



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

**CINVESTAV ZACATENCO**

**FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Expresión renal de las proteínas de la unión estrecha  
claudina-5, claudina-2 y ocludina y del receptor activado por  
proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ) en un modelo  
experimental de nefropatía diabética tipo 2**

**Tesis que presenta**

**Q.F.B Lorena Rosas Martínez**

**Maestra en Ciencias**

**En la Especialidad de**

**Fisiología Celular y Molecular**

**Directores de la Tesis: Dr. José Luis Reyes Sánchez**

**Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez**

*“El pájaro rompe el cascarón. El cascarón es el mundo.*

*Quien quiera nacer, tiene que destruir un mundo”.*

*-Hermann Hesse*

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi familia, porque gracias a su cariño, apoyo, sacrificio y confianza he llegado a realizar una de mis más grandes metas. Para ellos, con mucho cariño.

*“La felicidad solo es real cuando se comparte”.*

*- Jon Krakauer*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría y así poder continuar con mi formación académica.

A mi tutor, Dr. José Luis Reyes Sánchez, por creer en mí y aceptarme en su laboratorio, por su confianza y enseñanzas. ¡Muchas gracias!

A mi tutora, la Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez, por la confianza, paciencia, por su apoyo en el laboratorio, por creer en el proyecto y por todo lo que me ha enseñado a lo largo de cinco años. ¡Gracias por ser una excelente persona!

Agradezco a mis sinodales, por sus comentarios, correcciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer y concluir este trabajo: Dr. Marcos Nahmad Bensusan y Dra. Carmen Vivar Estudillo.

Al Dr. Fanis Missirlis, a sus alumnos y auxiliares por el apoyo en las determinaciones de las concentraciones de electrolitos por medio del ICP-OES.

A la Dra. Alicia Sánchez por sus consejos, apoyar el proyecto, su confianza, por su amistad y por todo su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A los auxiliares de investigación de CINVESTAV Zacatenco, Dr. Rafael Rodríguez Muñoz y Q.F.B Carmen Namorado Tónix por todo su apoyo en el laboratorio y su compromiso y aporte a este trabajo. A mis compañeros del laboratorio: Dr. Pérez, Brenda, Edith, Marlen, Q. Elsa y Esther. Y en especial,

a mi amiga dentro y fuera del laboratorio, Andrea, por su apoyo y por siempre darme ánimos.

A mis compañeros y amigos del departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología por apoyarme durante cinco años: Dr. Gustavo Pastelín, Dra. Luz Ibarra, Dra. María Sánchez, QFB. Leonardo Del Valle, Dra. Margarita Ramírez, MVZ. Gabriela Zarco, M. en C. Juan Carlos Torres y Dra. Natalia Pavón, Marco Hidalgo.

A la Dra. Francisca Pérez del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por sus consejos, sus enseñanzas y su amistad.

A mi gran familia, por estimarme, confiar en mí y siempre apoyarme. Por enseñarme el significado de unión y apoyo incondicional. Gracias a mis abuelitos, tíos y primos.

A los profesores e investigadores del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias de CINVESTAV Zacatenco por todo lo aprendido. A mis compañeros y amigos de la maestría: Mary, Lupita, Luis, Leo y Gustavo. En especial a Quetzalli, por todo su cariño, apoyo y confianza.

A todos mis amigos y amigas a lo largo de mi vida.

*“Uno, es los libros que ha leído, las películas que ha visto, la música escuchada y olvidada, las calles recorridas. Uno es su niñez, su familia, unos cuantos amigos, algunos amores, bastantes fastidios. Uno es una suma mermada por infinitas restas...” –Sergio Pitol*

## INDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RIÑONES.....	9
1.2 CELULAS EPITELIALES GLOMERULARES Y TUBULARES.....	12
1.2.1 LAS CLAUDINAS COMO COMPONENTES DE LAS UES EN LA NEFRONA.....	14
1.2.2 CLAUDINA-5 EN GLOMÉRULO.....	16
1.2.3 CLAUDINA-2 Y OCLUDINA EN TÚBULO PROXIMAL.....	16
1. 3 DIABETES Y NEFROPATIA DIABETICA.....	16
1. 3.1 MODELO DE NEFROPATIA DIABETICA TIPO 2.....	18
1. 4. CLAUDINAS Y NEFROPATIA DIABETICA.....	18
1.5.1 PPAR- $\alpha$ Y SU IMPORTANCIA EN LA NEFROPATIA DIABETICA...	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVO GENERAL.....	25
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. ANIMALES.....	26
6. 2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
6.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.....	28
6. 4 OBTENCIÓN DE TEJIDO RENAL.....	29

6.5 REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL INTRACARÓTIDA.....	29
6.6 INMUNOFLUORESCENCIA.....	30
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
7. RESULTADOS.....	31
7.1 LA ADMINISTRACIÓN DE STZ EN RATAS WISTAR NEONATAS INDUCE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2.....	31
7.2 EL MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2 PRESENTA ALTERACIÓN EN LA FUNCIÓN RENAL A LAS 14 SEMANAS.....	34
7.3 LA DIABETES TIPO 2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA UNIÓN ESTRECHA: CLAUDINA-5 EN GLOMÉRULO, CLAUDINA-2 Y OCLUDINA EN TÚBULO PROXIMAL.....	36
7.4 LA DIABETES TIPO 2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE PPAR-A EN GLOMÉRULO Y TÚBULO PROXIMAL .....	38
8. DISCUSIÓN .....	40
9. CONCLUSIONES .....	43
10. PERSPECTIVAS .....	44
11. BIBLIOGRAFÍA.....	44

## RESUMEN

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. La hiperglucemia tiene un papel importante en el daño renal, siendo así la nefropatía diabética la complicación más común de esta patología. En este daño microvascular se presentan alteraciones morfológicas y funcionales. Por esta razón, las estrategias encaminadas a identificar, prevenir y tratar la nefropatía diabética tipo 2 pueden contribuir a una mejor comprensión de dicha enfermedad. El modelo de diabetes tipo 2 que utilizamos se indujo a ratas neonatas a partir de la administración vía intraperitoneal de estreptozotocina, sustancia química que destruye de manera selectiva las células  $\beta$  del páncreas, las ratas diabéticas presentan a partir de la cuarta semana hiperglucemias moderadas y a las 14 semanas presentan una disminución en la ganancia de peso corporal, intolerancia a la glucosa, menor secreción de insulina y la masa renal aumenta. Evaluamos la función renal y observamos que a las 14 semanas se presentaban alteraciones características de una nefropatía diabética en etapa temprana, como proteinuria, hiperfiltración y aumento en la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La proteinuria se relacionó con una disminución en la expresión de claudina-5 en glomérulo y el aumento en la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  con una disminución de claudina-2 y ocludina en túbulo proximal. Además, observamos una pérdida de la expresión renal del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ) en ambos segmentos de la nefrona. El presente trabajo aporta evidencia de que la diabetes tipo 2 altera la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina, así como la de PPAR- $\alpha$ . Esto se relaciona con la pérdida de la función renal, por lo que se sugiere que la pérdida de estas proteínas es parte fundamental en las primeras etapas de la nefropatía diabética tipo 2.

## ABSTRACT

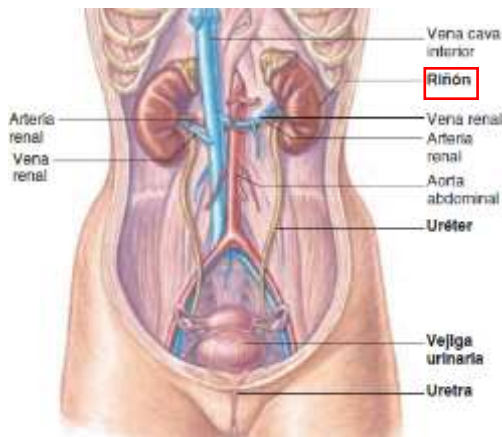
The WHO estimates that there are more than 422 million people with diabetes in the world, of whom 90% are diagnosed as type 2. Type 2 diabetes is characterized by a combination of multiple factors such as resistance to insulin action and/or an inadequate compensatory pancreas response that lead to an increase in blood glucose. Hyperglycemia plays an important role in renal damage, thus diabetic nephropathy is the most common complication of this pathology. In this microvascular damage, morphological and functional alterations are present. For this reason, strategies to identify, prevent and treat type 2 diabetic nephropathy may contribute to a better understanding of this disease. Type 2 diabetes model that we used was induced to neonatal rats by the intraperitoneal administration of streptozotocin, a chemical that selectively destroys the  $\beta$  cells of the pancreas, diabetics rats show moderate hyperglycemia since 4th week and at 14 weeks have a decrease in body weight gain, glucose intolerance, lower insulin secretion and an increase in renal mass. We evaluate renal function in this model and we observed characteristic alterations of diabetic nephropathy at an early stage, such as proteinuria, hyperfiltration and increased fractional excretion of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  at 14 weeks. Proteinuria was associated with a decrease in claudin-5 expression in the glomerulus and the increased fractional excretion of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  was related with a decrease of claudin-2 and occludin in the proximal tubule. In addition, we observed a loss of renal expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- $\alpha$ ) in both segments of the nephron. The present work provides evidence that type 2 diabetes alters the renal expression of tight junctions proteins such as claudin-5, claudin-2 and occludin, as well as PPAR- $\alpha$ . This is related to the loss of renal function, suggesting that the loss of these proteins is a fundamental part of the early stages of type 2 diabetic nephropathy.



# 1. INTRODUCCIÓN

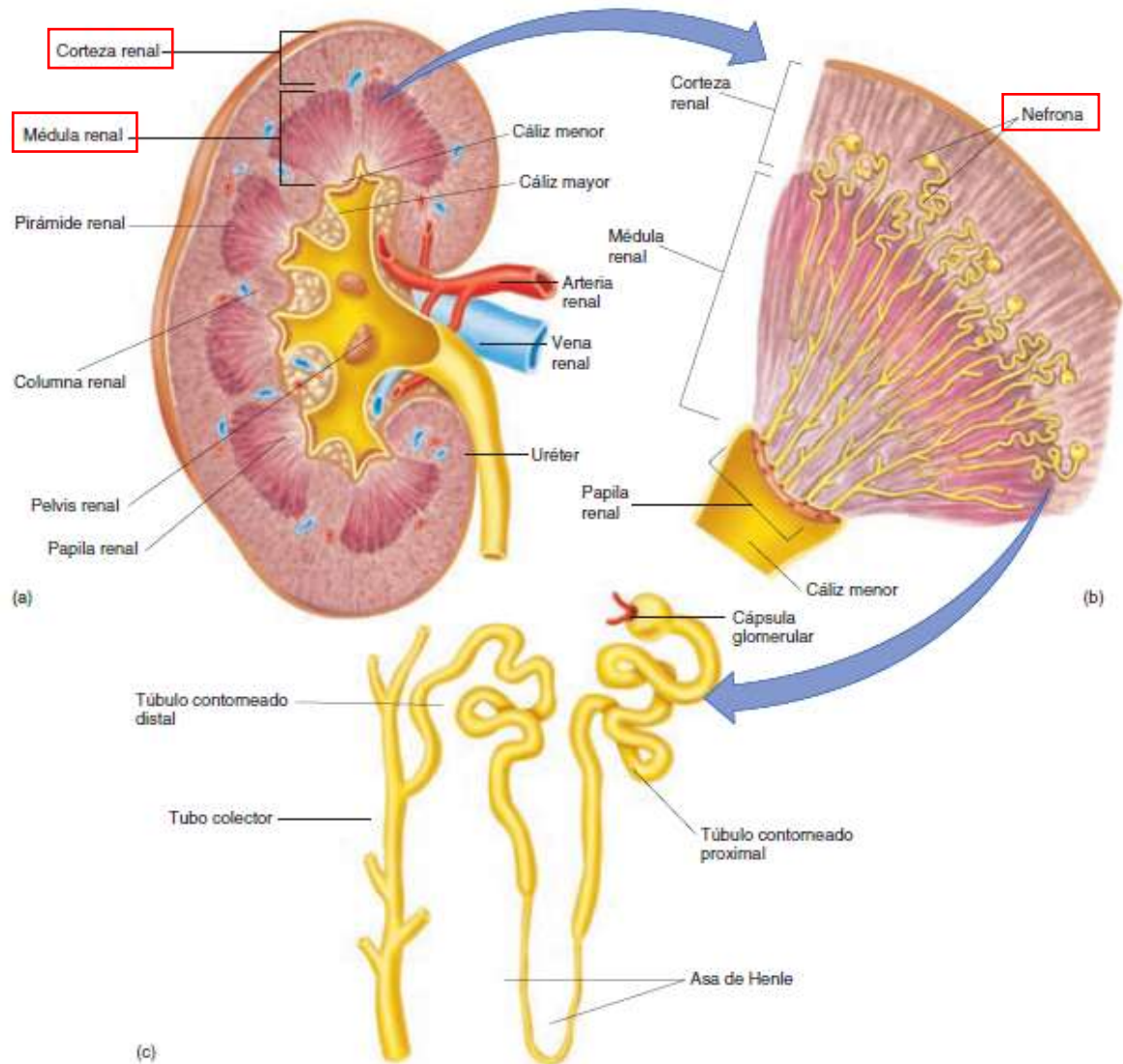
## 1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RIÑONES

