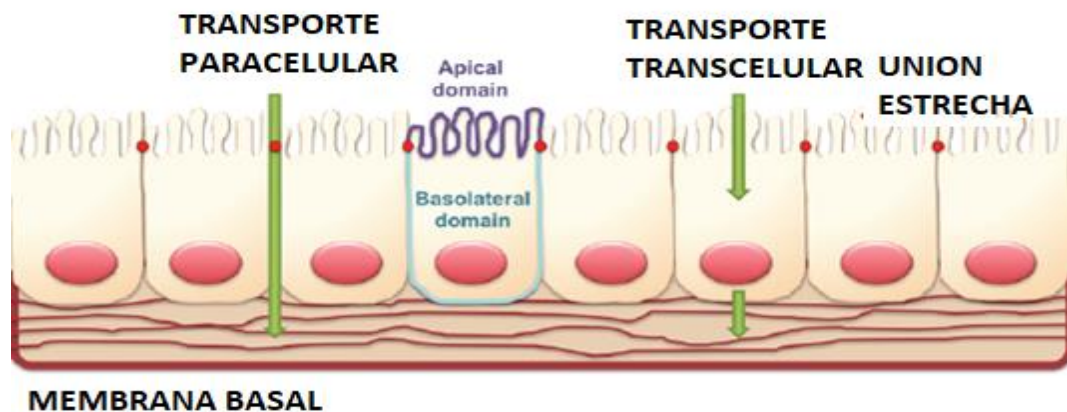


Figura 1. Representación esquemática del epitelio tubular renal y de las vías de transporte transcelular y paracelular. Modificada de González- Mariscal et al., 2012⁴

1.2.1 TRANSPORTE PARACELULAR

Las proteínas de la UE forman estructuras que se encuentran en el límite entre las membranas apical y basolateral de las células epiteliales y son de dos tipos: integrales y periféricas. Las proteínas integrales comprenden a las claudinas, a las moléculas de adhesión de la unión (JAMs), a la tricelulina, a la ocludina, a las proteínas MARVEL (TAMPs) y al receptor estimulado por lipólisis (LSR), las cuales establecen los contactos célula-célula en el espacio intercelular. Las proteínas periféricas como zonula occludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) actúan como un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina⁵ (Figura 2).

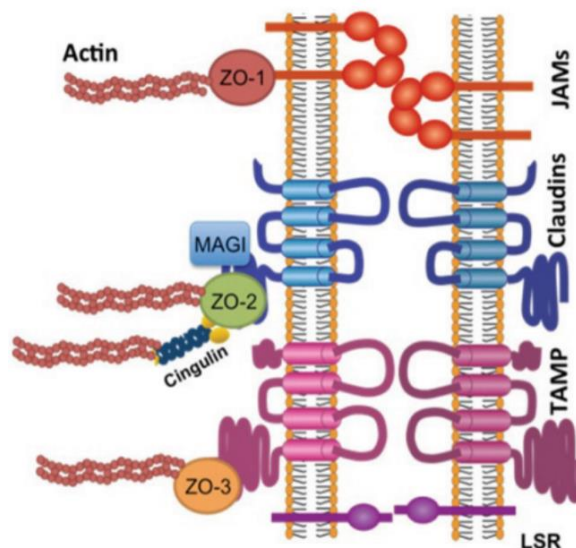


Figura 2. Las uniones estrechas están formadas por una matriz compleja de proteínas. tomada de González- Mariscal et al., 2012⁴

1.2.1.1 LAS CLAUDINAS Y OCLUDINA EN LA NEFRONA

Las claudinas son proteínas de 21 a 28 kD con 4 dominios transmembranales, 2 asas extracelulares, 2 dominios citoplasmáticos —uno amino y carboxilo terminal— y una corta vuelta citoplasmática. La primera asa extracelular (ECL1) de las claudinas consiste en aproximadamente 50 aminoácidos con un motivo común (GLWCC). Contiene aminoácidos cargados positiva y negativamente. Las cargas en el ECL1 regulan la selectividad iónica a través de efectos electrostáticos. La segunda asa extracelular (ECL2) consiste en aproximadamente 25 aminoácidos con un motivo predicho de hélice-vuelta-hélice que media las interacciones intracelulares de las claudinas. El dominio C terminal contiene el dominio de unión PDZ que es crítico para la interacción con la proteína submembrana ZO-1 y su correcta localización en la unión estrecha. En el epitelio renal, las claudinas han mostrado conferir selectividad iónica a la unión estrecha, resultando en diferencias en la resistencia transepitelial y en las permeabilidades paracelulares. Por ejemplo: las claudinas 4, 5, 8, 11 y 14 selectivamente disminuyen la permeabilidad a cationes a través de las uniones estrechas, especialmente al sodio, potasio, hidrogenión y amonio; las claudinas 2, 15 y 16 incrementan la permeabilidad a cationes, específicamente, sodio, potasio, calcio y magnesio.⁶

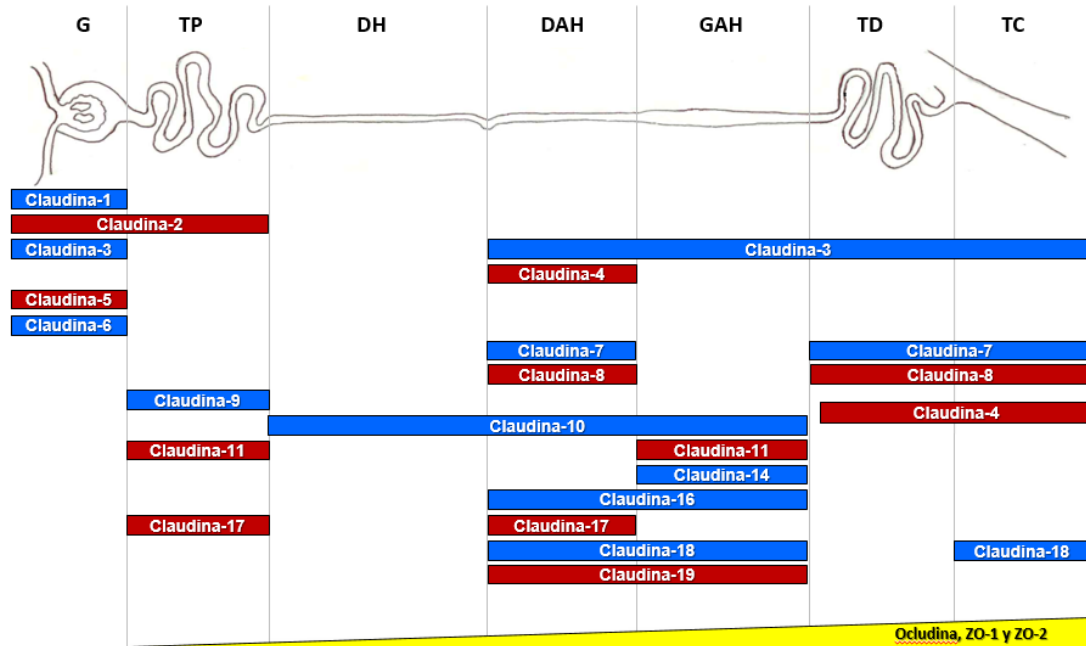


Figura 3. Expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina, claudinas, ZO-1 y ZO-2 a lo largo de la nefrona. Las claudinas forman poros o canales paracelulares catiónicos o aniónicos a lo largo de la nefrona. G, glomérulo; TP, túbulo proximal; DH, rama descendente delgada de Henle; ADH, rama ascendente delgada de Henle; AGH, rama ascendente gruesa de Henle; TD, túbulo distal y TC, túbulo colector. Distribución de las claudinas a lo largo de la nefrona, modificada de Reyes, et al., 2013⁷.

Localización, función y regulación de las claudinas en el riñón

Una gran variedad de claudinas se expresan a lo largo del riñón (Figura 3). A continuación, se explicará de manera resumida la función y regulación de las claudinas en los diferentes segmentos de la nefrona.

Glomérulo

El epitelio parietal que reviste a la cápsula de Bowman actúa como una barrera para las macromoléculas.⁸ La claudina-5 se expresa a lo largo de la membrana plasmática de los podocitos,⁹ mientras que la claudina-6 se expresa en la membrana basal y en la base del diafragma en hendidura.¹⁰

Túbulo proximal

El túbulo proximal es un epitelio con alta permeabilidad iónica y reabsorbe hasta dos terceras partes de la carga de Cl⁻ filtrado, así como dos terceras partes del volumen del ultrafiltrado glomerular. Casi la mitad del NaCl

se reabsorbe a través de la vía paracelular. La claudina-2, que actúa como un poro paracelular catiónico,¹¹ se expresa de manera abundante en este segmento de la nefrona, así como en el segmento inicial de la rama descendente delgada del asa de Henle donde transporta Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y agua¹². En el túbulo proximal también se expresan las claudinas-10a, -12 y -17, las cuales funcionan como poros con selectividad aniónica que pueden reabsorber Cl^- en este segmento de la nefrona.

Rama ascendente gruesa del asa de Henle

En el epitelio renal, las claudinas confieren selectividad iónica a la unión estrecha. La rama gruesa ascendente del asa de Henle (AGH) es el segmento tubular renal más importante en la reabsorción tubular de calcio y magnesio. Varios estudios han llevado a un modelo en el que distintas claudinas forman el canal paracelular, especialmente la claudina 16 y 19.¹³ La claudina 16 media la permeabilidad paracelular catiónica en la AGH mientras que la claudina 19 incrementa la selectividad catiónica de la claudina 16 bloqueando la permeabilidad aniónica. El aumento de proteínas de claudina 14 en las uniones estrechas inhibe la selectividad catiónica de la claudina 16 en el canal paracelular, reduciendo la reabsorción de calcio y magnesio en la AGH.¹⁴

Nefrona distal

La nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN) comprende al túbulo contorneado distal, túbulo conector y ducto colector. En este segmento de la nefrona, se absorbe aproximadamente el 10% del NaCl filtrado, lo que juega un papel importante en la regulación del volumen del fluido extracelular y el control de la presión arterial.¹⁵ El papel funcional de las claudinas en el túbulo contorneado distal se desconoce. Varias claudinas, como las claudinas-3, -4, -7 y -8 se expresan en el túbulo conector y en el ducto colector.¹⁶

1.2.2 TRANSPORTE TRASCELULAR

Las membranas celulares están compuestas de lípidos hidrófobos que repelen el agua y los solutos acuosos. El desplazamiento de solutos y agua a través de las membranas mencionadas es posible gracias a las clases definidas de proteínas integrales de membrana que incluyen conductos, bombas y transportadores. Dichos componentes son los que median los tipos específicos

de actividades de transporte, como serían el activo (bombas), el pasivo (conductos), la difusión facilitada (transportadores) y el transporte secundario activo (cotransportadores).¹⁷ El transporte activo necesita de la energía metabólica generada por la hidrólisis de ATP. Las bombas de transporte activo son ATPasas de transposición de iones, que incluyen a la Na^+/K^+ -ATPasa de distribución amplia, las H^+ -ATPasas y las Ca^{2+} -ATPasas. El transporte activo genera concentraciones desiguales de iones a través de la membrana celular, y tiene capacidad para desplazarlos contra un gradiente químico. La energía potencial almacenada en un gradiente de concentración de un ion como el sodio se utiliza para impulsar al transporte por otros mecanismos (transporte secundario activo).¹⁷

1.2.2.1 *TRANSPORTE DE GLUCOSA*

El riñón modula el nivel de glucosa circulante a través de la reabsorción tubular de la glucosa filtrada por el glomérulo. La reabsorción tubular de glucosa es un proceso constitutivo que depende de las concentraciones de glucosa y no es regulado por insulina. Se sabe que casi toda la glucosa que entra al glomérulo se filtra y posteriormente se reabsorbe a través de los túbulos proximales. Un individuo sano filtra aproximadamente 160-180 g de glucosa diariamente y el 100% se reabsorbe en el sistema tubular renal, de esta forma, la glucosa está ausente en la orina en condiciones normales.

El transporte de la glucosa es llevado a cabo por dos familias de proteínas, funcional y estructuralmente distintas. Las primeras conocidas como SGLTs (sodium/glucose transporters por sus siglas en inglés) y cuyo gen es identificado por el símbolo SLC5A, son cotransportadores de glucosa, galactosa y manosa dependientes de Na^+ (Figura 4) y se encuentran acoplados a la Na^+/K^+ -ATPasa.¹⁸

En la familia de los cotransportadores de Na^+ /Glucosa (SGLT) se conocen 6 isoformas (SGLT1-6), éstas se encuentran en el epitelio intestinal y en el epitelio del túbulo contorneado proximal. Estos transportadores permiten la absorción rápida de esta molécula desde el íleo hacia el sistema portal y además de la reabsorción de la glucosa filtrada en el glomérulo y su absorción en el túbulo proximal para pasar nuevamente al torrente circulatorio.

Estos transportadores aprovechan el transporte del Na^+ a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce los cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática.^{19,20}

El SGLT1 se expresa en los segmentos más distales del túbulo contorneado proximal (S2/S3) donde regula la absorción de la glucosa remanente del segmento S1 (10%). Se ha reportado que SGLT2 se expresa mayoritariamente en el primer segmento del túbulo proximal (S1) en la corteza renal, donde se regula la reabsorción del 90% de la glucosa filtrada.