Los riñones son un par de órganos que se localizan cerca de la parte media de la espalda (espacio retroperitoneal), debajo de la caja torácica, uno a cada lado de la columna vertebral. La orina producida en los riñones es drenada en una cavidad conocida como pelvis renal y luego es canalizada desde cada riñón a través de unos conductos largos —los uréteres— a la vejiga urinaria (**Figura 1**) (Fox, 2008).



*Figura 1. Órganos del sistema urinario. Se muestra el sistema urinario de una mujer; el de un varón es similar, excepto que la uretra transcurre a través del pene. Tomado de Fox, 2008.*

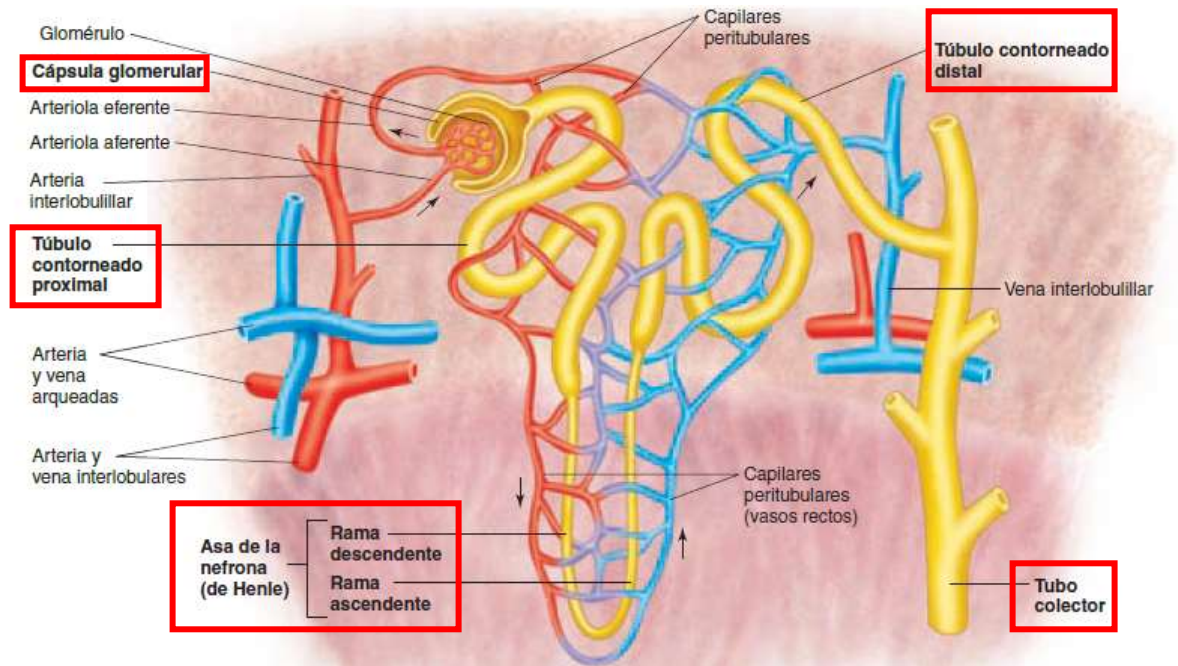
Histológicamente, el riñón contiene dos regiones diferentes, la corteza y la médula. La primera es la región más externa de aspecto café rojizo y granular debido a la abundancia de capilares. La segunda región es más profunda y es de aspecto rayado debido a la presencia de túbulos microscópicos y vasos sanguíneos (**Figura 2a**) (Fox, 2008).



*Figura 2. Estructura del riñón. La figura muestra a) una sección coronal de riñón, b) una vista ampliada del contenido de una pirámide renal y c) Muestra la estructura de una nefrona aislada. Tomado de Fox, 2008.*

Cada riñón tiene de 1 a 1.5 millones de unidades funcionales, conocidas como nefronas, que son responsables de filtrar alrededor de 180 litros de plasma por día y producir aproximadamente 1 litro de orina diariamente. Una nefrona consiste en tubos pequeños, o túbulos, y pequeños vasos sanguíneos asociados (**Figuras 2b y 2c**). El líquido derivado de la filtración capilar ingresa al glomérulo, posteriormente pasa a los túbulos (proximal, asa de Henle, contorneado distal y colector), donde resulta modificado de manera

subsecuente por procesos de transporte; el líquido resultante que abandona los túbulos es la orina (**Figura 3**) (Fox, 2008). Cada segmento cumple funciones definidas y la resultante del trabajo organizado de estos segmentos es la contribución renal a la homeostasis del líquido extracelular.



*Figura 3. Esquema representativo de una nefrona y vasos sanguíneos inherentes. En esta ilustración simplificada, se indican en un recuadro rojo los segmentos que conforman la nefrona, así como la red de vasos sanguíneos, con flechas se indica el flujo sanguíneo desde un glomérulo a una arteriola eferente, a los capilares peritubulares y hasta formar parte del drenaje venoso de los riñones. Modificado de Fox, 2008.*

Todas las sustancias que entran en el cuerpo pasan a la sangre y son los riñones los que actúan como una central de filtrado, es decir, su función primaria es la regulación de los componentes del líquido extracelular (plasma y líquido intersticial) en el cuerpo. Para esto, cumple con tres procesos: filtración, reabsorción y secreción, que culminan en la formación de la orina.

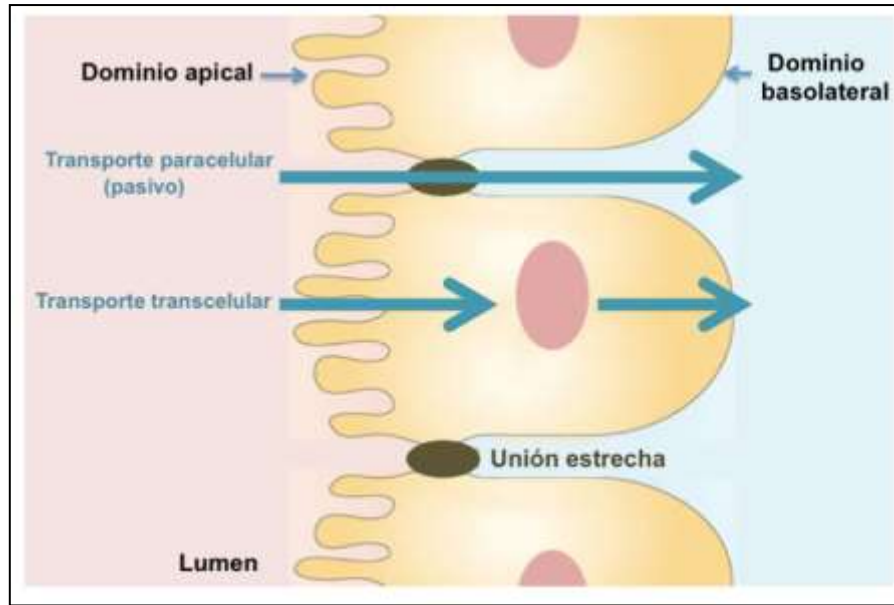
En el proceso de formación de la orina, los riñones regulan:

1. El volumen de plasma sanguíneo (regulación de la presión arterial).

2. La concentración de los productos de desecho en el plasma.
3. La concentración de electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y otros iones) en el plasma.
4. El pH del plasma.
5. Produce hormonas (renina, eritropoyetina, Vitamina D).

### *1.2 CELULAS EPITELIALES GLOMERULARES Y TUBULARES*

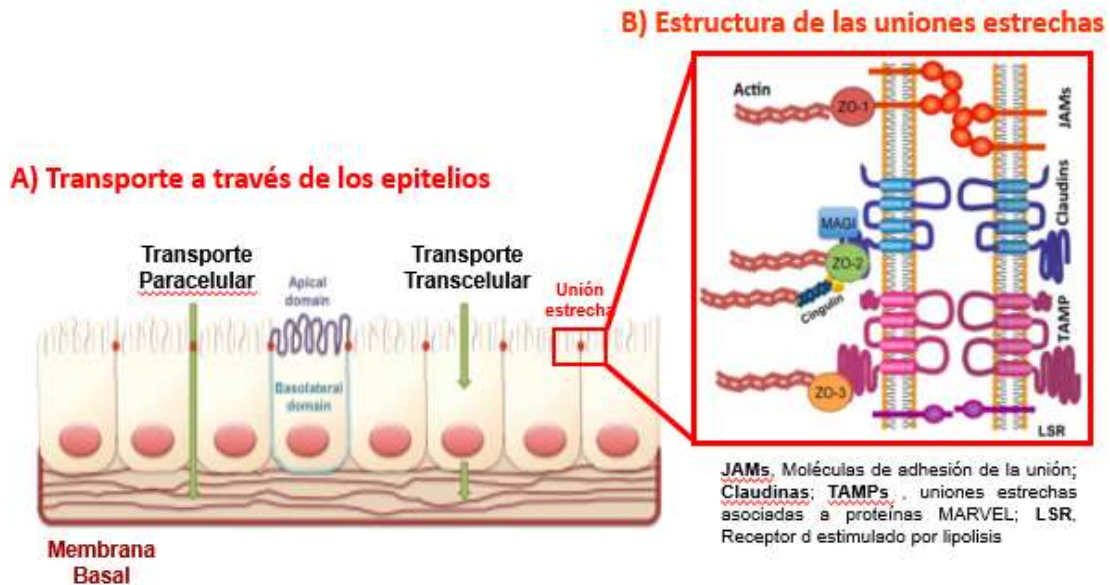
Estas células, desempeñan un papel crítico en el manejo renal de solutos orgánicos e inorgánicos y por lo tanto en la homeostasis del líquido extracelular. La reabsorción y secreción de solutos a través del epitelio glomerular y tubular renal constituye un aspecto fundamental de la fisiología celular del riñón. El transporte neto de solutos y  $\text{H}_2\text{O}$  a través de este epitelio ocurre por medio de dos vías: la vía transcelular y la vía paracelular (**Figura 4**). 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 regulada por las proteínas de la unión estrecha (UE) (Gong & Hou, 2017; L González-Mariscal, Quirós, Díaz-Coránguez, & Bautista, 2012).



**Figura 4.** Representación esquemática del epitelio tubular renal y de las vías de transporte transcelular y paracelular.

### 1.2.1 EL TRANSPORTE PARACELULAR POR LA UNIÓN ESTRECHA EN EL RIÑÓN

Las UEs son estructuras que se encuentran en el límite entre las membranas apical y basolateral de las células epiteliales (Lorenza González-Mariscal, Tapia, & Chamorro, 2008). Las uniones estrechas están constituidas por un conjunto complejo de proteínas. Las proteínas integrales comprenden a las claudinas, las proteínas JAMs, TAMP (tricelulina, ocludina y proteínas MARVEL) y LSR, las cuales establecen los contactos célula-célula en el espacio intercelular. Las proteínas periféricas zonula ocludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3), actúan como un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina (**Figura 5**)(Lorenza González-Mariscal et al., 2008).



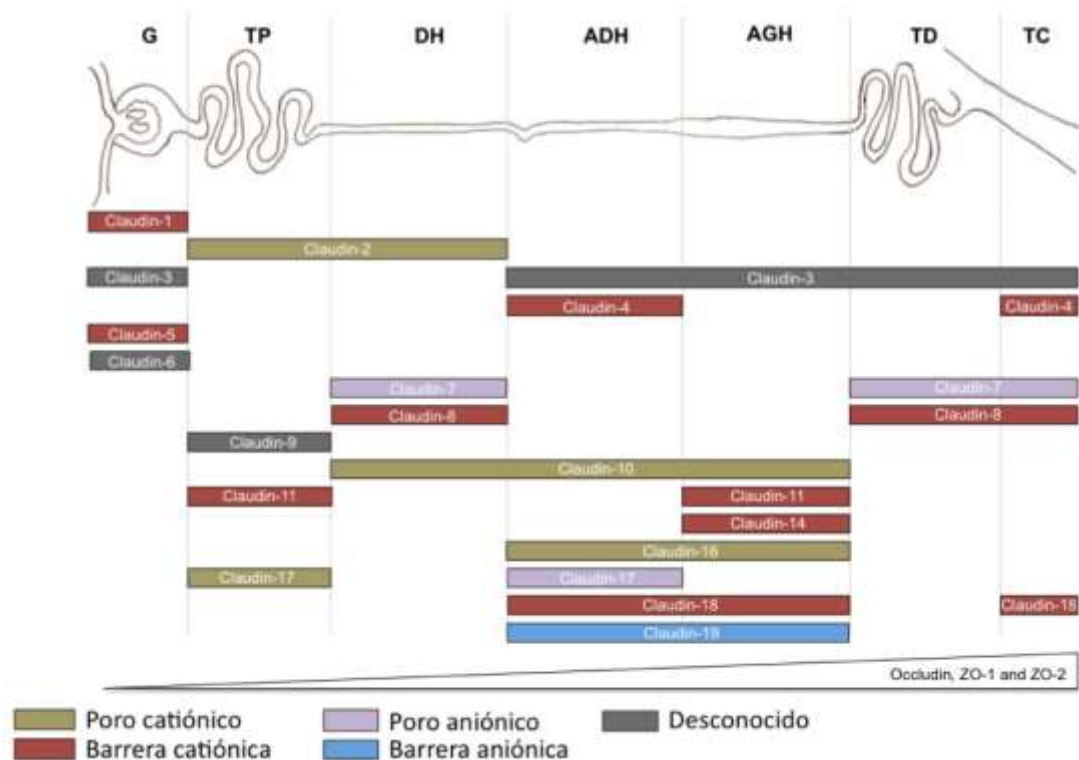
**Figura 5. a)** Transporte a través de los epitelios **b)** Representación esquemática de la estructura de las UEs. Modificada de L González-Mariscal, Quirós, Díaz-Coránguez, & Bautista, 2012.

### 1.2.1 LAS CLAUDINAS COMO COMPONENTES DE LAS UES EN LA NEFRONA

La permeabilidad de los epitelios glomerulares y tubulares depende de la UE presente en los diferentes segmentos de la nefrona. Se ha observado que la conductancia del epitelio renal disminuye a lo largo de la nefrona desde el túbulo proximal, que es el segmento más permeable, hasta los conductos colectores papilares, que son los segmentos más herméticos. Existe transporte bidireccional de aniones y cationes en todos los segmentos de la nefrona a través de la vía paracelular. La mayoría de los segmentos de la nefrona son más permeables a cationes que a aniones, aunque la vía paracelular del asa ascendente delgada de Henle y del conducto colector presentan selectividad por aniones como el Cl<sup>-</sup>. La expresión de diferentes claudinas en la nefrona determina las propiedades del transporte paracelular de la UE en los diferentes segmentos del riñón. Por ejemplo, en el glomérulo se expresan las claudinas-1 y -5, en el túbulo proximal se expresan las claudinas-2 y -10, en el asa ascendente de Henle se expresan las claudinas-



3, -16 y -19, en el túbulo contorneado distal se expresan las claudinas-7, -8 y -19 y en el conducto colector se expresan las claudinas-4, -7 y -8. La expresión de las proteínas ocludina, ZO-1 y ZO-2 aumenta desde el túbulo proximal hasta la nefrona distal (**Figura 6**) (Reyes et al., 2002). La combinación de estas proteínas en cada segmento determina su permeabilidad.



**Figura 6. Expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina, claudinas y 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.

A continuación, se explicará de manera resumida la función y regulación de claudina-5 en glomérulo y claudina-2 y ocludina en túbulo proximal.

### *1.2.2 CLAUDINA-5 EN GLOMÉRULO*

En el glomérulo adulto, las células del epitelio visceral (podocitos) forman una unión intercelular especializada llamada diafragma en hendidura. La claudina-5 se expresa a lo largo de la membrana plasmática de los podocitos (Koda et al., 2011). Esta claudina, confiere alta permeabilidad a este tipo celular. Su pérdida esta relaciona con la pérdida de podocitos. Además, está presente en las células endoteliales, ya que mantiene su integridad, su pérdida en este tipo celular, esta relacionada con la disfunción endotelial.

### *1.2.3 CLAUDINA-2 Y OCLUDINA EN TÚBULO PROXIMAL*

El túbulo proximal es un epitelio con alta permeabilidad iónica y reabsorbe hasta 2/3 partes de la carga de  $\text{Cl}^-$  filtrado, así como 2/3 partes del volumen del ultrafiltrado glomerular. Casi la mitad del  $\text{NaCl}$  se reabsorbe a través de la vía paracelular. La claudina-2, que actúa como un poro paracelular catiónico (Amasheh et al., 2002), 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y agua (Yu et al., 2009).

## *1. 3 DIABETES Y NEFROPATIA DIABETICA*

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica asociada a factores genéticos y ambientales, que se ha incrementado considerablemente en los últimos años y actualmente se considera una epidemia mundial. La OMS clasifica la diabetes en tres tipos principalmente: 1) la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la pérdida de las células  $\beta$  pancreáticas y en consecuencia la disminución en la producción de insulina, 2) la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) asociada con la resistencia progresiva a la insulina debido al sobrepeso y obesidad y a la disfunción de las células  $\beta$  y 3) la diabetes gestacional que se presenta como consecuencia



de la resistencia a la insulina durante el embarazo y que aumenta el riesgo de la madre y el hijo de padecer DMT2 en años posteriores. Tanto la DMT1 y la DMT2 están asociadas con un aumento en la tasa de complicaciones microvasculares como la nefropatía, neuropatía y retinopatía y con complicaciones macrovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión y el infarto cardiaco.

La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones asociadas a la DMT1 y DMT2, que eventualmente progresa a un estado de enfermedad renal en fase terminal (ERT). En diversos estudios epidemiológicos, se ha encontrado que aproximadamente el 30% de los pacientes diabéticos manifiestan nefropatía y que a nivel mundial la nefropatía diabética es la principal causa de enfermedad renal crónica y de fase terminal, y constituye uno de los factores de predicción de la mortalidad más fuertes en pacientes con diabetes.

La descripción clásica de la historia natural de la diabetes indica que en pacientes con DMT1, la enfermedad renal comienza aproximadamente 10 años después de la aparición de la enfermedad. Dentro de las manifestaciones clínicas iniciales se encuentran la microalbuminuria (mayor a 30 mg/día), que eventualmente progresa a macroalbuminuria (mayor a 300 mg/día) y disminución de la tasa de filtración glomerular (VFG). A nivel funcional, los pacientes con DMT1 desarrollan hiperfiltración glomerular seguida de un periodo prolongado de disminución en la función glomerular que culmina en ERT.

Durante el curso de la nefropatía diabética, se han descrito diversos procesos patológicos en varias células renales, incluyendo las células mesangiales, el podocito y las células tubulares renales. Dentro de las principales alteraciones morfológicas y funcionales que suceden en etapas iniciales de la nefropatía diabética se encuentran: la proteinuria, la disfunción glomerular, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, la expansión mesangial, la

hipertrofia glomerular y tubular y la acumulación de la matriz extracelular (MEC) que origina fibrosis renal.

### *1. 3.1 MODELO DE NEFROPATIA DIABETICA TIPO 2*

La ND por DT2 se reproduce generalmente en modelos de rata a las cuales se les induce la enfermedad con una dosis de STZ, que elimina a las células  $\beta$  pancreáticas que secretan la insulina generando hiperglucemia (Srinivasan & Ramarao, 2007; Tesch & Allen, 2007). Existe una variante de este modelo, en el cual se utilizan ratas Wistar neonatas, el páncreas en este tiempo tiene la capacidad de regenerar una cierta población de células  $\beta$  pancreáticas, lo que resulta en un animal adulto con hiperglucemias moderadas, intolerancia a la glucosa y secreción anormal de insulina, características por las cuales se considera como un modelo experimental de diabetes tipo 2 (Portha et al., 1989). Además, presenta nefropatía diabética a partir de la semana 11 después de la administración de STZ. En nuestro laboratorio en el Instituto Nacional de Cardiología Oidor Chan y col. caracterizaron el modelo confirmando lo anterior.