Los transportadores SGLT2 y SGLT1 poseen diferentes características de transporte. El SGLT2 transporta glucosa y Na^+ con una estequiometría 1:1, mientras que SGLT1 transporta una molécula de glucosa con dos iones de Na^+ (estequiometría 1:2) (Figura 4). El SGLT2 es un transportador que posee baja afinidad y alta capacidad de transporte de glucosa. Posee un valor de K_m (Constante de Michaelis-Menten) de 2 mM para glucosa y 100 μM para Na^+ , mientras que SGLT1 transporta glucosa con alta afinidad y baja capacidad. Los valores de K_m para glucosa son de 0.4 mM y 3 mM para Na^+ . Por lo tanto, SGLT2 en el segmento S1 es adecuado para la reabsorción de altas concentraciones de glucosa, mientras que SGLT1 es adecuado para la reabsorción de las concentraciones remanentes de glucosa no reabsorbida por SGLT2 (Figura 4).

La segunda familia, conocida como GLUTs y cuyo gen es identificado con el símbolo SLC2A, son transportadores de monosacáridos que funcionan por difusión facilitada; de éstos se han identificado 14 isoformas funcionales, GLUT-1 a GLUT-14 y HMIT (cotransportador de H^+ /myo-inositol).²¹ Una vez que la glucosa se encuentra dentro de la célula tubular, ésta se transporta hacia el espacio intersticial por los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 localizados en la membrana basolateral de la célula tubular.

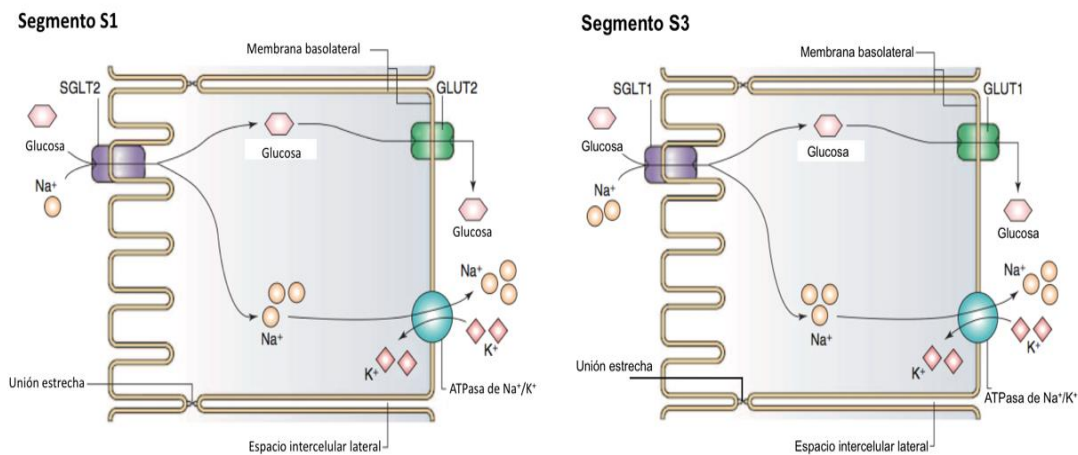


Figura 4. Reabsorción de glucosa en el túbulo proximal por los cotransportadores SGLT1 y SGLT2. Cerca del 90% de la glucosa filtrada se reabsorbe en el segmento S1 del túbulo proximal por SGLT2 localizado en la membrana apical de las células tubulares. La glucosa remanente se reabsorbe en las porciones distales del túbulo proximal, en los segmentos S2/S3 por el cotransportador SGLT1. Una vez que la glucosa se encuentra dentro de la célula proximal, se transporta hacia el compartimento intersticial por los transportadores de glucosa GLUT2 y GLUT1 presentes en la membrana basolateral en los segmentos S1 y S2/S3, respectivamente. Modificado de Clifford, 2011⁹⁵.

1.2.2.2 TRANSPORTE DE AGUA

El riñón interviene en la regulación de numerosas funciones vitales, entre ellas la regulación de la tonicidad del fluido corporal a través del control de la excreción renal de agua.²² El riñón para realizar simultáneamente todas las funciones de homeostasis debe regular de forma independiente la excreción de agua y la excreción de solutos y esto lo realiza gracias a su capacidad para concentrar y diluir la orina. El principal factor responsable de la regulación de la excreción de agua es la vasopresina. Esta hormona actúa a diferentes niveles a lo largo del túbulo renal para controlar la reabsorción de agua.²³

En los últimos años, se han realizado considerables progresos en el clonaje de proteínas que son claves para el proceso de concentración urinario. Esto incluye los canales de agua o aquaporinas, los transportadores de sodio, los transportadores de urea, los receptores de vasopresina y los canales iónicos.²³

Las aquaporinas son una familia de proteínas intrínsecas de membrana que funcionan como canales selectivos de agua y median el transporte de agua a través de la membrana plasmática de las células epiteliales tubulares renales.²⁴

Hasta ahora, se han descrito más de una decena de AQPs. La AQP-1 se encuentra en el glomérulo y en el túbulo contorneado y parte recta del TP, tanto en la membrana luminal como en la peritubular, hasta la parte descendente del asa de Henle. La parte ascendente del asa de Henle no tiene AQPs. Tampoco las tiene la membrana luminal del túbulo contorneado distal. Las membranas apicales del túbulo conector (TCN) y del colector (TC) tienen AQP-2.²⁵ Hay AQP-3 y AQP-4 en las membranas peritubulares de TCN y TC^{26,27} y AQP-6 en las células principales de TCN y TC²⁸ (Figura 5).

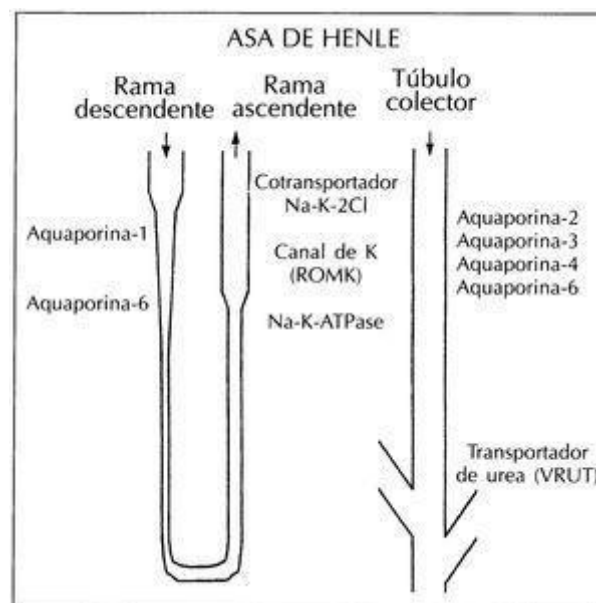


Figura 5. Proteínas de membrana que intervienen en la reabsorción de agua. Tomada de Fernández Llama 2000⁹⁴.

En el caso de la AQP-2, ésta es expresada exclusivamente en membranas apicales en los túbulos distales y colectores renales²⁹ y es la responsable de la permeabilidad apical al agua de este segmento de la nefrona,³⁰ su actividad es dependiente de la hormona antidiurética (ADH); está presente en vesículas intracelulares,³¹ las cuales son inducidas por la ADH a la fusión con la membrana externa.³² Cuando la hormona no está presente, los

segmentos de membrana con AQP2 son reinternalizados, al parecer a través de un mecanismo similar a la reinternalización de receptores. La ADH se libera desde el hipotálamo en respuesta a estímulos como la hipovolemia o la hiperosmolaridad y al determinar la permeabilidad al agua de la nefrona distal, determina el grado de concentración o dilución de la orina,³³ esta hormona ejerce su efecto a través de la fosforilación mediada por proteína cinasa A (PKA), secundaria a la activación de su receptor de membrana acoplado a proteínas G, además de promover la expresión de la proteína. Diversas mutaciones congénitas en el gen que codifica AQP2 y que inducen una alteración en las propiedades fundamentales de la proteína, pueden producir un tipo de diabetes insípida nefrogénica,³⁴ condición caracterizada por poliuria e incapacidad para concentrar la orina, con las consecuentes pérdidas incrementadas de líquidos y deshidratación, las cuales originan polidipsia compensatoria.

1.3 DIABETES MELLITUS

La diabetes es un trastorno metabólico que se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre, asociado a factores genéticos y ambientales, cuya frecuencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La OMS calcula que en el mundo hay más de 422 millones de personas con diabetes, de las cuales, el 90% son diagnosticadas como tipo 2, la cual se caracteriza por una combinación de múltiples factores, como resistencia a la acción de la insulina y/o una inadecuada respuesta compensatoria del páncreas que lleva a un aumento de la glucemia.³⁵ Existen 4 tipos de diabetes según la ADA (Sociedad Americana de la Diabetes):

- Diabetes mellitus tipo 1 conocida comúnmente como diabetes infantil, juvenil o insulino dependiente, donde existe una producción deficiente de insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2 conocida como diabetes no insulino dependiente de la edad adulta, donde la insulina actúa ineficazmente.
- Diabetes gestacional es un estado hiperglucémico durante el embarazo. Debido a la resistencia a la insulina que provocan las hormonas del embarazo.

- Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos).³⁶

1.3.1 COMPLICACIONES DE LA DIABETES

Las complicaciones microvasculares están directamente relacionadas con el estado de hiperglicemia sostenida, aunque aún no está clara esa relación con las complicaciones macrovasculares.³⁷

Las complicaciones macrovasculares de la diabetes pueden ocurrir con niveles de glicemia de 126 mg/dl o menos. La crisis metabólica causante de la aparición de la diabetes puede activarse inclusive sin que se manifieste la enfermedad clínicamente.³⁸

Entre las que se encuentran son:

- 1.- Oftalmológicas
- 2.- Retinopatía
- 3.- Disturbio visual
- 4.- Neuropatía
- 5.- Nefropatía
- 6.- Enfermedad macrovascular
- 7.- Pie diabético
- 8.- Depresión
- 9.- Afecciones reumatológicas
- 10.- Afecciones dermatológicas³⁸

La hiperglucemia tiene un papel importante en el daño de la microvasculatura renal, por lo que la nefropatía diabética es la complicación

más común de esta patología presentando alteraciones morfológicas y funcionales.

1.3.2 NEFROPATÍA DIABÉTICA

La nefropatía diabética (DN) es una de las principales complicaciones asociadas a la diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) y diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), que eventualmente progresa a un estado de enfermedad renal en fase terminal (ERT).

La nefropatía diabética es una de las complicaciones más severas de la diabetes, ya que las personas que la padecen no solo sufren daño renal, también desarrollan problemas cardiovasculares.³⁸

1.3.2.1 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES

La nefropatía diabética es un síndrome caracterizado por la presencia de proteinuria y alteraciones en la tasa de filtración glomerular. Además, se puede encontrar un engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG). En la diabetes, es el primer evento de daño glomerular que ocurre. El engrosamiento de la MBG se induce principalmente por la disminución en la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz extracelular) y un aumento de sus inhibidores.

Secundario al engrosamiento de la MBG, ocurre la expansión mesangial, que es el incremento de proteínas de la matriz extracelular de las células mesangiales (colágeno tipo IV, V y VI, lamininas y fibronectina), seguido de la hipertrofia celular.

Por último, hay una disminución en el número de podocitos, que puede ser consecuencia de diferentes mecanismos como, por ejemplo: Inhabilidad de proliferar y restauración frente a un insulto y desprendimiento de los podocitos de la MBG y de los capilares intraglomerulares.³⁹

Estas alteraciones comprometen el proceso de filtración, que a su vez define la evolución de daño renal. El estrés oxidativo y la formación de productos avanzados de glicosilación (AGE's), juegan un papel determinante en las alteraciones renales inducidas por la diabetes.⁴⁰

1.3.2.2 CLAUDINAS, OCLUDINA Y NEFROPATÍA DIABÉTICA

Se ha reportado que una disminución de las claudinas, tiene como consecuencia una alteración del manejo renal de electrolitos. En un estudio realizado por el grupo de investigación del Dr. Reyes del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, Molina-Jijón y col. 2014⁴¹, observaron en un modelo experimental de diabetes tipo 1, que se caracteriza por una deficiencia absoluta de insulina, observaron que la disminución de la expresión de claudina-5, en el glomérulo, está relacionada con la presencia de proteinuria y una disfunción endotelial. También observaron que una disminución de claudina-2, que se encuentra en el túbulo proximal, está relacionada con un incremento en la excreción de sodio en la orina (natriuresis). De igual forma, observaron una disminución en la expresión de ocludina, que se encuentra a lo largo de todas las células epiteliales tubulares renales. Esta disminución de la expresión de proteínas de una manera dependiente del estrés oxidante es inducido por el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y la activación de la NADPH oxidasa.⁴¹

Encarnación García, en su tesis de maestría, encontró que la diabetes induce la disminución en la expresión de Claudina-16, que se encuentra en la asa ascendente gruesa de Henle, y está relacionada con un incremento en la excreción urinaria de calcio (calciuria) y magnesio (magnesuria).⁴²

1.3.2.3 TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y NEFROPATÍA DIABÉTICA

Se ha reportado que un aumento en la expresión de los transportadores de glucosa, tiene como consecuencia un aumento del estrés oxidativo. Molina-Jijón y colaboradores (2014), observaron en un modelo experimental de diabetes tipo 1, que se caracteriza por una deficiencia absoluta de insulina, se observó un aumento significativo en la expresión de SGLT2, SGLT1 y GLUT2,⁴¹ coincidiendo con lo reportado previamente.⁴³

El aumento de la expresión de los transportadores de glucosa GLUTs y SGLTs favorece un aumento en la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal, lo que promueve el estrés oxidante vía la activación de PKC β 2. De manera interesante, encontraron que los segmentos de la nefrona en los cuales

la diabetes disminuyó la expresión de las proteínas de la UE coincide con los mismos segmentos en los cuales la diabetes indujo estrés oxidante, ya que es en estos segmentos de la nefrona donde se reabsorbe la mayor cantidad de glucosa filtrada.⁴⁴

1.3.2.4 ACUAPORINAS Y NEFROPATÍA DIABÉTICA

La acuaporina-2 (AQP2) se expresa en la membrana plasmática apical de las células principales (PC) del túbulo colector (TD) durante la estimulación con hormona antidiurética (ADH).⁴⁵ Esta acuaporina es muy importante en la regulación del equilibrio de líquidos en el riñón. Rossi y col. encontraron en muestras de orina de pacientes con nefropatía diabética, un aumento en la excreción de AQP-2.⁴⁶ Los cambios que hemos encontrado en nuestro laboratorio en la expresión de los transportadores de glucosa, las proteínas de la unión estrecha, y lo reportado por AQP-2 llevan a pensar que podrían ser marcadores de progresión a nefropatía diabética.