### *1. 4. CLAUDINAS Y NEFROPATIA DIABETICA*

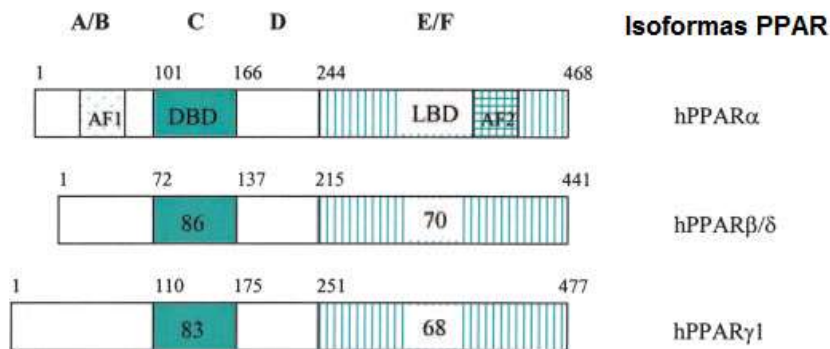
En el laboratorio del Dr Reyes, Molina-Jijon y col., en el 2013, observaron que en etapas tempranas de la nefropatía diabética en un modelo de diabetes tipo 1, disminuyen las proteínas de la unión estrecha claudina-5 y claudina-2. Fisiológicamente la pérdida de estas proteínas estaba relacionada con la presencia de proteinuria y un aumento en la excreción urinaria de sodio. El aumento en el estrés oxidante provocaba estas alteraciones, por lo que utilizaron en otro estudio (Molina-Jijón et al., 2015) como tratamiento al ácido trans-retinoico que se caracteriza por tener un efecto antioxidante. El tratamiento, revertía la pérdida de estas proteínas de la UE, debido a la atenuación del estrés oxidante, a una disminución de las especies reactivas de oxígeno, a una disminución de PKC $\beta$ 2 y de las subunidades de NADPH

oxidasa, p47<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup> y previniendo el desacople de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), inducidos por la diabetes. El ácido trans-retinoico es el ligando endógeno del receptor a ácido retinoico (RAR, por sus siglas en inglés) este heterodimeriza con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs, al formarse el heterodimero se exponen los sitios que reconocen las secuencias de DNA de los genes blanco conocidos como PPRE y así regulan la transcripción de moléculas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos, la homeostasis de los lípidos, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa. Además, transreprimen moléculas pro inflamatorias como NF-KB, TNF-alfa e INF- $\gamma$ .

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas y factores de transcripción activados por ligando. Es decir, son proteínas intracelulares dependientes de ligando que estimulan la transcripción de genes específicos mediante la unión a secuencias específicas de ADN. Hasta la fecha, han sido clonados y caracterizados tres diferentes subtipos de PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$ , y PPAR- $\gamma$ . Sus ligandos pueden inducir enormes cambios moleculares y celulares, incluyendo la proliferación peroxisomal, la adipogénesis, la  $\beta$ -oxidación y la regulación del ciclo celular (Cheng, Chen, & Lin, 2010; Guan, 2004).

Los PPARs han demostrado ser factores críticos en la regulación de diversos procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de lípidos, la adipogénesis, la sensibilidad a la insulina, la respuesta inmune, el crecimiento y la diferenciación celular y participan en la patogénesis del síndrome metabólico, que incluye resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, aterosclerosis y microalbuminuria. Además, los ligandos de los PPARs han sido considerados como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de la hipertensión arterial, la aterosclerosis, y la nefropatía diabética (Guan, 2004).

La estructura de los PPARs contiene cuatro principales dominios funcionales: un dominio N-terminal de transactivación independiente de ligando que regula la actividad de los PPARs (dominio A/B), un dominio de unión a ADN (DBD o dominio C) que se une al elemento de respuesta a los PPARs (PPRE) en la región promotora de los genes diana, un dominio de acoplamiento a co-factor (dominio D), y un dominio C-terminal E/F que incluye el dominio de unión a ligando (LBD) y el dominio de transactivación dependiente de ligando (dominio AF2). La especificidad al ligando se determina por este último (**Figura 7**) (Guan, 2004).



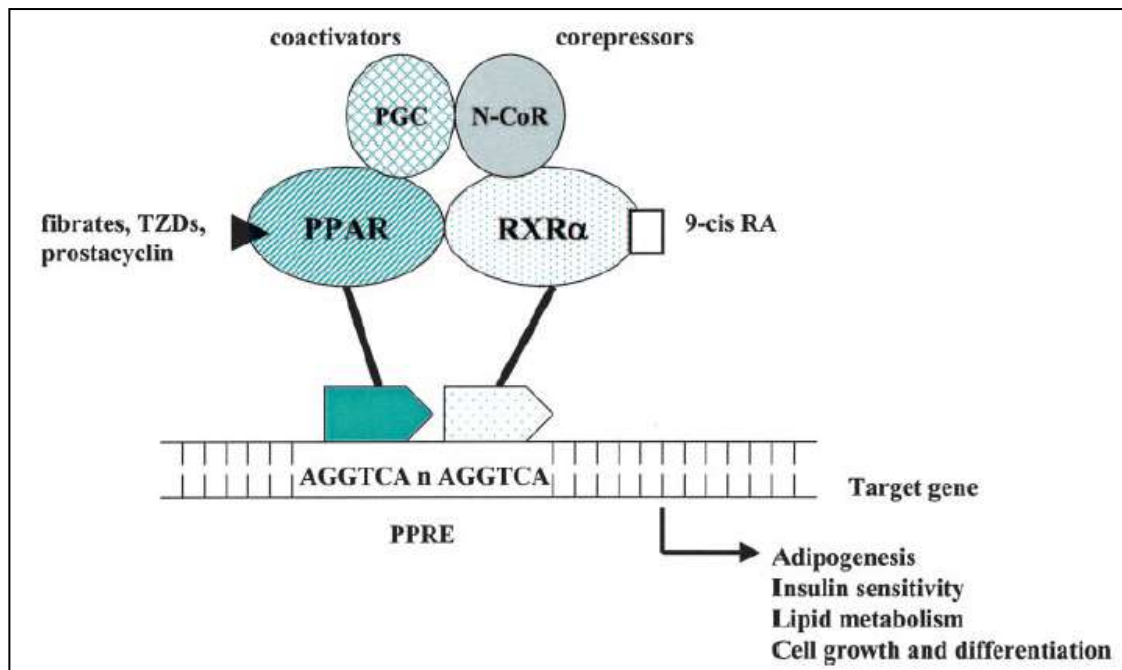
**Figura 7.** Representación esquemática de la estructura de los dominios de los PPARs. El número dentro de cada dominio corresponde al número de aminoácidos. Los números por encima de las cajas indican las posiciones de aminoácidos. DBD, es el dominio de unión al ADN. LBD, el dominio de unión al ligando. Modificado de Guan, 2004.

Cuando los activadores se unen a los PPARs, éstos heterodimerizan con los receptores a retinoides X (RXR), cuyo ligando natural es el ácido 9-cis-retinoico. Un cambio conformacional permite que el heterodímero pueda unirse a su PPRE, en los genes diana, para modular la transcripción de genes. El PPRE generalmente consiste de una secuencia hexamérica de repetición directa de elementos de reconocimiento de núcleo espaciados por 1 pb (DR1, 5'-AGGTCA-N-AGGTCA-3') situado en las regiones promotoras de los genes diana. Después de la activación del heterodímero PPAR/RXR en el PPRE, el complejo PPAR/RXR puede reclutar diversos co-factores que modulan la actividad transcripcional de PPAR y RXR. Estos co-activadores incluyen: la

proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, proteínas de unión al elemento de respuesta a AMPc, y el coactivador 1 de receptor de esteroides. Los co-represores de receptores nucleares, como el co-represor y mediador del silenciamiento del receptor de ácido retinoico y el receptor de hormona tiroidea, pueden modular la actividad transcripcional de los PPARs. Por lo tanto, mecanismos múltiples están involucrados en el control de la transcripción de genes diana de los PPARs en una célula o tejido dado. El nivel de expresión de los PPARs, las propiedades químicas y las concentraciones locales de ligandos específicos de los PPARs, y la disponibilidad de los co-factores contribuyen al efecto biológico de la activación o inactivación de los PPARs (**Figura 8**) (Cheng et al., 2010; Guan, 2004; Robinson & Grieve, 2009).

Aunque los PPARs presentan una alta homología en su secuencia de aminoácidos y comparten una estructura muy similar, se expresan diferencialmente en el cuerpo y exhiben diferente selectividad a ligando y acción biológica (Robinson & Grieve, 2009).

La secuencia de aminoácidos diferentes en el LBD de las tres isoformas de los PPARs se piensa que proporciona la base molecular para la selectividad de ligando. En las tres isoformas de los PPARs existe, sobre la base de la estructura, un gran "pocket" de unión a ligando (1300 Å), permitiendo el acceso de compuestos diversos y estructuralmente distintos al LBD y permitiendo que los PPARs detecten una amplia gama de sustancias endógenas, incluyendo los ácidos grasos y sus metabolitos (Guan, 2004).



**Figura 8.** Mecanismo molecular de acción de los PPARs. Las isoformas de los PPARs forman heterodímeros con el receptor- $\alpha$  a retinoide X (RXR- $\alpha$ ) en presencia de sus ligandos (Ej. fibratos). El heterodímero resultante se une a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en las regiones promotoras de los genes PPAR a través de los dominios de unión al ADN de PPAR y RXR- $\alpha$ . Los coactivadores y co-represores son esenciales para la modulación de la transcripción de genes diana de los PPARs, que están implicados en muchos procesos biológicos como la sensibilización a la insulina, la adipogénesis, y el metabolismo de los lípidos. Tomado de Guan, 2004.

### 1.5.1 PPAR- $\alpha$ Y SU IMPORTANCIA EN LA NEFROPATIA DIABETICA

La isoforma alfa de los PPARs (PPAR- $\alpha$ ) es activado por ligandos naturales tales como ácidos grasos y eicosanoides y por ligandos sintéticos, como los fármacos hipolipemiantes de la familia de los fibratos para inducir la transcripción de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Schiffrin, Amiri, Benkirane, Iglarz, & Diep, 2003). En general, PPAR- $\alpha$  es

altamente expresado en los tejidos que poseen alta actividad mitocondrial y  $\beta$ -oxidación, incluyendo el hígado, la corteza renal, músculos, la mucosa del intestino delgado y el corazón. En el riñón, PPAR- $\alpha$  es muy abundante en los túbulos proximales y medianamente en la porción ascendente del asa gruesa de Henle y la menor presencia es en las células mesangiales glomerulares (Guan y Breyer, 2001; Guan, 2004; Guan, 2006; Cheng et al., 2010). Su activación a partir de ligandos exógenos en modelos de nefropatía diabética ha contribuido a prevenir la dislipidemia diabética a partir de la disminución de triglicéridos, colesterol, lipoproteína de baja densidad y el aumento de lipoproteína de alta densidad, reduciendo la inflamación renal, a partir de la transrepresión de NF- $\kappa$ B. Además, disminuyendo la glomeruloesclerosis a partir de la activación de eNOS, disminuyendo la fibrosis tubulointersticial a partir de la disminución del factor transformante beta y moléculas de adhesión como ICAM – 1 y por último, disminuyendo el estrés oxidante a partir de la disminución de las especies reactivas de oxígeno y aumentando transcripcionalmente enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La Organización Mundial de la Salud en el año 2016, reportó que la diabetes es un problema de salud pública importante y una de las cuatro enfermedades no transmisibles seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario (OMS, 2016). Se conoce que ha aumentado el número de casos y la prevalencia de la enfermedad. Se estima que para el año 2025, 333 millones de personas (6.3%) de todo el mundo padecerán diabetes, de las cuales 284 millones serán de países en vías de desarrollo (International Diabetes Federation, 2006; King, Aubert, & Herman, 1998). En México, la diabetes tipo 2 fue la principal causa de mortalidad en el 2007, causando un total de 13.7% muertes (Pan American Health Organization, 2010). Esta enfermedad no controlada genera daño microvascular como la retinopatía, neuropatía, cardiopatía y de manera muy importante la nefropatía, esta última