1.4 BIOMARCADOR

Un marcador biológico o biomarcador es aquella sustancia que permite medir de forma fiable un estado de salud o una enfermedad. Se puede usar para detectar una enfermedad, un cambio fisiológico o una respuesta a algún tratamiento farmacológico.⁴⁷

Un biomarcador ideal debe cumplir con ciertas características como ser: sensible, específico, precoz, no invasivo, predictivo, indicativo de lugar de la lesión, pronóstico y económico.

1.4.1 BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL

Existen biomarcadores de daño renal bien definidos y bien estudiados, sin embargo, ninguno de ellos predice las consecuencias renales por la hiperglicemia, por lo que en este trabajo se pretende encontrar un marcador urinario temprano que permita predecir el riesgo para desarrollar nefropatía diabética una vez que la diabetes es diagnosticada. Algunos biomarcadores de daño renal que ya se conocen son los siguientes: albuminuria, KIM-1 (Kidney injury molecule-1), β 2-microglobulina, THP (Tamm Horsfall protein), NGAL

(Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), a continuación, se describen cada uno de ellos.

1.4.1.1 ALBUMINURIA

La proteinuria glomerular es la más común⁴⁸ y resulta por un daño en el glomérulo que causa un aumento en la permeabilidad de los capilares glomerulares a las proteínas, predominantemente a la albúmina.⁴⁹ En las enfermedades glomerulares, la lesión de la membrana basal glomerular causa proteinuria debido a la pérdida de su carga negativa, así como por un aumento en el número de los poros no selectivos más grandes. También se acompañan de alteración y pérdida de los pedicelos de los podocitos, parece que el aumento del escape de proteínas ocurre principalmente en los sitios de esta alteración epitelial. Debe sospecharse una proteinuria glomerular cuando la excreción de proteínas, en su mayoría albúmina, es mayor de un gramo en 24 horas y puede casi asegurarse este origen cuando los valores son mayores de 3 g. Por lo general, este tipo de proteinuria severa se asocia con un riesgo elevado de desarrollar insuficiencia renal.⁵⁰

La medición cuantitativa de proteínas en orina de 24 horas es la prueba de oro para evaluar una proteinuria. Debe iniciarse la recolección de la orina a una hora específica, descartando inicialmente todo el contenido vesical y recolectando todas las orinas posteriores durante un ciclo de 24 horas.⁵¹ Una proteinuria por encima de 150 mg en 24 horas o de 4 mg/m²/hora, debe ser considerada como patológica. Este mismo estudio puede también realizarse para evaluar la cantidad de albúmina excretada por un individuo en 24 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Medición de proteínas y albúmina en orina de 24 horas

Excreción de proteínas	Valor (mg/24horas)
<i>Valor normal en adultos</i>	< 150
<i>Proteinuria</i>	≥ 150
<i>Proteinuria en rango nefrótico</i>	> 3.500
Excreción de albúmina	Valor (mg/24horas)
<i>Valores normales</i>	2 - 30
<i>Microalbuminuria</i>	30 - 300
<i>Macroalbuminuria</i>	> 300

1.4.1.2 KIM-1

La molécula de lesión renal, (KIM-1 por sus siglas en inglés) es una proteína transmembranal y su expresión no se puede medir en las células del túbulo proximal normal, pero está marcadamente aumentada con lesión/desdiferenciación.⁵² Se ha sugerido que su presencia en la orina es muy específica para la lesión renal y puede servir como un biomarcador útil para la lesión renal de los túbulos proximales que facilita el diagnóstico precoz de muchas enfermedades renales.⁵³ El daño tubular renal, como lo demuestra el aumento de los niveles de KIM-1 en orina, es evidente incluso antes del desarrollo de la diabetes y la enfermedad renal.⁵⁴ Los niveles urinarios de KIM-1 se encontraron significativamente elevados en pacientes diabéticos con microalbuminuria, en comparación con los diabéticos con normoalbuminuria y controles sanos no diabéticos, lo que demuestra la existencia de daño tubular diabético en la etapa temprana de DN.^{55,56}

1.4.1.3 β 2-MICROGLOBULINA

La proteinuria tubular se presenta cuando hay lesiones agudas o crónicas que comprometen la región túbulo intersticial. Ocurre como resultado de una alteración en la reabsorción de proteínas de bajo peso molecular que normalmente son filtradas.⁵⁷ Las sustancias de bajo peso molecular tales como las β 2-microglobulinas, aminoácidos y cadenas livianas de inmunoglobulinas que tienen un peso molecular de alrededor de 25.000 daltons (la albúmina pesa 69.000), estas proteínas pequeñas son fácilmente filtradas a través de la membrana basal y completamente reabsorbidas por las células del túbulo

proximal.⁴⁹ Una gran cantidad de enfermedades que pueden lesionar los túbulos y el intersticio pueden alterar la reabsorción de esas moléculas. Las alteraciones que conllevan a proteinuria tubular están asociadas comúnmente con defectos en la función tubular proximal, como glucosuria, aminoaciduria, fosfaturia y uricosuria (síndrome de Fanconi).⁵⁸

1.4.1.4 *NGAL (Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos)*

La lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL, por sus siglas en inglés) es una pequeña proteína de 25 kDa que pertenece a la familia de proteínas lipocalinas liberada de los neutrófilos y muchos tipos de células epiteliales, incluidas las células tubulares renales. Es representativa de la masa tubular en funcionamiento y se produce como respuesta a una lesión tubular.⁵⁹ La NGAL se filtra libremente y se reabsorbe a nivel tubular proximal por endocitosis. La lesión del epitelio tubular proximal altera su reabsorción. Por otra parte, en condiciones de daño renal, la expresión de NGAL en el epitelio tubular distal aumenta, particularmente en la rama ascendente del asa de Henle y en el túbulo colector. La concentración urinaria de NGAL aumenta en condiciones de daño tubular, tanto por una menor reabsorción como por una mayor liberación a la luz tubular, indicando daño tubular tanto proximal como distal.⁶⁰ Se encontró que los niveles de NGAL en la orina estaban marcadamente elevados en los pacientes con diabetes en comparación con los sujetos control no diabéticos.⁶¹⁻⁶³

Los niveles elevados de NGAL urinaria también son predictivos de la disminución de la TFG en pacientes diabéticos tipo 2 con micro o macroalbuminuria.⁶⁴ Otro estudio también encontró que las concentraciones urinarias de NGAL se asociaron con la progresión a la ERT y la muerte en la diabetes tipo 2, incluso después del ajuste para la albuminuria basal y la TFG, lo que indica la importancia potencial de la NGAL urinaria para la identificación de las personas con mayor probabilidad de progresar a la ERT o a la muerte prematura.⁶⁵

1.4.1.5 *THP (Tamm Horsfall protein)*

La glicoproteína de Tamm-Horsfall (THP) o uromodulina, es la proteína más abundante de la vía urinaria, se excreta en una cantidad de 50-100

miligramos por día. La proteína de THP es sintetizada en el riñón por una glucosilfosfatidilinositol (GPI), anclada a glicoproteínas de membrana, en el segmento proximal del asa de Henle,⁶⁶ la glicoproteína es liberada por una proteasa específica. La estructura primaria de la uromodulina es de 616 aminoácidos, tiene un peso molecular de 85- 90 kDa.⁶⁷ Esta proteína se ha estudiado para diferenciar el daño renal a nivel glomerular, a nivel del túbulo proximal, se ha encontrado en pacientes con DMT1 y DMT2 un aumento en la excreción de esta proteína en la orina.⁶⁸ Varios informes están disponibles sobre el papel del THP en pacientes con diabetes mellitus. Todos estos estudios han comparado las tasas de excreción urinaria de THP en varios grupos diabéticos versus controles.

La nefropatía diabética (DN) es una enfermedad multifactorial que involucra diferentes procesos moleculares patológicos y estructura histopatológica. Una combinación de biomarcadores tubulointersticiales renales que podrían identificar diferentes procesos patológicos de lesión renal puede proporcionar una imagen más realista del resultado de esta patología en un paciente⁶⁹. Los nuevos biomarcadores de los procesos que inducen cambios túbulointersticiales podrían, en última instancia, ser predictores adecuados de la progresión renal y el pronóstico en la DMT2.

2 JUSTIFICACIÓN

La patogénesis renal en la diabetes es compleja y en la actualidad no existe un marcador urinario temprano que permita predecir el pronóstico para desarrollar nefropatía diabética una vez que la diabetes es diagnosticada. En este trabajo se quiere explorar un marcador de aparición temprana en un modelo con nefropatía diabética temprana por medio del análisis en el curso temporal de la excreción urinaria de rata Wistar diabética.

3 HIPÓTESIS

En el modelo experimental de DMT1, se alterará la expresión renal de proteínas como claudina- 5, claudina- 2, ocludina, SGLT-1, SGLT-2, AQP-2 y claudina-16 como potenciales marcadores urinarios de diagnóstico temprano de daño renal secundario a la hiperglicemia.

4 OBJETIVO

4.1 GENERAL

Determinar en un curso temporal la presencia de marcadores de daño renal temprano en orina en ratas con DMT1.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un modelo experimental de DMT1
2. Evaluar la función renal en un modelo experimental de DMT1.
3. Evaluar la presencia de marcadores urinarios de daño que confirmen la nefropatía diabética temprana (KIM-1, β 2-microglobulina, THP, NGAL y albuminuria) por Wb.
4. Evaluar en un curso temporal la presencia de proteínas urinarias (Cln-5, Cln-2, Ocludina, SGLT-1, SGLT-2, AQP-2 y Cln-16) por Wb.
5. Correlacionar la excreción de proteínas urinarias de interés con los marcadores de daño renal.

5 MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 MATERIALES

- Centrífuga No. Catálogo 541712 Eppendorf
- Centrífuga G5-GR Beckmank
- Potenciómetro No. 41 Beckmank
- Agitador No. Catálogo 65904 MagMix
- Vortex M16715 Barstead Thermolyne International
- Jaula metabólica No. 3700M022 TECNIPLAST
- Glucómetro One Touch Ultra® (Milpitas, CA, USA)
- UVP Bioluminescence Systems, Cambridge, Reino Unido

5.2 REACTIVOS

5.2.1 INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL

- Estreptozotocina Sigma- Aldrich (St. Louis, MO. USA)
- Citrato de sodio No. Catálogo 3646 J.T. Baker (Center Valley, PA. USA)

5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

- DC Protein Assay Reagent S No. Catálogo #500-0115 BIO-RAD (Ciudad de México, México)
- DC Protein Assay Reagent A No. Catálogo #500-0113 BIO-RAD (Ciudad de México, México)
- DC Protein Assay Reagent B No. Catálogo #500-0114 BIO-RAD (Ciudad de México, México)
- Albuminuria 1 mg/mL

5.2.3 CUANTIFICACIÓN DE CREATININA POR EL MÉTODO DE JAFFÉ.

- Solución estándar de creatinina 100 µg/mL
- Solución de NaOH 0.75 N
- Solución de ác. pícrico 0.04 M
- Solución de ác. tricloroacético (TCA) al 35 %

6 MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se aprobaron por la Unidad Institucional de Producción y Experimentación con Animales de Laboratorio (UPEAL, protocolo # 0178-16). Se emplearon ratas Wistar macho con un peso corporal entre 200-250 g. Las ratas se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12/12h) a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura ambiente y $50 \pm 5\%$ de humedad ambiental. Los animales se mantuvieron con acceso libre al agua y alimento.

6.2 MODELO DE DIABETES TIPO 1

La diabetes se indujo mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de una dosis única de estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg de peso corporal) diluida en amortiguador de citratos 0.01 M pH 6.0. Las ratas controles (no diabéticas) se inyectaron vía intraperitoneal (i.p.) con amortiguador de citratos 0.01 M pH 6.0. Tres días después de la administración de STZ, se midió el nivel de glucemia con un glucómetro de la marca OneTouch Ultra® (Milpitas, CA, USA), las ratas se consideraron diabéticas cuando los niveles de glucemia superaron 200 mg/dL.