es la complicación más común de esta patología y es una causa cada vez más importante de morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos en el mundo, ya que lleva a insuficiencia renal crónica, la cual es la responsable del 20-40% de muertes en paciente diabéticos según reportes de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Además, la nefropatía diabética presenta alteraciones morfológicas y funcionales mayores, los primeros cambios se caracterizan por un aumento en el peso del riñón, volumen glomerular, acumulación de matriz extracelular glomerular, aumento de la excreción urinaria de albúmina, glomeruloesclerosis y fibrosis tubular, teniendo como consecuencia pérdida de la función renal. Por esta razón, las estrategias encaminadas a identificar, prevenir y tratar la diabetes y las alteraciones tempranas en la nefropatía diabética contribuyen a una mejor comprensión de dicha enfermedad. Se han descrito diversos mecanismos fisiopatológicos que expliquen el origen y la progresión de la insuficiencia renal secundaria a la nefropatía diabética. Un mecanismo propuesto por Molina-Jijón y col. en el 2014, involucra las alteraciones de las proteínas de la unión estrecha claudinas, ocludina y ZO's a lo largo de la nefrona en un modelo experimental de nefropatía diabética tipo 1 debido al estrés oxidante. Estas proteínas están involucradas en el transporte paracelular de agua y solutos como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el riñón, lo que constituye un aspecto importante en el mantenimiento renal de la homeostasis corporal. Además, Molina-Jijón y col. reportaron en 2015, que estas alteraciones se revertían utilizando como tratamiento al ácido trans-retinoico, un ligando del receptor a ácido retinoico (RAR por sus siglas en inglés, miembro de los receptores nucleares de hormonas y factores de transcripción dependientes de ligando), a través de un mecanismo que involucra la disminución del estrés oxidante. Sin embargo, se desconoce si las alteraciones en las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina se presentan en un modelo de diabetes tipo 2 y si existe una relación con la expresión de otro miembro de los receptores nucleares de hormonas y factores de transcripción dependientes de ligando, PPAR- $\alpha$ , ya que una disminución en la expresión renal de esta isoforma en ratones diabéticos db/db se relaciona a



un aumento en el estrés oxidante (Park et al., 2006). Por esta razón, en este estudio se explora la expresión de PPAR- $\alpha$  en el glomérulo y en el túbulo proximal, con la finalidad de establecer una relación entre esta isoforma y las alteraciones en las proteínas de la unión estrecha en el epitelio glomerular (claudina-5) y tubular (claudina-2 y ocludina) renal que conduce a una alteración en la función renal presente en la nefropatía diabética tipo 2.

### **3. HIPÓTESIS**

En el modelo experimental de nefropatía diabética tipo 2, se disminuirá la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina, así como la expresión renal de PPAR- $\alpha$ , constituyendo una parte fundamental en el inicio del daño renal secundario a la diabetes tipo 2.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar en un modelo experimental de nefropatía diabética tipo 2 la función renal y su relación con las alteraciones en la expresión de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina y la expresión de PPAR- $\alpha$ .

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer un modelo experimental de diabetes tipo 2.
2. Evaluar la función renal en un modelo experimental de diabetes tipo 2.
3. Evaluar la alteración en la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina en un modelo experimental de diabetes tipo 2.

4. Evaluar la expresión de PPAR- $\alpha$  en un modelo experimental de diabetes tipo 2.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar neonatas (entre dos y tres días de edad), las cuales fueron obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”. Dichos animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales de humedad ( $50 \pm 5\%$ ), temperatura ( $22 \pm 1$  °C), ciclos de luz-oscuridad (12h/12h) controlados y con acceso al alimento y agua ad libitum. Los animales se trataron bajo las normas establecidas por el comité de ética de dicho instituto.

### 6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

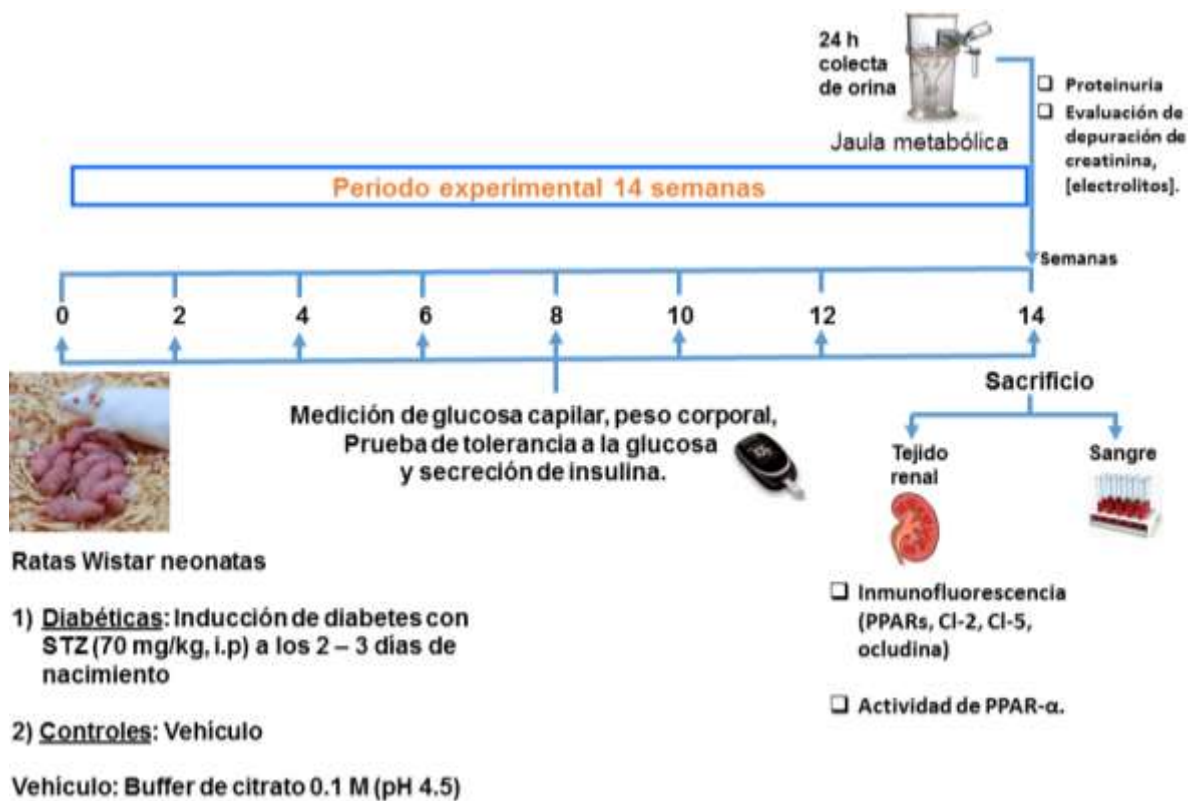
Se asignaron de manera aleatoria dos grupos experimentales: 1) Ratas controles y 2) Ratas diabéticas.

El modelo experimental de diabetes tipo II se indujo, de acuerdo a lo reportado por nuestro laboratorio (Oidor-Chan et al., 2016), mediante la administración intraperitoneal (i.p) de una dosis única de estreptozotocina (STZ) (70 mg/kg de peso corporal) utilizando como vehículo un buffer de citratos 0.1M a pH 4.5. Las ratas controles fueron administradas únicamente con vehículo. Durante 14 semanas se midió la glucosa en sangre, utilizando un glucómetro (Accu-Chek Active, Glucotrend, Roche®), a partir de la obtención de una gota de sangre de la vena caudal mediante punción en el extremo distal de la cola, las ratas se consideraron diabéticas cuando superaron los 200 mg/dL de glucemia. Así mismo, se registró el peso corporal a lo largo de 14 semanas.

Para establecer el modelo como diabetes tipo II, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT, por sus siglas en inglés) 14 semanas

posteriores a la administración de STZ (esta prueba se realizó con 14 horas de ayuno) y de secreción de insulina, utilizando un kit para la técnica de ELISA.

Posterior a esto, las ratas se colocaron individualmente en jaulas metabólicas 24 horas antes de ser sacrificadas y se recolectó orina para determinar la depuración de creatinina, proteinuria y excreción urinaria de electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), estos parámetros sirvieron como marcadores de función renal. El día de sacrificio, las ratas se anestesiaron con pentobarbital (30 mg/kg), vía i.p y se tomaron muestras de sangre y riñón. Las muestras de riñón completo se utilizaron para las técnicas de inmunofluorescencia.



**Figura 9. Diseño experimental.** Inducción de diabetes tipo 2 con STZ, medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos, función renal y obtención de muestras biológicas.

### 6.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Se monitoreó la glucemia y el peso corporal durante 14 semanas. Para recolectar las muestras urinarias y medir el consumo de agua de 24 h, las ratas se metieron en jaulas metabólicas 24 h previas al sacrificio y se midió el volumen urinario (**Figura 9**). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg i.p) y se recolectó la sangre antes del sacrificio por punción cardiaca, la sangre se centrifugó (1200 rpm x g durante 10 min) para obtener el suero. Para evaluar la función renal se midió la proteinuria, la depuración de creatinina, la natriuresis (concentración de Na<sup>+</sup> en orina) y la fracción excretada de Na<sup>+</sup> (FeNa), K<sup>+</sup> (FeK), Mg<sup>2+</sup> (FeMg) y Ca<sup>2+</sup> (FeCa). La proteinuria se midió mediante el método de Lowry modificado (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La creatinina urinaria y sérica se midió mediante el método de Jaffé como se describió previamente. La depuración de creatinina se corrigió con el peso corporal, ya que las ratas diabéticas presentan un menor peso corporal comparado con el grupo control, expresándose en mL/min/100 g.p.c. Para evaluar la función tubular se midió la natriuresis, FeNa, FeK, FeMg y FeCa, estas cuatro últimas se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Excreción fraccional de electrolito (\%)} = \frac{\text{depuración de electrolito}}{\text{depuración de creatinina}} \times 100$$

Depuración de electrolito o creatinina =

$$\frac{[\text{electrolito o creatinina}] \text{ en orina}}{[\text{electrolito o creatinina}] \text{ en suero}} \times \text{flujo urinario en 24 h (mL/min)}$$

Las concentraciones séricas y urinarias de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> se midieron utilizando un equipo ICP-OES proporcionado por el Dr Fanis Misirlis, donde el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES. En esta técnica, una muestra líquida es pasada por un sistema de

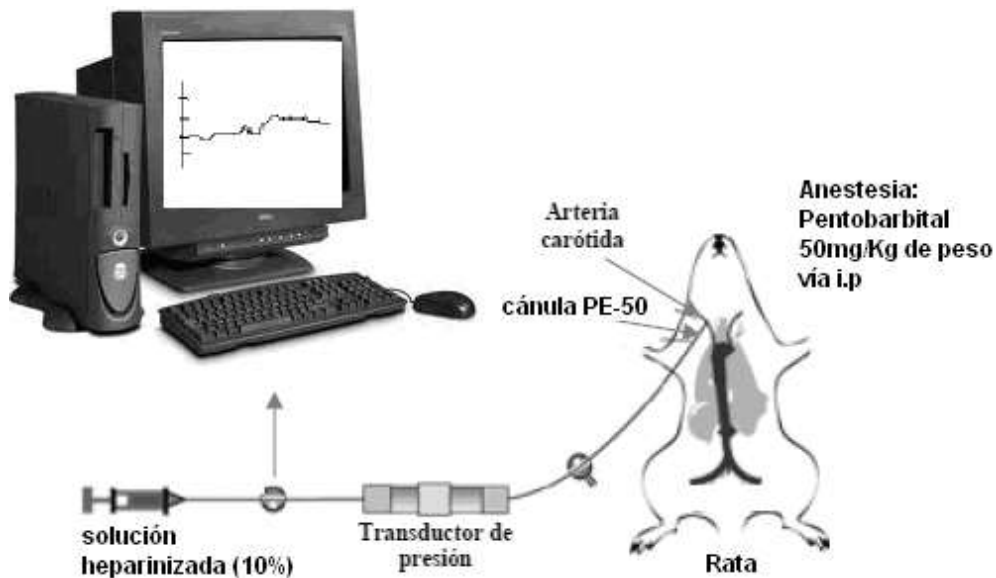
nebulización que forma un aerosol que es transportado por gas argón a la flama del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de Emisión atómicos que son detectados. Con esta técnica se pueden analizar simultáneamente muchos elementos y en niveles tan bajos como 1-10 partes por mil millones o ppb.