6.3 GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales se dividieron fundamentalmente en cuatro grupos:

- 1) Control: sólo vehículo (amortiguador de citratos 0.01 M pH 6.0), n=6
- 2) Diabéticas semana 1, después de la inducción con STZ, n=6
- 3) Diabéticas semana 2, después de la inducción con STZ, n=6
- 4) Diabéticas semana 3, después de la inducción con STZ, n=6

6.4 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Se monitoreó la glucemia y el consumo de agua en condiciones previas a la administración de STZ y cada 7 días después de la inducción de la diabetes. Para medir el consumo de agua y orina se instalaron las ratas en

jaulas metabólicas. Estas jaulas están meticulosamente construidas para separar de forma efectiva las heces y la orina en tubos externos a la jaula. La separación es inmediata y completa, sin contaminación de la orina, proporcionando muestras fiables. Una jaula metabólica comercial típica está constituida de la siguiente manera: el animal se mantiene en un habitáculo de policarbonato transparente y resistente a las mordeduras con respiraderos removibles. Dispone de un receptáculo para la comida fuera de la jaula que contiene un cajón con alimento, el cual puede abrirse por fuera, facilitando su llenado con papillas, líquidos o polvos, sin molestar al animal.⁷⁰ Esta disposición evita que la orina se contamine con el alimento. Las pequeñas dimensiones del habitáculo externo disuaden al animal de hacer su nido o dormir en él. Las jaulas tienen una botella de agua y un tubo para la recolección de derrames, diseñado para evitar que el agua entre en la jaula y contamine la orina. Este tubo está calibrado, lo que permite al investigador medir la cantidad real de agua que consume el animal. Los tubos para la recolección de orina y heces están hechos de polimetilpenteno impermeable, y permiten a las heces y la orina fluir dentro de tubos de recolección diferenciados (Figura 6).

Para medir el consumo de agua, se añadieron 250 mL de agua purificada y se cuantificó la cantidad remanente, 24 h después para determinar la cantidad consumida por día. Para recolectar las muestras urinarias de 24 h, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas 24 h previas al sacrificio y se midió el volumen urinario final. Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se recolectó la sangre antes del sacrificio por punción cardíaca, la sangre se centrifugó (1200 x g durante 10 min) para obtener el suero.

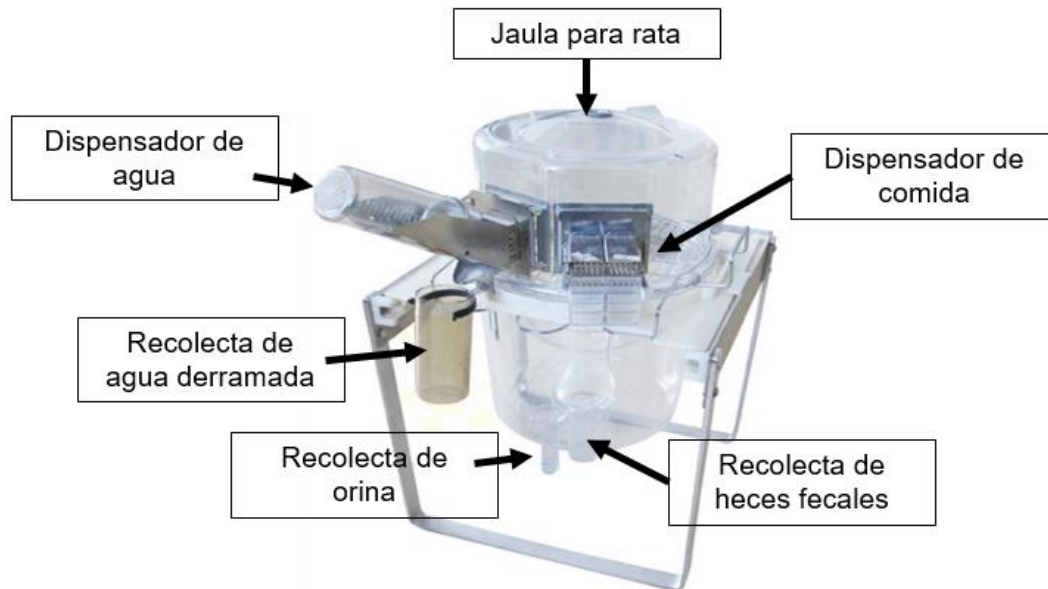


Figura 6. Jaula metabólica. Está constituida por un recipiente para rata, un dispensador de alimento, una botella de agua, y recipientes de recolecta de agua remanente, orina y heces por separado y sin contaminación de ninguno de ellos, modificada de Biji et al., 2004⁷⁰.

6.4.1 FUNCIÓN RENAL

Para evaluar la función renal se midió la proteinuria y la depuración de creatinina.

6.4.1.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS URINARIAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.

En una caja multipozos, se depositaron 10 μ L de muestra de orina de cada grupo (dilución 1:10), más 25 μ L del reactivo A+S y 200 μ L del reactivo B. Para el desarrollo de color, las muestras se incubaron por 15 minutos, al resguardo de la luz. La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose, CA, USA) a 650-750 nm modificado de Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

Debido a que las ratas diabéticas presentan poliuria, la proteinuria se corrigió por la cantidad urinaria de creatinina ya que esto podría sobreestimar la proteinuria en el grupo diabético. Por esta razón, se calculó el cociente proteinuria/creatinina y ambos parámetros se expresaron en unidades de mg/mL.

6.4.1.2 CUANTIFICACIÓN DE CREATININA POR MÉTODO DE JAFFÉ⁷¹

6.4.1.2.1 CUANTIFICACIÓN DE CREATININA EN SUERO

Preparación de muestras de suero (precipitación de proteínas). En un tubo Eppendorf de 0.6 mL, se adicionaron 20 µL de TCA al 35%, se agitaron y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para el desarrollo de color, se ocupó una caja multipozos y se adicionaron 125 µL de muestra (sobrenadante), 520 µL de ác. pícrico y 50 µL de NaOH. Se dejó reposar 20 minutos (evitando la exposición a la luz). La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose, CA, USA) a 520 nm.

6.4.1.2.2 CUANTIFICACIÓN DE CREATININA EN ORINA

En una caja multipozos, se depositaron 250 µL de muestra de orina de cada grupo (dilución 1:100) y se adicionaron 100 µL de ác. pícrico y 100 µL de NaOH. Para el desarrollo del color, las muestras se incubaron por 20 minutos, al resguardo de la luz. La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose, CA, USA) a 520 nm.

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{[\text{creatinina}]_{\text{en orina}}}{[\text{creatinina}]_{\text{en suero}}} \times \text{flujo urinario en 24 h} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)$$

La depuración de creatinina se corrigió con el peso corporal, ya que las ratas diabéticas presentaron un menor peso corporal comparado con el grupo control, expresándose en mL/min/100 g.p.c.

6.5 WESTERN BLOT

El análisis por Wb se realizó como se ha descrito previamente⁷². Las muestras de orina de los grupos control e inducidas con STZ fueron preparadas en una dilución de 1:10 en Laemmli 10X con urea (5 M) y se desnaturalizaron por calentamiento durante 12 min. Las orinas (25µL) se colocaron en geles de SDS-PAGE al 12%. En paralelo con las muestras, se cargaron marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) para la identificación correcta de las proteínas a analizar. Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). La unión a proteínas no específica se bloqueó por incubación con caseína 3X (VECTOR, sp-5020; Burlingame, CA, USA) durante 1 h, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C

con los anticuerpos primarios apropiados contra claudina-2, -5, -16, SGLT1, SGLT2, ocludina, AQP-2, KIM-1, β 2-microglobulina, THP y NGAL mencionados en la tabla 2. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 10 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios mencionados en la tabla 2. Después de tres lavados (con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 10 min), las membranas se revelaron con el reactivo de detección Luminata™ Forte Western HRP substrate (Copyright 2010, Millipore Corporation. U.S.A). Se detectó quimioluminiscencia en un sistema de imágenes EC3 (UVP BioImaging Systems, Cambridge, Reino Unido). La densidad de la banda de proteínas se cuantificó mediante densitometría con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). La excreción urinaria de claudina-2, -5, -16, SGLT1, SGLT2, ocludina, AQP-2, Albuminuria, KIM-1, β 2-microglobulina, THP y NGAL se normalizó con la creatinina urinaria y se expresó como unidades arbitrarias / uCr (mg de creatinina en orina), como se ha descrito previamente⁴⁶.

Los reactivos empleados se adquirieron en su mayoría de Sigma-Aldrich Co., a menos que se especifique la compañía. Se muestra la lista de anticuerpos, así como la dilución que se usó en los ensayos de Western blot.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para Western blot (Wb)

ANTICUEPO (ESPECIE)	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	CATÁLOGO
<i>claudina-2 (conejo)</i>	1:200	Invitrogen	32-5600
<i>claudina-5 (ratón)</i>	1:200	Life Tech	35-2500
<i>claudina 16 (conejo)</i>	1:500	ABCAM	ab106504
<i>SGLT1 (conejo)</i>	1:200	Millipore Corp.	07-1417
<i>SGLT2 (cabra)</i>	1:200	Santa Cruz Biotech.	sc-47403
<i>occludina (conejo)</i>	1:500	invitrogen	71-1500
<i>AQP-2 (ratón)</i>	1:200	Santa Cruz Biotech.	Sc-9882
<i>β2-microglobulina (ratón)</i>	1:200	Santa Cruz Biotech	Sc-13565
<i>NGAL (ratón)</i>	1:500	Santa Cruz Biotech.	Sc-515876
<i>KIM-1 (cabra)</i>	1:200	R&D Systems	AF3689
<i>THP (cabra)</i>	1:200	Santa Cruz Biotech	Sc-271022
<i>peróxidasa-conjugado (ratón)</i>	1:10000	Invitrogen	62-6520
<i>peróxidasa-conjugado (cabra)</i>	1:10000	Santa Cruz Biotech.	sc-2020
<i>Peróxidasa-conjugado(conejo)</i>	1:10000	Invitrogen	65-6120

KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1); SGLT (cotransportador de sodio-glucosa); AQP (Acuaporina); NGAL (Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), THP (Tamm Horsfall protein)

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre los promedios se analizaron mediante la *t* de student (para comparar entre dos grupos) o el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de Bonferroni (para comparar 3 grupos experimentales o más con respecto al control) o análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguida de la prueba de Tukey (para comparar el curso temporal) y se consideró estadísticamente significativa a partir de un valor de $p < 0.05$.

7 RESULTADOS

7.1 MODELO DE DIABETES TIPO 1 (DBT1)

Inducción de la diabetes experimental con estreptozotocina

Para conocer sí la inducción de diabetes experimental en ratas se realizó exitosamente, se analizaron los índices glucémicos de los grupos experimentales y del grupo control. Se observó que los grupos diabéticos de 1, 2 y 3 semanas presentaron índices hiperglucémicos (387.25 ± 96.61 , 343 ± 48.01 y 459.8 ± 78.72 mg/dL, respectivamente) en comparación con el grupo control (102.33 ± 7.83 mg/dL) a partir del día 3, después de la inyección con STZ (**Figura 7A**). También se observó una menor ganancia de peso corporal en las ratas diabéticas de 1,2 y 3 semanas (287.417 ± 12.70 , 306.5 ± 15.07 , 283 ± 22.605 g peso corporal, respectivamente) en comparación con las ratas controles (409.83 ± 25.94 g de peso corporal) (**Figura 7B**).

De igual forma se observó un aumento en el consumo de agua, para el grupo control se tuvo una ingesta de agua de 36 ± 12.57 mL/24 h y para los grupos diabéticos de 1, 2 y 3 semanas presentaron un valor de 130 ± 12.57 , 36 ± 12.57 , 36 ± 12.57 mL/24 h, respectivamente (**Figura 7C**).

Se midió el volumen urinario excretado en las ratas controles y las ratas diabéticas, las ratas controles presentaron una excreción de 32 ± 8.29 mL/24h, y las ratas diabéticas de 1,2 y 3 semanas presentaron un volumen urinario de 86.83 ± 18.88 , 66 ± 7.92 , 97.17 ± 2.65 mL/24h, respectivamente (**Figura 7D**).

En los primeros estadios de la nefropatía diabética, el riñón tiende a aumentar su tamaño, por lo que una medida indirecta de este dato se obtiene al comparar el peso renal con respecto al peso corporal. Este cociente es significativamente más alto en las ratas diabéticas de 1, 2 y 3 semanas (0.0048 ± 0.000227 , 0.0050 ± 0.000261 , 0.004451 ± 0.0006325 g peso riñón /g peso corporal, respectivamente) en comparación con las ratas controles (0.003393 ± 0.000237 g peso riñón /g peso corporal) en la masa renal (**Figura 7E**).

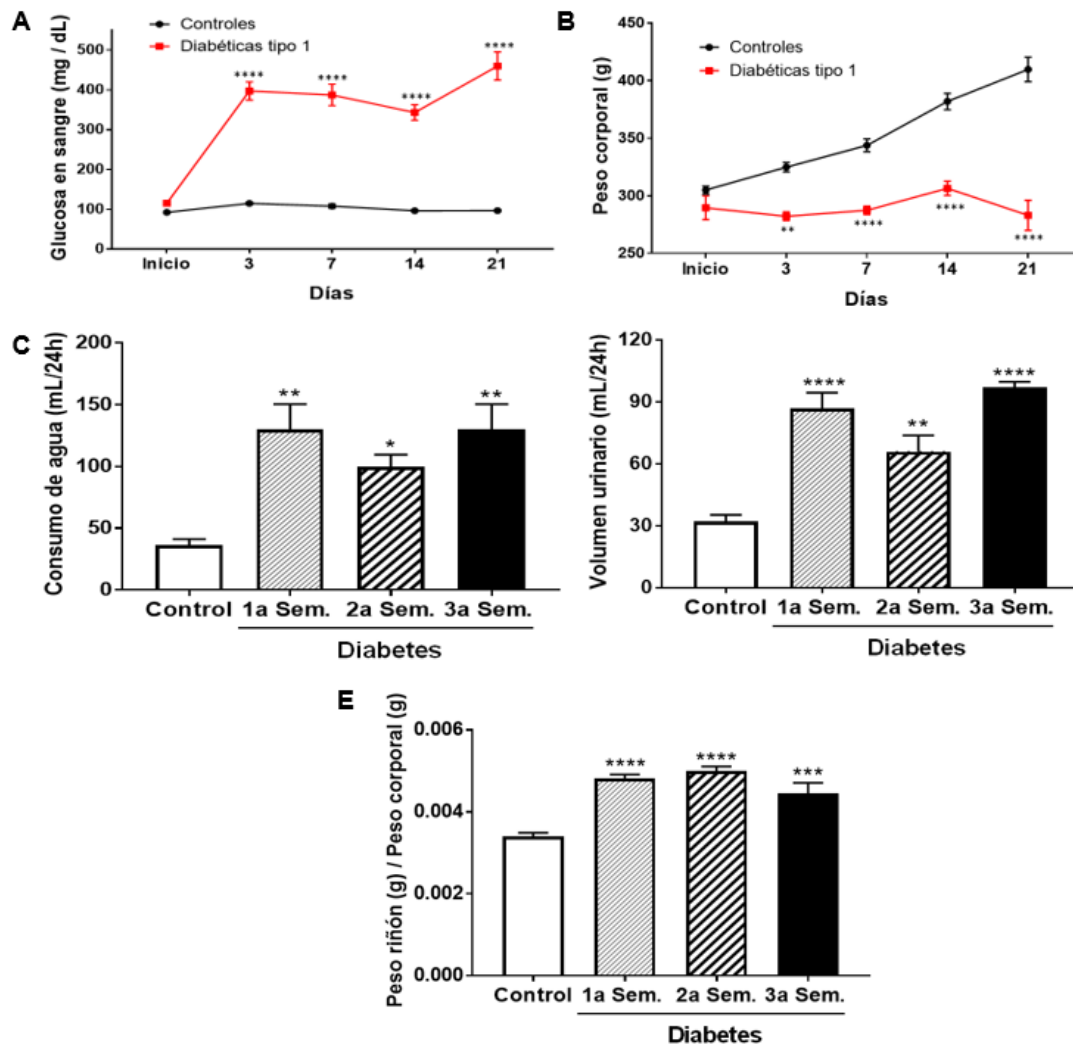


Figura 7. La administración de estreptozotocina (STZ) induce las características clínicas y metabólicas de la diabetes. La inducción de la diabetes se confirmó por: A) pérdida de peso, B) hiperglucemia, C) polidipsia, D) poliuria y E) aumento en la masa renal. Se muestra el promedio \pm EEM ($n=6$). ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey y ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Bonferroni, **** $p<0.0001$, *** $p<0.005$ ** $p<0.002$ y * $p<0.01$ vs control.

7.2 LA DIABETES INDUCE PROTEINURIA Y ALTERACIONES EN LA FILTRACIÓN RENAL

Para evaluar la función renal en la primera, segunda y tercera semana de diabetes, se realizaron las pruebas de depuración de creatinina y proteinuria.

En cuanto a la proteinuria, se encontró un aumento desde la 1ª semana, 2ª y 3ª semana de diabetes con valores de 7.732 ± 0.1613 , 7.815 ± 0.1693 , 9.53 ± 0.6507 proteinuria/creatinuria, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 5.116 ± 0.3496 proteinuria/creatinuria (**Figura 8A**).

La depuración de creatinina también tuvo diferencia significativa desde la 1ª, 2ª y 3ª semana de diabetes con valores de 1.333 ± 0.6258 , 1.414 ± 0.3406 , 3.393 ± 0.7192 mL/min/100 g.p.c., respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 0.525 ± 0.2595 mL/min/100 g.p.c (**Figura 8B**).

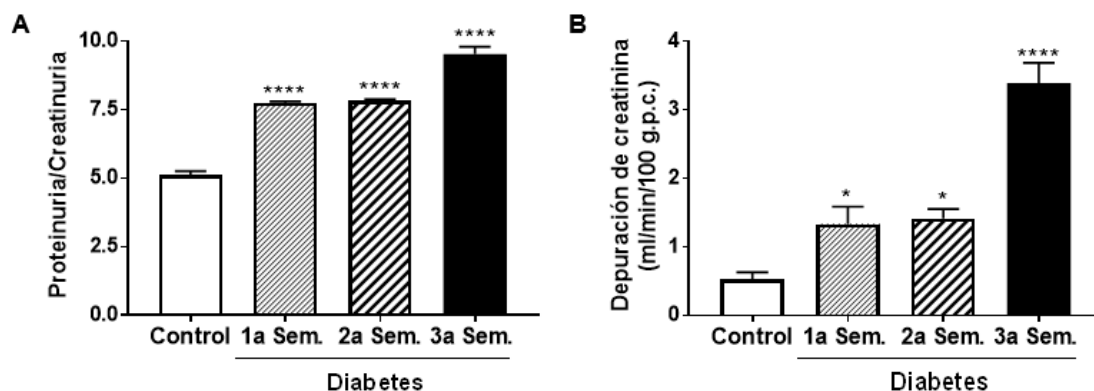


Figura 8. La diabetes induce disfunción renal. La disfunción renal se caracterizó por aumento en: a) la proteinuria b) el cociente proteinuria/creatininuria, c) la depuración de creatinina. Se muestra el promedio \pm EEM (n=6). Anova de 1 vía, Bonferroni, *p<0.05 ****p<0.0001 vs control.

7.3 MARCADORES QUE CONFIRMAN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA

Para validar que en el modelo de diabetes utilizado hubo daño renal se confirmó con marcadores de daño renal ya conocidos, estudiados y bien definidos. Uno de ellos es la albuminuria, y se determinó usando una SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie, se utilizó como control positivo BSA (Albúmina bovina sérica) donde se observa un aumento significativo con un valor de $p < 0.0001$ desde la primera semana con un valor de 154.4 ± 10.89 unidades arbitrarias/ uCr (mg de creatinina urinaria) con respecto al control 92.32 ± 10.32 unidades arbitrarias/ uCr, y esto se fue incrementando conforme aumenta la enfermedad (**Figura 9A**).

Otro marcador que confirma el daño es la β -2-microglobulina, es un marcador sensible de lesión tubular renal temprana. Se encontró que la excreción urinaria de β -2-microglobulina aumentó en las ratas diabéticas desde la 2ª y 3ª semana con un valor de 863.8 ± 107.4 y 999.6 ± 117 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 628.6 ± 137.9 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 9B**).

Se analizó un marcador que sólo se induce masivamente cuando hay un daño renal, KIM-1. Se observa que es nula su excreción en las ratas controles, y desde la primera semana se detectó un aumento en la excreción de este marcador con un valor de 134.6 ± 9.96 unidades arbitrarias/uCr, y lleva a un aumento en la 2ª semana con un valor de 528.7 ± 103.1 unidades arbitrarias/uCr y disminuye drásticamente en la 3ª semana con un valor de 183.1 ± 19.21 unidades arbitrarias/uCr, siendo significativo con respecto al control el cual no fue detectada la excreción de KIM-1 (**Figura 9C**).

La THP es una proteína muy abundante en la orina y ésta aumenta cuando hay un daño renal. Se puede observar que aumenta su excreción en la tercera semana con un valor de 348.9 ± 33.77 unidades arbitrarias/uCr, siendo significativo con respecto al control con un valor de 212.5 ± 44.39 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 9D**).

Un marcador interesante y que es sensible al daño tubular renal en etapas tempranas de la DN es NGAL. Se puede observar un aumentó en su

excreción desde la 2ª y 3ª semana con un valor de 863.8 ± 107.4 y 999.6 ± 117 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 628.6 ± 137.9 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 9E**).

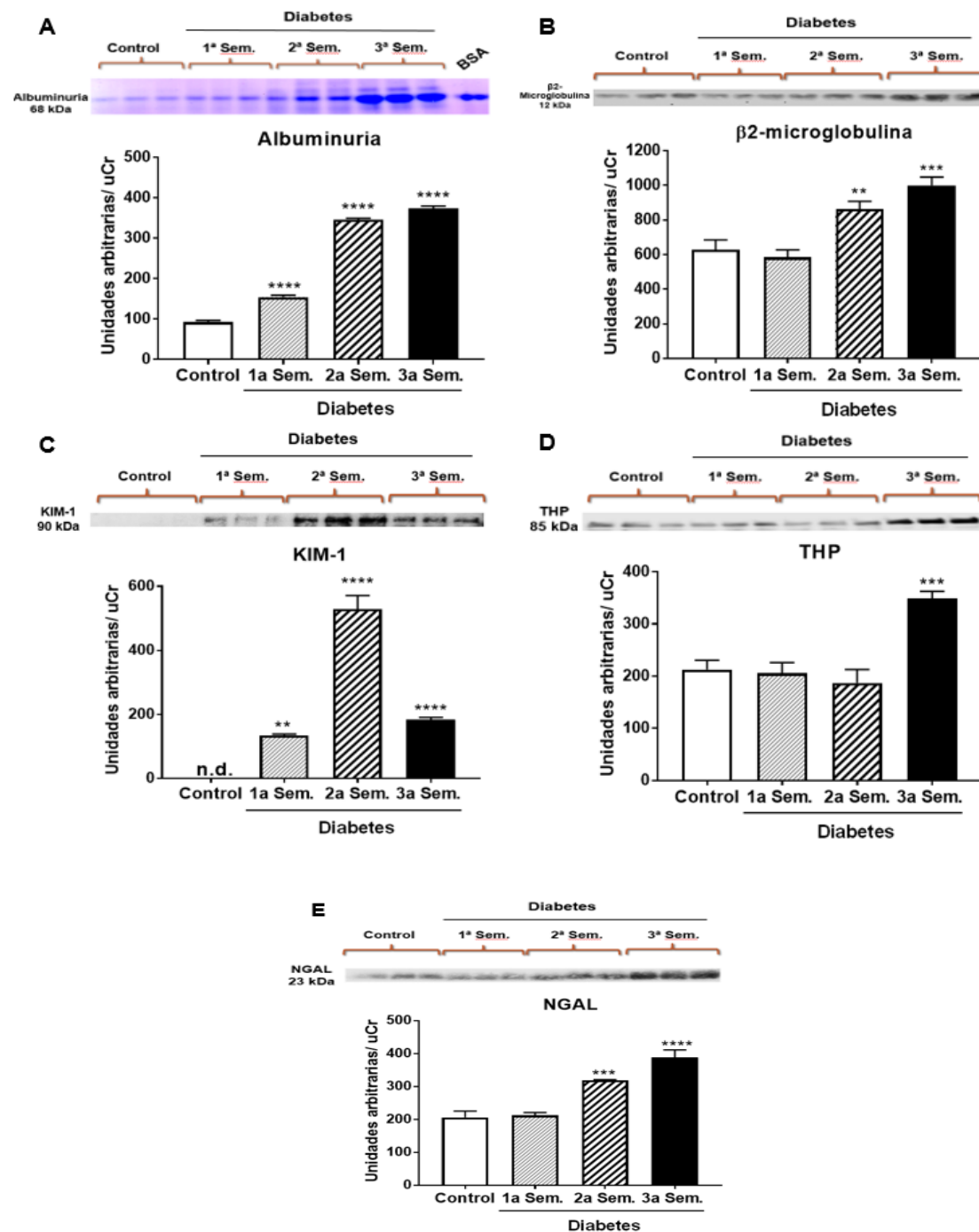


Figura 9. Evaluación de marcadores urinarios de daño renal en la nefropatía diabética temprana: A) Albuminuria B) β2-microglobulina, C) KIM-1, D) THP y E) NGAL. Se muestra el promedio ± EEM. (n=6). Anova de 1 vía, Tukey, **p<0.01 ***P<0.001 ****p<0.0001 vs control

7.4 PROTEÍNAS RENALES COMO POSIBLES MARCADORES DE NEFROPATÍA DIABÉTICA

En este estudio, se evaluaron proteínas por su potencial diagnóstico para detectar DN en etapa temprana. El hallazgo principal de este estudio fue que los niveles urinarios de claudina-5 (Cln-5), claudina-2 (Cln-2), ocludina, cotransportadores de Na⁺/Glucosa (SGLT-2, SGLT-1), claudina-16 (Cln-16) y acuaporina-2 (AQP-2), son posibles biomarcadores valiosos que se podrían proponer para el diagnóstico temprano de DN en pacientes con diabetes tipo 2.

Se encontró un aumento en la excreción de Cln-5 en la 3^a semana con diabetes con un valor de 699.4 ± 196.7 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 188.8 ± 113.8 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 10A**).

También se encontró un aumento en la excreción de Ocludina desde la 1^a, 2^a y 3^a semana con diabetes siendo creciente este fenómeno en la excreción de esta proteína con valores de 452 ± 62.6 , 659.8 ± 21.0 y 892.9 ± 133.5 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 5.964 ± 1.45 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 10B**).

Otra proteína interesante es Cln-2, se puede observar que se excreta en la 3^a semana con un valor de 614.7 ± 16.4 unidades arbitrarias/uCr, siendo significativo con respecto al control con un valor de 415.8 ± 67.2 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 10C**).