#### *6. 4 OBTENCIÓN DE TEJIDO RENAL*

Los riñones se perfundieron con solución salina isotónica fría (SSI, 0.9% NaCl), se descapsularon, se pesaron y cortaron en rebanadas transversales (3-4 cortes) sobre un papel filtro. Posteriormente se criopreservaron, sumergiéndose en 2-metilbutano y finalmente se conservaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

#### *6.5 REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL INTRACARÓTIDA*

La presión arterial sistólica se midió a las 14 semanas utilizando la técnica invasiva intracarótida, que consiste en lo siguiente: se anestesió a la rata con pentobarbital sódico (30 mg/Kg i.p). Posterior a la sedación se procedió a disecar a nivel del cuello la arteria carótida y se colocaron dos hilos de seda 000, tanto del lado proximal como distal al corazón. Se cerró definitivamente la circulación distal con el hilo y con unas pinzas hemostáticas se cerró temporalmente el lado proximal. Se realizó una incisión en la arteria y se introdujo una cánula PE-50, con solución heparinizada (10%), en la luz de la arteria. La cánula se conectó a un equipo de transducción de presión arterial, y éste a su vez a un monitor de presión BP-1, el cual envía el registro al sistema de adquisición de datos Duo 18 que nos muestra un registro en mmHg. La presión arterial sistólica se registró por espacio de 5 minutos (**Figura 10**).



**Figura 10.** Registro de la presión arterial intracarótida.

## 6.6 INMUNOFLUORESCENCIA

El tejido renal se cortó en rebanadas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor en un crióstato (Leica CM 1510 Cryostat, Wetzlar, Alemania) a  $-25^{\circ}\text{C}$  y se montaron en portaobjetos gelatinizados que se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la inmunofluorescencia. La técnica de inmunofluorescencia fue la siguiente: los cortes se fijaron en metanol durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , después se rehidrataron con PBS 1x +  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM por 5 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con PBS + 0.2% Tritón X-100 durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS 1x +  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM. Las muestras se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente con 1% (v/v) de BSA libre de IgG's (1331-A, Research Organics, Cleveland, OH, USA) y se incubaron con los anticuerpos primarios para PPAR- $\alpha$ , claudina-5, claudina-2 durante 16 h a  $24^{\circ}\text{C}$ . Como marcador para glomérulos se utilizó VE-cadherina o claudina-5 y para los túbulos proximales se utilizó DppD. En ambos casos, se utilizó DAPI para marcar los núcleos. Al siguiente día, se lavó el anticuerpo primario dos veces con PBS 1x. Los anticuerpos secundarios, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS 1x, se agregó DAPI

(dilución 1:2500), se realizaron nuevamente dos lavados con PBS 1x y finalmente se montaron las preparaciones con Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA). Las inmunofluorescencias se analizaron con un microscopio confocal invertido (TCS-SP8, Leica, Heidelberg, Alemania). Los experimentos se realizaron de manera independiente al menos tres veces en tres animales diferentes por grupo. Como control negativo, las laminillas se marcaron de manera específica en ausencia de los anticuerpos primarios. Las imágenes tomadas en el microscopio confocal fueron analizadas con el programa Image J para tener una medida semicuantitativa, se le aplica un barrido a la imagen de tal manera que podamos seleccionar la zona de nuestro interés en amarillo y dar la orden al programa de que mida la cantidad de pixeles por área de nuestra selección, en este caso la marca que pertenece a la unión estrecha. Los valores se reportan en Densidad integrada

## **6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre los promedios se analizaron mediante *t de student* (para comparar entre dos grupos) 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**

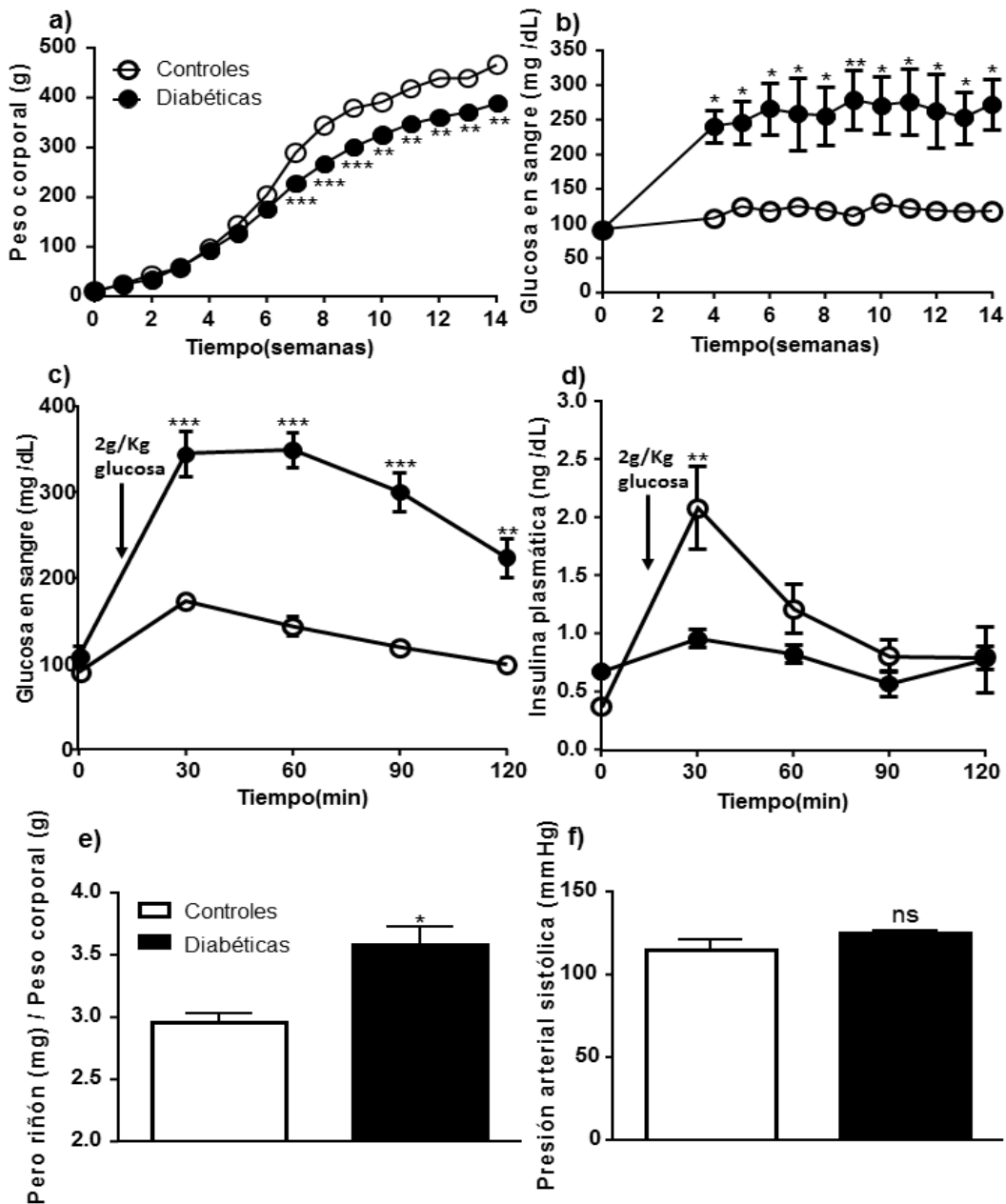
### **7.1 LA ADMINISTRACIÓN DE STZ EN RATAS WISTAR NEONATAS INDUCE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2**

El primer objetivo de este trabajo era establecer un modelo experimental de diabetes tipo 2 inducida por la administración de STZ a una dosis de 70 mg/Kg de peso en ratas neonatas de la cepa Wistar. En la figura 11a se muestra que

a partir de la semana siete, las ratas diabéticas presentan una disminución estadísticamente significativa en la ganancia de peso corporal en comparación con las ratas controles, además, presentan a partir de la semana cuatro un aumento en el nivel de glucosa en sangre, que se puede definir como hiperglucemia moderada ( $247.70 \pm 14.62$  mg/dL), en comparación, las ratas controles son normoglucémicas ( $117.10 \pm 2.93$  mg/dL), las hiperglucemias en las ratas diabéticas se mantuvieron hasta la semana 14 (Figura 11b). Con el fin de demostrar que nuestro modelo es de diabetes tipo 2 realizamos la prueba de tolerancia a la glucosa, en la gráfica (Figura 11c) observamos que las ratas diabéticas tipo 2 aumentan su glucosa en sangre después de la carga de glucosa de 2g/Kg de peso y tiende a disminuir, sin embargo, se mantiene en hiperglucemia moderada ( $181.60 \pm 31.67$  mg/dL), sin regresar a valores de las ratas controles ( $123.10 \pm 15.77$  mg/dL), esto se conoce como intolerancia a la glucosa. Al mismo tiempo se realizó la prueba de secreción de insulina, en la figura 11d podemos observar que la insulina que se produce en las ratas diabéticas no es suficiente para metabolizar los niveles de glucosa en sangre y por lo tanto se mantienen elevados en la gráfica de tolerancia a la glucosa (Figura 11c), además las ratas diabéticas secretan menos cantidad de insulina después de la carga de glucosa en comparación con las ratas controles, es decir, responden menos a la carga de glucosa en comparación con las controles. Con estos resultados podemos decir que se estableció un modelo de diabetes tipo 2. En los primeros estadios de la nefropatía diabética el riñón tiende a aumentar su tamaño, por lo que una medida indirecta de este dato la tenemos al comparar el peso renal con respecto al peso corporal, este cociente es significativamente más alto en las ratas diabéticas ( $3.586 \pm 0.1373$  mg peso riñón /g peso corporal) en comparación con las ratas controles ( $2.961 \pm 0.073$  mg peso riñón /g peso corporal) (Figura 11e), sugiriendo que hay hipertrofia, sin embargo, se requieren medidas más exactas como las que se obtienen con una tinción de hematoxilina y eosina vista por microscopia de luz. Por último, se sabe que los pacientes diabéticos cursan con hipertensión arterial, por lo tanto, medimos la presión arterial sistólica a las 14 semanas, sin



embargo, a este tiempo nuestras ratas diabéticas no se hicieron hipertensas (Figura 11f).