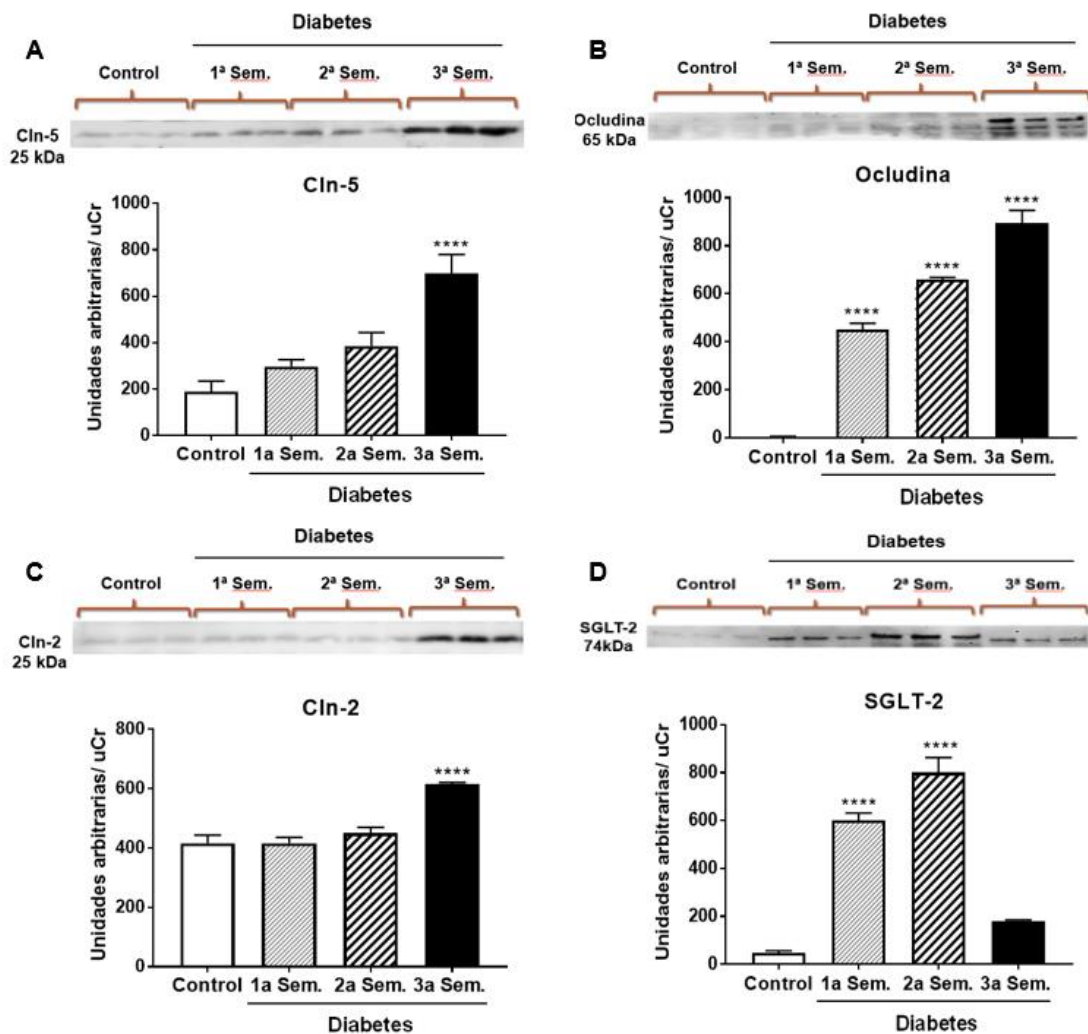
En cuanto a los SGLT-2 y SGLT-1, se puede observar que SGLT-2 presenta su excreción desde la 1^a y 2^a semana 600.2 ± 77.2 y 801.4 ± 151.1 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 5.964 ± 1.45 unidades arbitrarias/uCr, y es interesante que en la 3^a semana disminuye su excreción con un valor de 180.6 ± 11 unidades arbitrarias/uCr, siendo este no significativo con respecto al control (**Figura 10D**).

En el caso de SGLT-1 se puede observar su excreción más tardía hasta la 3^a semana en comparación con SGLT-2, con un valor de 219.8 ± 29.4

unidades arbitrarias/uCr, siendo significativo con respecto al control (**Figura 10E**).

Se encontró un aumento creciente de Cln-16 en orina desde la 1^a, 2^a y 3^a semana con valores de 182.1 ± 37.6 , 315.1 ± 6.2 y 342.9 ± 29.2 unidades arbitrarias/uCr, respectivamente, siendo significativo con respecto al control con un valor de 85.8 ± 24.8 unidades arbitrarias/uCr (**Figura 10F**).

Por último, la AQP-2, tuvo una excreción más tardía, en la 3^a semana con un valor de 511.6 ± 16.1 unidades arbitrarias/uCr, siendo significativo con respecto al control. Algo interesante es que no se observó ninguna excreción de AQP-2 en el grupo control y en la 1^a y 2^a semana con diabetes (**Figura 10G**).



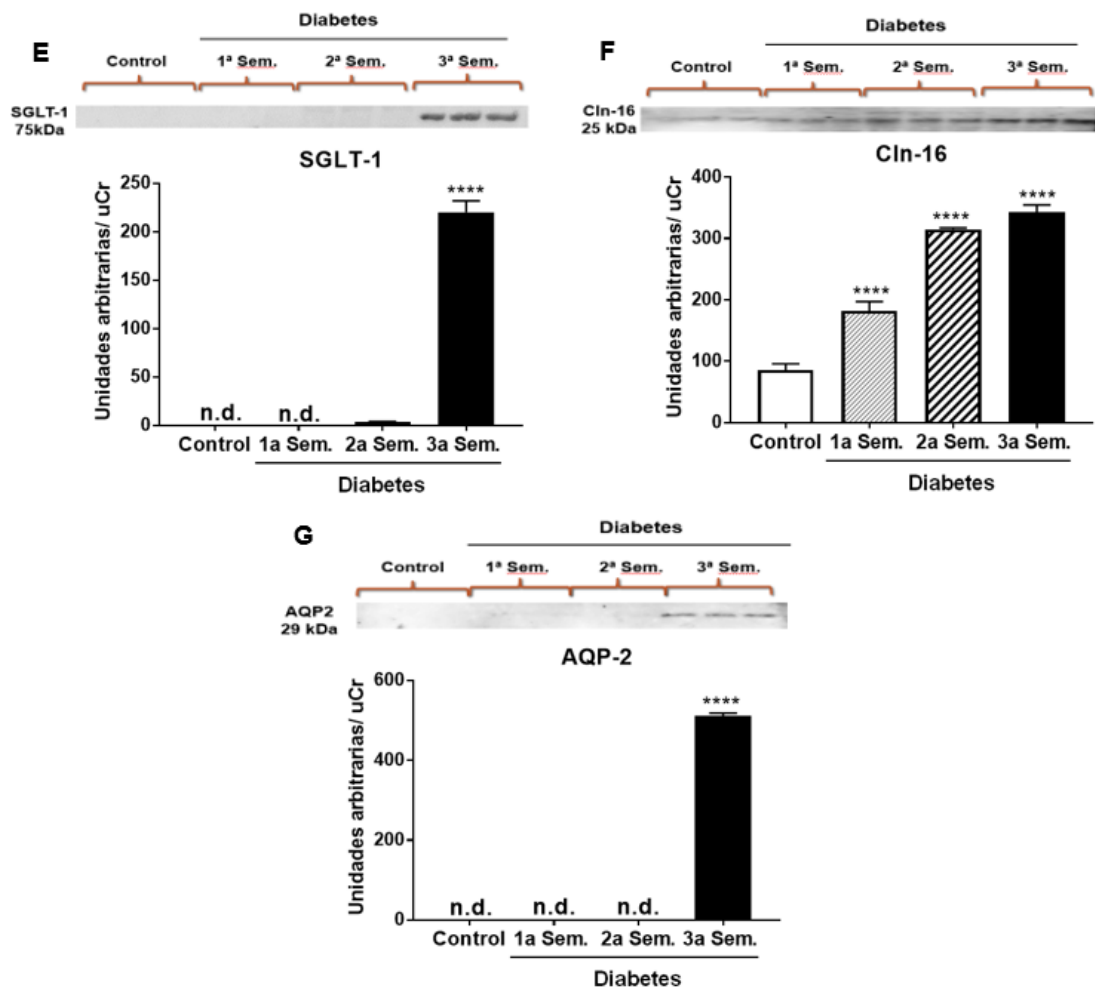


Figura 10. Evaluación de proteínas renales como posibles marcadores de nefropatía diabética temprana: A) Cln- 5 B) ocludina, C) Cln- 2, D) SGLT-2, E) SGLT-1, F) Cln- 16 y G) AQP-2. Se muestra el promedio \pm EEM. (n=6). Anova de 1 vía, Tukey, ****p<0.0001 vs control.

8 DISCUSIÓN

Se desarrolló un modelo de diabetes experimental empleando STZ, un fármaco que destruye a las células β del páncreas.¹³ Las ratas diabéticas a los 21 días de evolución mantuvieron niveles constantes de hiperglucemia de 459.8 ± 78.7 mg/dL. Con estos hallazgos se confirmó que se estableció la diabetes experimental, ya que las ratas presentaron hiperglucemia, polidipsia, poliuria y pérdida de peso, las cuales son características clínicas y metabólicas similares a las que presenta un paciente diabético.

La proteinuria se ha utilizado como marcador temprano de la DN.⁷³ Se ha descrito una disminución de la expresión de Cln-5 glomerular (en las células endoteliales),⁷⁴ Molina-Jijón y colaboradores (2014), encontraron que la pérdida de Cln-5 en los capilares glomerulares, que son los principales constituyentes de la barrera de filtración glomerular,⁴¹ podría ser un posible mecanismo que conduce a la proteinuria temprana en el estado diabético

Otro marcador que da información acerca de la función renal a nivel glomerular, es la depuración de creatinina. La disminución en la depuración de creatinina es un indicio de alteraciones en el proceso de filtración en el glomérulo, sin embargo, hay una tendencia a aumentar el valor de depuración de creatinina, lo que sugiere que hay hiperfiltración, ésta es una característica que se presenta en etapas tempranas de la nefropatía diabética y se correlaciona con el daño glomerular ya que, el aumento en la concentración de glucosa filtrada contribuye a la hipertrofia celular tubular interviniendo en el transporte anormal de Na^+ .⁷⁵

La DN es una enfermedad renal crónica y progresiva caracterizada por microalbuminuria y tasas de filtración glomerular disminuidas, que eventualmente pueden conducir a enfermedad renal terminal y muerte. Sin embargo, su diagnóstico e intervención tempranos podrían permitir el tratamiento oportuno de DN, lo que retrasaría la progresión patológica de la enfermedad.

En este estudio, se evaluaron proteínas por su potencial diagnóstico para detectar DN en etapa temprana. El hallazgo principal de este estudio fue

que los niveles urinarios de Cln-5, Cln-2, ocludina, SGLT-2, SGLT-1, Cln-16 y AQP-2, son biomarcadores valiosos que se podrían proponer para el diagnóstico temprano de DN en pacientes con DMT2.

Los mecanismos patogénicos de DN incluyen daño glomerular, lesión tubular, inflamación y estrés oxidativo.^{76,77} Por lo tanto, los biomarcadores involucrados en estos procesos pueden servir potencialmente como parámetros de diagnóstico clínicamente relevantes en DN.

El daño glomerular conduce a una mayor excreción urinaria de proteínas plasmáticas como la albúmina, debido a que el filtro glomerular se vuelve más permeable a las proteínas de alto peso molecular, debido a esto es posible observar un incremento de la excreción de albúmina, en la orina en las ratas diabéticas.⁴⁹

La proteinuria tubular se presenta cuando hay lesiones agudas o crónicas que comprometen la función tubular proximal.⁷⁸ Las sustancias de bajo peso molecular tales como las β_2 -microglobulinas, aminoácidos y cadenas livianas de inmunoglobulinas que tienen un peso molecular de alrededor de 25.000 daltons (la albúmina pesa 69.000), son fácilmente filtradas a través de la membrana basal y completamente reabsorbidas por las células del túbulo proximal. Una gran cantidad de enfermedades que pueden lesionar a los túbulos y el intersticio pueden alterar la reabsorción de esas moléculas. Las mediciones específicas para β_2 -microglobulina son muy sensibles a la lesión tubular, pero no son específicas de alguna enfermedad en particular.⁵⁷

La molécula de lesión renal 1 (KIM-1), cuya expresión está marcadamente regulada en el túbulo proximal en el riñón postisquémico de rata. El ectodominio de KIM-1 se desprende de las células.⁷⁹ KIM-1 se expresa en niveles insignificantes en el tejido renal normal, pero se induce masivamente en células epiteliales del túbulo proximal en enfermedades renales proteinúricas, tóxicas e isquémicas. Los niveles urinarios de KIM-1 fueron significativamente mayores en las ratas con diabetes en comparación con los sujetos controles donde no se detectó excreción de KIM-1 y se correlacionaron con la albúmina urinaria, β_2 -microglobulina y NGAL, lo que indica la posible aplicación clínica de KIM-1 en orina como marcador complementario para

confirmar en nuestro modelo que hay daño a nivel tubular, específicamente, en el túbulo proximal. Además, KIM-1 tiene el papel de mejoría después de un daño tubular, participando en la eliminación de células apoptóticas y facilitar la regeneración de los túbulos lesionados. Sin embargo, el mecanismo preciso en el restablecimiento de la integridad tubular después de una lesión no se ha establecido completamente. Esto podría explicar la disminución drástica en la excreción de KIM-1 en la 3ª semana, como posible función de reparación ante un daño, en este caso la diabetes.⁸⁰ Además, para confirmar esto, se necesita hacer más estudios, indagar si se están activando marcadores de proliferación celular (PCNA y Ki67) o marcadores de células progenitoras renales (CD24, NCAM y CD133).⁸¹ Además, se debe realizar inmunofluorescencias y estudiar la expresión de KIM-1 a nivel tejido y comprobar en enriquecimientos de túbulos proximales por gradiente de Percoll y analizar la expresión de KIM-1 en las tres semanas con diabetes, comparándolo con las ratas control.

La glicoproteína de Tamm-Horsfall es la proteína más abundante de la vía urinaria, se excreta en una cantidad de 50-100 miligramos por día. La THP es sintetizada en el riñón por una glucosilfosfatidilinositol (GPI), anclada a glicoproteínas de membrana, en el segmento proximal del asa de Henle. En este estudio se confirmó el daño renal en este segmento de la nefrona, que se correlaciona con lo ya reportado por Zimmerhackl y colaboradores (1991), quienes encontraron un incremento en la excreción de THP en pacientes con diabetes tipo 1 como un marcador de daño temprano.⁸²

Los marcadores de lesión tubular urinaria pueden aumentar en pacientes diabéticos, incluso antes del inicio de la microalbuminuria.⁸³ NGAL, también llamada lipocalina-2, es una proteína secretora que se libera durante la lesión renal y sirve como marcador de la lesión renal aguda.⁸⁴ Nuestro estudio encontró que NGAL urinaria incrementó su expresión desde la 2ª y 3ª semana con diabetes, lo que confirma un daño a nivel tubular proximal y distal, esto se correlaciona con las mismas semanas de excreción de β 2-microglobulina.

El daño a las proteínas UEs renales se produce en la DN inicial, entre las que se incluyen: disminución de la expresión de Cln-5 en los glomérulos,

Cln-2 y ocludina en los túbulos proximales. La pérdida de claudinas y ocludina ocurrió en secciones renales donde el estrés oxidativo fue inducido por PKC β 2 y eNOS que desacoplan las vías dependientes⁴¹. El propósito de este estudio fue explorar si esas alteraciones en las proteínas UE pueden ser encontradas en las orinas de ratas diabéticas. Dado que se ha descrito que el estrés oxidativo induce una alteración en el estado redox de las proteínas de UE²⁶, los estudios deben diseñarse para correlacionar el estrés oxidativo con el aumento de la permeabilidad epitelial y endotelial y con la disminución de los niveles de expresión de ocludina y claudinas. Éste es el primer estudio de posibles marcadores específicos de daño renal por diabetes.

La Cln-5 está presente en las células endoteliales, ya que mantiene su integridad y su pérdida está relacionada con la disfunción endotelial⁴¹. La pérdida de Cln-5 en la orina podría ser un posible mecanismo que contribuya a la proteinuria temprana en el estado diabético. Por otra parte, la pérdida de Cln-5 en las células endoteliales podría explicar la disfunción endotelial temprana reportada en pacientes diabéticos⁴¹. A nivel glomerular, es un posible marcador de daño más tardío a comparación de la albuminuria, proteinuria/creatinuria y depuración de creatinina, sin embargo, estos marcadores son de daño renal por diferentes causas, no son específicos de la diabetes.

La Cln-2 actúa como un canal de sodio y agua en el túbulo proximal renal^{85,86}, y reabsorbe casi un tercio del sodio filtrado a través de la vía paracelular; su pérdida disminuye la reabsorción de sodio y aumenta la natriuresis⁸⁵. Como se informó anteriormente⁴¹, la diabetes indujo la nitración de Cln-2, fosforilación de serina y sumoilación, debido a un aumento en el estrés oxidativo, lo que provocó estas alteraciones^{41,87}. Este antecedente concuerda con este estudio en el que se encontró un aumento significativo en la excreción urinaria en la tercera semana con diabetes. Esto podría explicar la disminución de esta proteína en el túbulo proximal. Sin embargo, este posible marcador de daño es más tardío en comparación con otros marcadores ya establecidos que se encuentran en la misma región del túbulo proximal como KIM-1, β 2-microglobulina y NGAL, pero éstos no cumplen el requisito de ser específicos de daño renal por diabetes.

La ocludina es una proteína presente en los filamentos que constituyen la UE. Está presente en las células epiteliales y endoteliales, y está ausente tanto a nivel de mRNA como de proteína en células que carecen de UE, como los fibroblastos³⁰. En las células renales tubulares, la ocludina está presente en los bordes celulares, y su distribución sigue el aumento en la complejidad y la función de la UE mostrada por la nefrona⁶. Nuestro grupo informó recientemente que la diabetes disminuyó los niveles de la proteína de Cln-2 y la ocludina en los túbulos proximales⁴¹, esto relacionado con el estrés oxidativo, lo que llevó a buscar esta proteína en la orina, encontrando un aumento progresivo frente al daño por diabetes.

Los SGLT1 y 2 se analizaron porque se ha informado que en la DN, la hiperglucemia aumenta la expresión del transportador de glucosa en las células tubulares proximales del riñón, lo que conduce a altos niveles de glucosa intracelular, lo que induce una sobreproducción de ROS⁸⁸. Esta sobreproducción de ROS debido a la diabetes puede llevar a un desacople de estos transportadores de glucosa y por lo tanto, a un aumento en la excreción de estos transportadores de glucosa en la orina.

Gong y colaboradores (2012), reportaron que la administración de inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) disminuye el ARN mensajero para claudina 14 y reduce drásticamente la excreción urinaria de calcio y magnesio en ratones⁸⁹. Adicionalmente, el tratamiento con los inhibidores HDAC estimulaba la transcripción de los genes que codifican micro-ARN-9 y micro-ARN-374 que han demostrado reprimir la expresión de claudina 14, el regulador negativo de la vía paracelular de reabsorción de calcio y magnesio⁸⁹. Se desconoce el mecanismo por el cual disminuye su expresión y por ende un aumento en la excreción de esta proteína en la orina. Pudiera ser por un aumento del estrés oxidante en esta región de la nefrona. Nuestro resultado se correlaciona directamente con un antecedente de nuestro laboratorio en el que se observó una disminución en la expresión de Cln-16, llevando a un aumento en la excreción de magnesio y calcio⁴². Sin embargo, es necesario realizar estudios a nivel molecular e indagar qué mecanismo es el que lleva a la eliminación aumentada de ésta por la orina. Pero Cln-16 es una proteína específica de riñón, y podría ser un posible marcador de DN. Además,

comparando con un marcador de referencia THP, que está en la misma localización en la asa ascendente gruesa de Henle, se presentó Cln-16 en la excreción urinaria desde la 1ª semana en comparación de THP más tardío hasta la 3ª semana. Por lo tanto, Cln-16 cumple con los criterios de ser un posible biomarcador ideal de daño renal específico para diabetes.

El mecanismo molecular responsable del aumento de la excreción de AQP2 en ratas diabéticas es desconocido y está fuera del alcance del presente estudio. Sin embargo, al menos para AQP2, se podría plantear la hipótesis de que ADH podría tener un papel clave en este proceso. Los estudios en animales mostraron un marcado aumento de la secreción de ADH en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina y un aumento compensatorio de AQP2^{90,91}. Los niveles más altos de ADH también se midieron en pacientes con DMT2⁹² incluso antes de mostrar complicaciones diabéticas avanzadas⁹³. Desde una perspectiva renal, los niveles altos de ADH pueden ser beneficiosos en la DBT temprana al limitar la cantidad de agua requerida para la excreción de una gran cantidad de glucosa⁹⁰.

9 CONCLUSIÓN

- Se estableció un modelo experimental de DMT1 con presencia de hiperfiltración glomerular y proteinuria, características que se presentan en etapas tempranas de nefropatía diabética.
- Se encontraron proteínas renales (Cln-5, Cln-2, Cln-16, ocludina, SGLT-2, SGLT-1 y AQP-2) excretadas en orina que sugieren la progresión a daño renal secundario a hiperglicemia y correlacionaron con marcadores ya conocidos de daño renal por otras causas.

10 PERSPECTIVAS

- Comprobar la excreción urinaria de nuestras proteínas de interés como potenciales marcadores, si no presentan cambios en otros modelos con daño renal no diabético.
- Buscar estas proteínas renales excretadas en la orina en pacientes con diabetes tipo 2 como método exploratorio de progresión a nefropatía diabética.

11 REFERENCIAS

- 1.- Gal Iglesias, B. Fisiología renal En: B. Gal Iglesias, M. López Gallardo, M. I. Martín Velasco, & J. Prieto Montalvo. Bases de la Fisiología. Ed. Tébar, 2007. Págs. 320-356.
2. - Kidney Health Care (KHC). Mangusan D. The Nephron- Structure and Function of the Nephron. <http://www.kidneyhealthcare.com/2010/12/nephron-structure-function-nephron.html> el 24 de septiembre del 2018.
3. - Gong, Y., & Hou, J. Claudins in barrier and transport function—the kidney. Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2017 <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1906-6>
- 4.- González-Mariscal, L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., & Bautista, P. Tight junctions. In Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, 3–30, 2012. <https://doi.org/10.5772/35166>
- 5.- González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- 6.- Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S. The renal segmental distribution of claudins changes with development. Kidney Int 62: 476-487, 2002 <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00479.x>
- 7.- Reyes, J. L., Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Bautista-García, P., Debray-García, Y., & Namorado, M. D. C. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. BioMed Research International, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/730789>
- 8.- Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. Am J Physiol Renal Physiol 297: F1566-1574, 2009. <https://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00214.2009>
- 9.- Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. Cell Tissue Res 343: 637-648, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1117-y>

- 10.- Zhao L, Yaoita E, Nameta M, Zhang Y, Cuellar LM. Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1856-1862, 2008. <https://dx.doi.org/10.1681%2FASN.2008101117>
- 11.- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969-4976, 2002. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- 12.- Yu A., Cheng M, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 133: 111-127, 2009. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810154>
- 13.- Y. Gong, N. Himmerkus, A. Plain, M. Bleich, J. Hou. Epigenetic regulation of MicroRNAs controlling CLDN14 expression as mechanism for renal calcium handling. *J Am Soc Nephrol*, 26, 2014 <https://doi.org/10.1681/ASN.2014020129>
- 14.- Gong Y., Renigunta V., Himmerkus N., Zhang J., Renigunta A., Bleich M. Claudin-14 regulates renal Ca⁺⁺ transport in response to CaSR signaling via a novel micro-RNA pathway. *Am J Physiol* 31:(8), 2012. <https://dx.doi.org/10.1038%2Femboj.2012.49>
- 15.- Guyton A. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816, 1991. <https://doi.org/10.1126/science.2063193>
- 16.- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00241-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00241-0)
- 17.- Alfred L. George, Jr.; Eric G. Neilson. Biología celular y molecular de los riñones. Parte 13 Trastornos renales y de vías urinarias. Capítulo 332 e. Harrison Principios de Medicina interna. 19ª Edición Edit. Mc Graw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=114932571&bookid=1717#1137937838>
- 18.- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89(1):3-9, 2003. <https://doi.org/10.1079/BJN2002763>
- 19.- Wright EM: The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol* 55:575-589, 1993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009>
- 20.- Wright, E.M., Loo, D.D., Panayotova-Heiermann, M., Hirayama, B.A., Turk, E., Eskandari, S., and Lam, J.T. Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol Scand Suppl* 643: 257-64, 1998. <https://es.scribd.com/doc/307027456/Gluts-y-SglT>
- 21.- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89(1):3-9, 2003. <https://doi.org/10.1079/BJN2002763>
- 22.-Davson H, Danielli JF: The Permeability of Natural Membranes. Cambridge University Press.51-52, 1952. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19452200240>

- 23.- King LS, Agre P: Pathophysiology of the Aquaporin water channels. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 619-648, 1996. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.003155>
- 24.- Denis Morin. Vasopressin V2 receptor-related pathologies: Congenital nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *Néphrologie & Thérapeutique.* 10; 7, 538-546, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2014.09.002>
- 25.- Sasaki S, Ishibashi K, Marumo F: Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family co-localized in the kidney collecting duct. *Annu. Rev. Physiol.*; 60: 199-220, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.199>
- 26.- Echevarría M, Frindt G, Preston G, Milovanovic S, Agre P, Fischbarg J, Windhager EE: Expression of multiple water channels activities in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat kidney. *J. Gen. Physiol.*; 101: 827-841, 1993. <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/expression-of-multiple-water-channel-activities-in-xenopus-oocyte-4>
- 27.- Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G: Cloning and expression of AQP-3 a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 10997-11001, 1994. <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.91.23.10997>
- 28.- Nielsen SB, Smith L, Christensen EI, Knepper MA, Agre P: CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.*; 120: 371-383, 1993. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.2.371>
- 29.-Nielsen S, Froklaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.*; 82: 205-244, 2002. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2001>
- 30.- Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki F. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature*; 361: 549-552, 1993. <https://doi.org/10.1038/361549a0>
- 31.- Fushimi N, Sasaki S, Marumo F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem*; 272: 14800-14804, 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14800>
- 32.- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Nat Acad Sci USA*; 92: 1013-1017, 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1013>
- 33.-Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV. Requirements of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science*; 264: 92-95, 1994. <https://doi.org/10.1126/science.8140421>