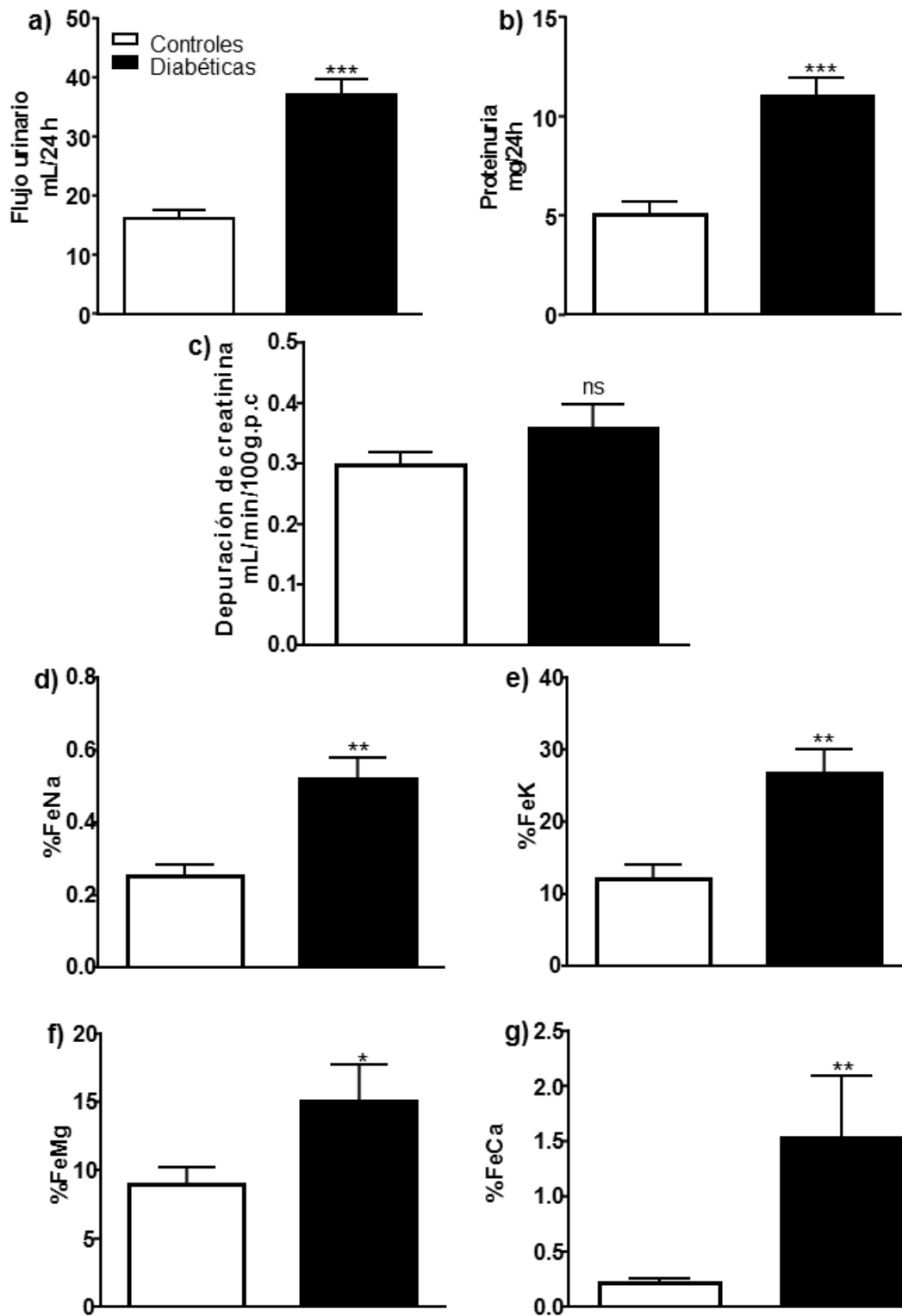
**Figura 11. La administración de STZ en el periodo neonatal de ratas Wistar induce características de la diabetes tipo 2.** Las características que presentan las ratas diabéticas son: a) Disminución en la ganancia de peso corporal, b) hiperglucemias moderadas, c) intolerancia a la glucosa, d) menor secreción de insulina, e) aumento en la masa renal y f) no tienen hipertensión

arterial. Las barras representan el promedio $\pm$ EEM. n = 12, excepto e) n=6. ns: no hay diferencia significativa, \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

## *7.2 EL MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2 PRESENTA ALTERACIÓN EN LA FUNCIÓN RENAL A LAS 14 SEMANAS*

Como segundo objetivo, evaluamos el daño renal presente en el modelo de diabetes tipo 2 a las 14 semanas. En la figura 12a, se observa que las ratas diabéticas presentan un mayor flujo urinario, en los pacientes diabéticos esto se conoce como poliuria. La proteinuria es un marcador de daño renal que sugiere daño a nivel glomerular, las ratas diabéticas presentan un aumento significativo en la proteinuria en comparación con las ratas controles (Figura 12b). Otro marcador que da información acerca de la función renal a nivel glomerular, es la depuración de creatinina, la cual se calcula multiplicando la relación de la concentración de creatinina en orina y suero por el flujo urinario de 24 horas, este valor se normaliza con respecto al peso corporal, una disminución en la depuración de creatinina es un indicio de alteraciones en el proceso de filtración en el glomérulo, las ratas diabéticas tipo 2 no presentan diferencia significativa con respecto a las ratas controles, sin embargo, hay una tendencia a aumentar el valor de depuración de creatinina (Figura 12c), lo que sugiere que hay hiperfiltración, esta es una característica que se presenta en etapas tempranas de nefropatía diabética. Una vez evaluados parámetros de alteración a nivel glomerular, medimos las concentraciones de electrolitos en orina y suero para poder conocer la excreción fraccional de estos, ya que un aumento en este parámetro es indicativo de daño a nivel tubular. Para esto se utilizó la técnica de ICP-OES y los electrolitos que se midieron fueron Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, las ratas diabéticas presentan un aumento en la excreción fraccional de estos iones en comparación con las ratas controles (Figura 12 d,e,f). Con base en estos hallazgos se confirmó que la diabetes tipo 2 indujo disfunción glomerular causando un aumento de proteinuria e hiperfiltración y

disfunción tubular por disminución en la reabsorción de electrolitos que lleva a un aumento en la excreción fraccional de estos.

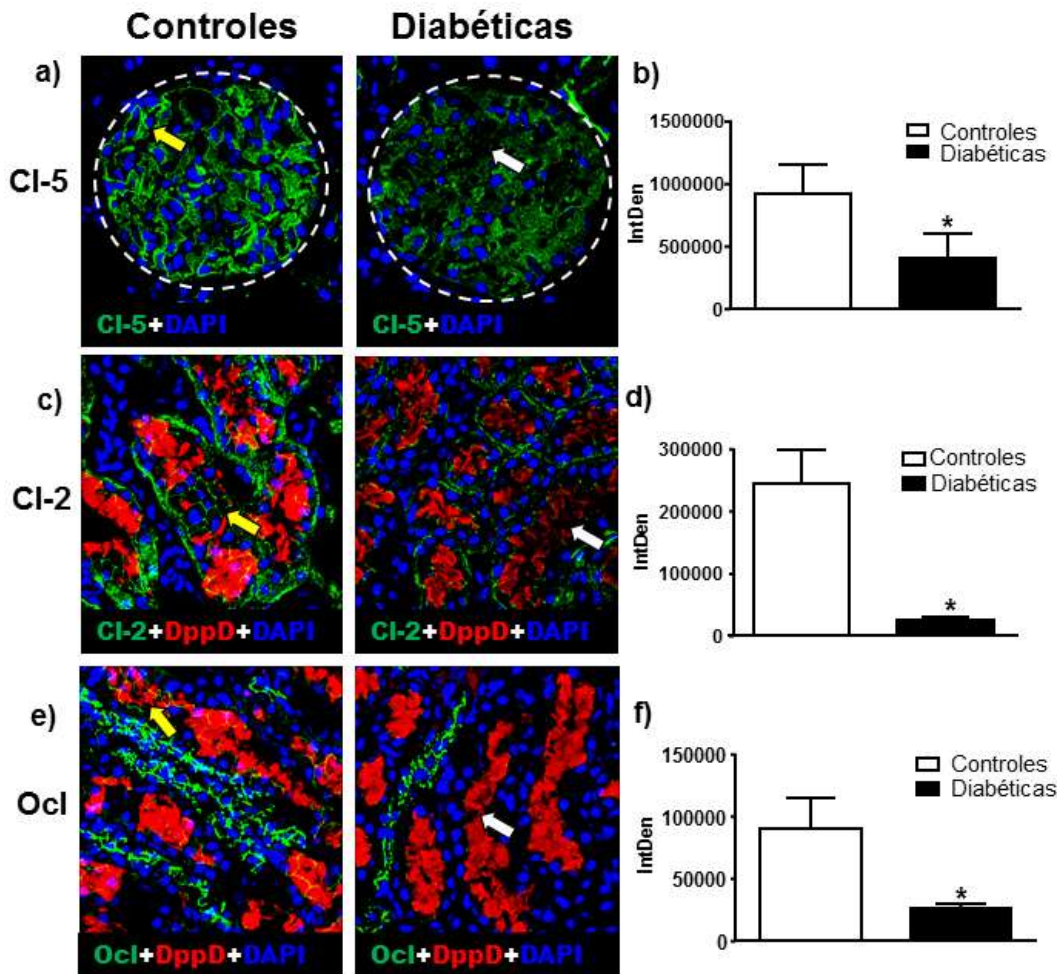


**Figura 12. La diabetes tipo 2 induce alteraciones en la función renal.** Las alteraciones se caracterizan por un aumento en flujo urinario o poliuria (a), proteinuria (b) e hiperfiltración (c), un aumento en la excreción fraccional de sodio (FeNa, inciso d), potasio (FeK, inciso e), magnesio (FeMg, inciso f) y calcio (FeCa, inciso g). Las barras representan el promedio $\pm$ EEM. n = 8-12. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

### **7.3 LA DIABETES TIPO 2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA UNIÓN ESTRECHA: CLAUDINA-5 EN GLOMÉRULO, CLAUDINA-2 Y OCLUDINA EN TÚBULO PROXIMAL.**

Debido a que anteriormente Molina-Jijón y col. observaron que en un modelo de diabetes tipo 1 la disminución de las proteínas de la unión estrecha (UE) claudinas, ZO's y ocludina estaba relacionada con alteraciones en la función renal, analizamos la expresión en glomérulo de claudina-5 y en túbulo proximal de claudina-2 y ocludina para ver si ocurría algo similar en nuestro modelo de diabetes tipo 2. Utilizando la técnica de inmunofluorescencia, se encontró que en las ratas con nefropatía diabética tipo 2 disminuye la expresión de claudina-5 en glomérulo (Figura 13a) y claudina-2 (Figura 13c) y ocludina (Figura 13e) en el túbulo proximal. En la Figura 13a, se observa que en condiciones normales se expresa la claudina-5 en el endotelio glomerular de manera continua (marca verde, flecha amarilla), como marcador de glomérulo se utilizó VE-cadherina (marca roja) y que en condiciones de nefropatía diabética tipo 2, la expresión de la claudina-5 disminuye en este segmento de la nefrona (flecha blanca) (Figura 13a). Por otro lado, se observa que en condiciones controles la claudina-2 y la ocludina presentan el patrón de expresión característico conocido como "malla de gallinero" (marca verde y flecha amarilla) en el túbulo proximal (marcado con DppD, marca roja), y que en condiciones de diabetes tipo 2 desaparece (flecha blanca), estos cambios se confirmaron mediante el análisis semicuantitativo de "IntDen" (suma de los valores de los píxeles en el área de la imagen de selección o el producto del área y el Mean Gray Value) (Figura 13d). Con estos resultados, se concluye que la diabetes tipo 2 al igual que la diabetes tipo 1, altera de manera

diferencial la expresión de estas proteínas de la UE en dos segmentos de la nefrona, glomérulo y túbulo proximal. Estos hallazgos son interesantes ya que nos sugieren que existe una relación entre la pérdida de estas proteínas y las alteraciones en la función renal, como se reportó en el modelo de diabetes tipo 1, la disminución en la expresión de la claudina-5 se puede asociar con la presencia de proteinuria ya que las alteraciones en el endotelio glomerular son la principal causa de proteinuria en la nefropatía diabética tipo 2 y la disminución en la expresión de la claudina-2 explica el aumento en la excreción fraccional de sodio y potasio encontrada en las ratas diabéticas tipo 2.