- 34.- Deen PM, Knoers NV. Vasopressin type-2 receptor and aquaporin-2 water channel mutants in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med Sci*; 316: 300-309, 1998. <https://doi.org/10.1097/00000441-199811000-00003>
- 35.- OMS. Informe mundial sobre la diabetes. WHO, 2006. Retrieved from <http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>
- 36.- ADA American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. (Position Statement). American Diabetes Association. *Diabetes Care*; 32 (suppl 1): S13-S61, 2009. <https://doi.org/10.2337/dc09-S013>
- 37.- American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes--2018. *Diabetes Care* ;41(Suppl. 1): S13–S27, 2018. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- 38.- Jiménez N., Manuel F. Diabetes Mellitus: actualización. Scielo. San José-Costa Rica; 42 (2), 2000. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000160022000000200005
- 39.- Mundel P. Shankland SJ. Podocyte Biology and Response to injury. *J Am Soc Nephrol*; 13:3005-3015, 2002. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000039661.06947.fd>
- 40.- Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint. *Kidney International*. 74:22-36, 2008. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.128>
- 41.- Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Namorado, M. D. C., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. L. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radical Biology & Medicine*, 72C, 162–175, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040>
- 42.- Encarnación García M. del R. Relación entre hipermagnesuria y claudina 16 en diabetes experimental tipo 1. Tesis de maestría, CINVESTAV, 2019
- 43.- Ha, H.; Lee, H. B. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology* 10(Suppl)(S7-10), 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2005.00448.x>
- 44.- Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1009-1022, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00809.2010>
- 45.- Y. Noda, E. Sohara, E. Ohta, and S. Sasaki, Aquaporins in kidney pathophysiology, *Nature Reviews Nephrology*. 6 (3): 168–178, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.231>
- 46.- Rossi L., Nicoletti M., Carosino M., Mastrofrancesco L., Franco A., Indrio F., Lella R., Laviola L., Giorgino F., Svelto M., Gesualdo L. and Procino G. Urinary excretion of kidney aquaporins as possible diagnostic biomarker of diabetic Nephropathy. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Diabetes Research*, Article ID 4360357, 13 pages, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4360357>

- 47.- Arango SS. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*; 30(1): 75-82, 2011. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30n1/v30n1a09.pdf>
- 48.-Stone RA. Office evaluation of the patient with proteinuria. *Postgrad Med*; 86: 241-244, 1989. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=30589>
- 49.-NKF. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*; 39: S1-266, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904577>
- 50.- Abuelo JG. Proteinuria: diagnostic principles and procedures. *Ann Intern Med*; 98: 186-191, 1983. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-98-2-186>
- 51.- Sedor JR SJ. Approach to the patient with proteinuria and nephrotic syndrome. In *Kelley's Textbook of Internal Medicine*, D. H. Humes HD, Gardner LB, Griffin JW, Harris ED, Hazzard WR, King TE, Loriaux DL, Nabel EG, Todd RF, Traber PG.4a ed. Lippincot Williams & Wilkins, 1099- 1104, 2000. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2007/myl077-8c.pdf>
- 52.- J. V. Bonventre, Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24 (11): 3265–3268, 2009. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp010>
- 53.- W. K. Han, V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani, and J. V. Bonventre, Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury, *Kidney International*, 62 (1): 237–244, 2002 <https://doi.org/10.1016/j.medin.2013.09.001>
- 54.- A. C. Carlsson, M. Calamia, U. Riserus et al., Kidney injury ´ molecule (KIM)-1 is associated with insulin resistance: results from two community-based studies of elderly individuals, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103 (3): 516– 521, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.12.008>
- 55.- N. E. El-Ashmawy, E. A. El-Zamarany, N. F. Khedr, A. I. Abd EIFattah, and S. A. Eltoukhy, Kidney injury molecule-1 (Kim-1): an early biomarker for nephropathy in type II diabetic patients, *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 35 (S3): 431–438, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13410-015-0403-3>
- 56.-B. K. Tekce, H. Tekce, G. Aktas, and M. Sit, Evaluation of the urinary kidney injury molecule-1 levels in patients with diabetic nephropathy, *Clinical and Investigative Medicine*, 37 (6): E377–E383, 2014 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4647685>
- 57.- Abuelo JG. Proteinuria: diagnostic principles and procedures. *Ann Intern Med*. 98: 186-191, 1983. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-98-2-186>
- 58.- Adler SG FK. The patient with hematuria, proteinuria, or both, and abnormal findings on urinary microscopy. In *Manual of Nephrology*, S. RW.6a ed.; Lippincott Williams & Wilkins, 126-130, 2005. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=30589>

- 59.- K. Mori and K. Nakao, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage, *Kidney International*, 71 (10): 967–970, 2007 <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002165>
- 60.- K.R. Pedersen, H.B. Ravn, V.E. Hjortdal, R. Nørregaard, J.V. Povlsen. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): Validation of commercially available ELISA. *Scand J Clin Lab Invest*, 70: 374-382, 2010. <http://dx.doi.org/10.3109/00365513.2010.486868>
- 61.- F. L. Nauta, W. E. Boertien, S. J. L. Bakker et al., Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes, *Diabetes Care*, 34 (4): 975–981, 2011 <https://doi.org/10.2337/dc10-1545>
- 62.- S. S. Kim, S. H. Song, I. J. Kim et al., Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 97 (2): 251–257, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.02.019>
- 63.- W.-J. Fu, S.-L. Xiong, Y.-G. Fang et al., Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study, *Endocrine*, 41 (1), 82–88, 2012. https://docksci.com/urinary-markers-of-tubular-injury-in-early-diabetic-nephropathy_5a0be1f4d64ab2977962373e.html
- 64.- S. E. Nielsen, H. Reinhard, D. Zdunek et al., Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 97 (1): 71–76, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.02.007>
- 65.- G. D. Fufaa, E. J. Weil, R. G. Nelson et al., Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus, *Diabetologia*, 58 (1): 188–198, 2015 <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00125-014-3389-3>
- 66.- Sikri KL, Foster CL, Bloomfield FJ, Marshall RD. Localization by immunofluorescence and by light- and electron-microscopic immunoperoxidase techniques of Tamm-Horsfall glycoprotein in adult hamster kidney. *Biochem J* 181:525–532, 1979 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1233324/>
- 67.- Wu, T.-H.; Li, K.-J.; Yu, C.-L.; Tsai, C.-Y. Tamm–Horsfall Protein is a Potent Immunomodulatory Molecule and a Disease Biomarker in the Urinary System. *Molecules*, 23, 200, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23010200>
- 68.- L.B. Zimmerhackl , S. Pfeleiderer , R. Kinne , F. Manz , G. Schuler , M. Brandis Tamm-Horsfall-Protein excretion as a marker of ascending limb transport indicates early renal tubular damage in diabetes mellitus type I. *Journal of Diabetic Complications*. 5 (2–3): 112-114, 1991. [https://doi.org/10.1016/0891-6632\(91\)90037-P](https://doi.org/10.1016/0891-6632(91)90037-P)
- 69.- C. E. Hills and P. E. Squires. The role of TGF- β and epithelial to mesenchymal transition in diabetic nephropathy, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22 (3): 131–139, 2011. <https://doi.org/10.1155/2018/2852398>

- 70.- Biji T. Kurien¹, Nancy E. Everds² & R. Hal Scofield. Recolección experimental de orina en animales: Revisión. *Laboratory Animals*, 38, 333-361, 2004 <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/11/Orina.pdf.pdf>
<https://images.app.goo.gl/NFwLDVC4vnBtzDt9>
- 71.- Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicol Lett* 191: 279-288, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.011>
- 72.- Sierra-Mondragon E., Rodríguez-Muñoz R., Namorado-Tonix C., Molina-Jijon E., Romero-Trejo D., Pedraza-Chaverri J. and Reyes J. All-trans retinoic acid attenuates fibrotic processes by downregulating TGF- β 1/Smad3 in early diabetic nephropathy. *Biomolecules*, 9(10), 525, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9100525>
- 73.- Weiss RB. Streptozocin: A review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treatment Report*. 66 (3): 427-38, 1982. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277485>
- 74.- Najafian, B., & Mauer, M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.08.024>
- 75.- Phillips A. The Role of Renal Proximal Tubular. Cells in Diabetic Nephropathy. *Current Diabetes Reports*; 3:491 –496, 2003. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11892-003-0013-1>
- 76.-Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clinical Science* 124(3):139-152, 2013. <http://www.clinsci.org/content/124/3/139>
- 77.- Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascular Pharmacology* 58(4):259-271, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2013.01.001>
- 78.- L. Gonzalez-Mariscal , MC Namorado , D. Martin , J. Luna , L. Alarcon , S. Islas. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int*, 57: 2386- 2402, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00098.x>
- 79.- Han, Won K. Han, Veronique Bailly, Rekha Abichandani, Ravi Thadhani, Joseph V. Bonventre Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International*, 62 (1): 237 – 244, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x>
- 80.- Ai Ing Lim Sydney C.W. Tang Kar Neng Lai Joseph C.K. Leung. Kidney injury molecule-1: More than just an injury marker of tubular epithelial cells? *J. of Cellular Physiology*, 228 (5): 917-924, 2013 <https://doi.org/10.1002/jcp.24267>
- 81.- Luna-Antonio BI, Rodriguez-Muñoz R, Namorado-Tonix C, Vergara P, Segovia J, Reyes JL. Gas1 expression in parietal cells of Bowman's capsule in

experimental diabetic nephropathy. *Histochem Cell Biol.*;148(1):33-47, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1550-z>

82.- Zimmerhackl LB, Pflieger S, Kinne R, Manz F, Schuler G, Brandis M. Tamm-Horsfall-Protein excretion as a marker of ascending limb transport indicates early renal tubular damage in diabetes mellitus type I. *J Diabet Complications.* 5(2-3):112-4, 1991 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722804>

83.- Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(3):489-494, 2009. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050503>

84.- Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney and Blood Pressure Research* 32(2):91-98, 2009. <https://doi.org/10.1159/000209379>

85.- Y. Kiuchi-Saishin, S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano, S. Tsukita Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments *J Am Soc Nephrol*, 13: 875-886, 2002. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0036208599&origin=inward&txGid=6bc84b06175b3e39d2bd249cb19467b1>

86.- R. Rosenthal, S. Milatz, S.M. Krug, B. Oelrich, J.D. Schulzke, S. Amasheh, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel *J Cell Sci*, 123: 1913-1921, 2010. <https://doi.org/10.1242/jcs.060665>

87.- C.M. Van Itallie, L.L. Mitic, J.M. Anderson. SUMOylation of claudin-2 *Ann N Y Acad Sci*, 1258: 60-64, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06541.x>

88.- Ha, H.; Lee, H.B. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology* 10 (Suppl). (S7-10), 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2005.00448.x>

89.- Gong Y., Renigunta V., Himmerkus N., Zhang J., Renigunta A., Bleich M., et al. Claudin-14 regulates renal Ca⁺⁺ transport in response to CaSR signaling via a novel micro-RNA pathway. 31:(8) 2012. <https://dx.doi.org/10.1038%2Femboj.2012.49>

90.- M. Ahloulay, F. Schmitt, M. Dechaux, and L. Bankir, Vasopressin and urinary concentrating activity in diabetes mellitus, *Diabetes & Metabolism*, 25 (3): 213–222, 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499190>

91.- L. N. Nejsum, T.-H. Kwon, D. Marples et al., Compensatory increase in AQP2, p-AQP2, and AQP3 expression in rats with diabetes mellitus, *American Journal of Physiology—Renal Physiology*, 280 (4): F715–F726, 2001. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.4.F715>

92.- K. Kamoi, M. Ishibashi, and T. Yamaji, Thirst and plasma levels of vasopressin, angiotensin II and atrial natriuretic peptide in patients with non-

insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 11 (3): 195–202, 1991. [https://doi.org/10.1016/s0168-8227\(05\)80033-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(05)80033-6)

93.- Iwasaki, K. Kondo, T. Murase, H. Hasegawa, and Y. Oiso. Osmoregulation of plasma vasopressin in diabetes mellitus with sustained hyperglycemia, *Journal of Neuroendocrinology*, 8(10): 755–760, 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910804>

94.- Fernández- Llama Patricia. Fisiología molecular del mecanismo de concentración urinario, papel de las aquaporinas renales. *Nefrología*, 20 (6): 477-565, 2000. <https://www.revistanefrologia.com/es-fisiologia-molecular-del-mecanismo-concentracion-articulo-X0211699500035672>

95.- Clifford J. Bailey. Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends in Pharmacol Sci*, 32 (2): 63-71, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.11.011>

12 TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Evaluación de la función renal en ratas de la cepa Wistar como una medición de control de calidad en la UPEAL-CINVESTAV-IPN María Antonieta López, Rafael Rodríguez, María del Carmen Namorado, **Luis Arturo Hernández**, Natalia García, Jorge Fernández, José Luis Reyes. 3^{er} Congreso Internacional FESAHANCCAL realizado en Antigua, Guatemala. Septiembre 04-06, 2019.

The glucose transporter (SGLT-2) as a possible urinary marker of early diabetic nephropathy. **Hernández- Carmona Luis A.**, Rodríguez- Muñoz Rafael, Namorado-Tónix María del Carmen, Cervantes-Pérez Luz Graciela and Reyes-Sánchez José Luis. Center of Research and Advances Studies. National Polytechnic Intitute (Cinvestav-IPN) Mexico. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Concepción, Chile. Noviembre 04-08, 2019.