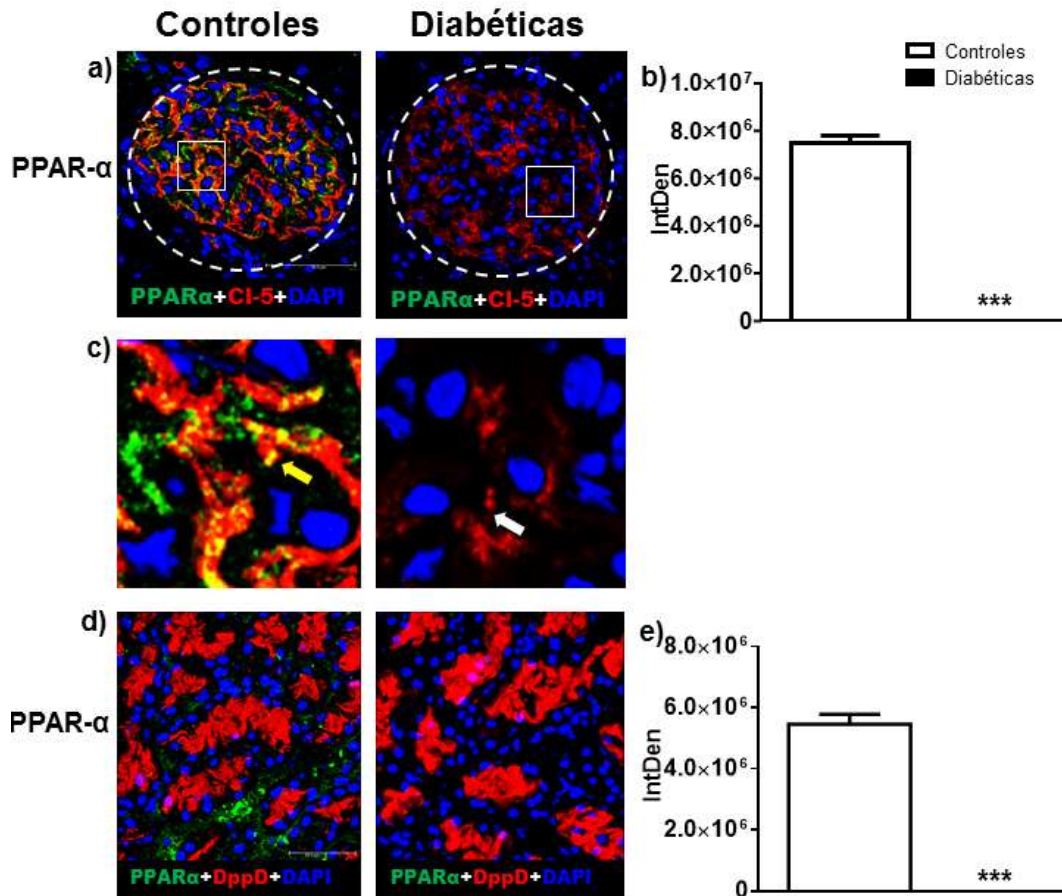
**Figura 13. La diabetes tipo 2 disminuye la expresión de la claudina-5 en glomérulos y de la claudina-2 y la ocludina en túbulos proximales. La**

diabetes tipo 2 disminuyó la expresión de la claudina-5 (a) en glomérulos. La VE-cadherina (marca roja) se utilizó como marcador de los vasos capilares intraglomerulares. Además, la diabetes tipo 2 disminuyó la expresión de la claudina-2 (c) y la ocludina (e) en los túbulos proximales. La dipeptidilpeptidasa (marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. El análisis semicuantitativo se muestra en los incisos b,d y f. Los datos se expresan como densidad integrada (IntDen). Escala = 50  $\mu$ m. Las barras representan el promedio $\pm$ EEM. n = 6. \*p<0.05.

#### *7.4 LA DIABETES TIPO 2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE PPAR-A EN GLOMÉRULO Y TÚBULO PROXIMAL*

Se ha reportado que en condiciones normales en ratas control, utilizando la técnica de hibridación in situ, PPAR- $\alpha$  se localiza en glomérulo y túbulo proximal. Debido a las alteraciones observadas en estos segmentos a causa de la diabetes, pensamos que la expresión de esta isoforma de los PPARs puede estar alterada. Utilizando la técnica de inmunofluorescencia, se encontró que en las ratas diabéticas tipo 2 disminuye drásticamente la expresión de PPAR-  $\alpha$  en glomérulo y en el túbulo proximal (Figura 14). En la Figura 14a, se observa que, en condiciones normales, PPAR- $\alpha$  se expresa en el endotelio glomerular de manera continua (marca verde, flecha amarilla) y co-localiza con claudina-5 (Figura 14c), que se utilizó como marcador de glomérulo (marca en rojo) y que en condiciones de nefropatía diabética tipo 2, la expresión de esta isoforma disminuye e incluso desaparece en este segmento de la nefrona (flecha blanca) (Figura 14d). Se reportó que PPAR- $\alpha$  se encontraba localizado en túbulo proximal en ratas control, sin embargo, con la técnica de inmunofluorescencia, nosotros observamos que esta isoforma (marca verde) no se localiza dentro del túbulo, si no a los alrededores, posiblemente en las células intersticiales que recubren los túbulos. Estos cambios se confirmaron mediante el análisis semicuantitativo de "IntDen" (Figura14e). Con los resultados anteriores, podemos sugerir que existe una

relación entre la alteración en la expresión de claudina-5, claudina-2, ocludina y PPAR- $\alpha$  en estos segmentos de la nefrona y como consecuencia de esto una alteración en la función renal.



**Figura 14. La diabetes tipo 2 disminuye la expresión de PPAR- $\alpha$  en glomérulos y en túbulos proximales.** La diabetes tipo 2 disminuyó la expresión de PPAR- $\alpha$  (a) en glomérulo. Claudina-5 (marca roja) se utilizó como marcador de los vasos capilares intraglomerulares. El inciso c, es un acercamiento a la imagen de glomérulo y túbulo proximal. Además, la diabetes tipo 2 disminuyó la expresión de PPAR- $\alpha$  (d) en los túbulos proximales. La dipeptidilpeptidasa (marca roja) se utilizó como marcador del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. El análisis semicuantitativo se muestra en

los incisos b y e. Los datos se expresan como densidad integrada (IntDen). Escala = 50  $\mu\text{m}$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. n = 6. \*p<0.05.

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de la nefropatía diabética tipo 2 en la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina, así como de PPAR- $\alpha$ , en etapas tempranas de dicha enfermedad.

La diabetes tipo 2 no controlada, tiene como complicación principal la nefropatía diabética, esta complicación renal es severa y a largo plazo induce una enfermedad más grave, la insuficiencia renal. Nosotros consideramos que a las 14 semanas nuestro modelo se encuentra en la etapa temprana de la nefropatía diabética, ya que no se encontraron cambios en la presión arterial y en la depuración de creatinina (Figura 1f y 2c, respectivamente). Entre las alteraciones importantes de la función renal, fueron la proteinuria y el aumento en la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Se sabe que en etapas tempranas existe un desbalance en el manejo renal de electrolitos, en nuestro caso, debido a que no hubo cambios en la filtración glomerular (depuración de creatinina) o en la carga filtrada, este hallazgo indica alteraciones en la reabsorción de estos electrolitos por disfunción tubular.

Se ha descrito que casi un tercio del sodio filtrado se reabsorbe a través de la vía paracelular por acción de claudina-2, una proteína de la unión estrecha, que actúa como un canal para sodio y agua en el túbulo proximal renal (Kiuchi-Saishin et al., 2002; Rosenthal et al., 2010). La pérdida de claudina-2 disminuye la reabsorción de sodio (Yu, 2015). Esto concuerda con la alteración en la regulación de sodio y la disminución en la expresión renal de claudina-2 en los túbulos proximales de las ratas diabéticas. Además, se sabe que claudina-2 también regula la reabsorción de potasio y calcio en ese segmento de la nefrona (Mount, 2016). Esto sugiere que la pérdida de claudina-2 podría explicar parcialmente el aumento en la excreción fraccional de estos



electrolitos. Para el caso de magnesio, su mayor porcentaje de reabsorción (60%) se realiza a través de la vía paracelular por acción de claudina-16 o también conocida como paracelina, una proteína de la unión estrecha, que forma un poro selectivo para cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) en la rama ascendente del asa de Henle (Gong & Hou, 2017; Simon et al., 1999). Esta claudina no fue evaluada en este trabajo, sin embargo, el aumento en la excreción fraccional de calcio y magnesio, nos sugieren evaluar en trabajos futuros, si existe una disminución en la expresión renal de esta proteína.

La proteinuria se ha utilizado como marcador temprano de la nefropatía diabética (Najafian & Mauer, 2009). En el presente estudio, se encontró una disminución de la expresión de claudina-5 glomerular (en endotelio y podocitos), Molina-Jijón y col. encontraron que la pérdida de claudina-5 en los podocitos, que son los principales constituyentes de la barrera de filtración glomerular (Koda et al., 2011), podría explicar un posible mecanismo que conduce a la proteinuria temprana en el estado diabético. Por otra parte, la pérdida de claudina-5 endotelial podría explicar la disfunción endotelial temprana reportada en pacientes diabéticos (Molina-Jijón, Rodríguez-Muñoz, Namorado, Pedraza-Chaverri, & Reyes, 2014).

Estos hallazgos en un modelo de diabetes tipo 2, concuerdan con lo observados en el modelo de diabetes tipo 1 (Molina-Jijón et al., 2014) y sugieren que la diabetes afecta diferencialmente la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudinas 2 y 5 y ocludina a nivel de glomérulo y túbulo proximal y que los cambios en su expresión podrían estar asociados al establecimiento de la etapa temprana de la diabetes. A su vez, estos cambios podrían explicar parcialmente las alteraciones funcionales observadas en la regulación de los electrolitos.

Hay pocos trabajos acerca de los mecanismos que provoquen la disminución en la expresión de claudina-5, claudina-2 y ocludina en la diabetes, a continuación enunciaré algunos: 1) La acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés), debido a la hiperglucemia

crónica, puede aumentar la permeabilidad microvascular a partir del desensamble de las proteínas de la unión estrecha, dando lugar a la presencia de proteinuria y otros síntomas de la nefropatía diabética. El mecanismo propuesto es que los AGEs regulan a la alza la actividad de las metaloproteinasas (MMP 2/9), se sabe que claudina-5 y ocludina tienen un sitio de corte putativo extracelular para MMP que permite su proteólisis, por lo tanto se ve disminuida la expresión de estas proteínas de la unión estrecha en una condición de hiperglucemia (Luo, P., Peng, H., Li, C., Ye, Z., Tang, H., Tang, Y. ... Lou, 2015); 2) Modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, ocurren en las proteínas de la unión estrecha. Cinasas y fosfatasas como PKC, ERK1/2 y PI3K, están involucradas en la fosforilación y como consecuencia la degradación de claudina-2 y ocludina (González-Mariscal et al., 2008). Sin embargo, los estudios en donde se ha evaluado su papel han sido en estudios *in vitro*, el único estudio *in vivo* en diabetes tipo 1 involucra la fosforilación y posterior degradación de claudina-2 por acción de la isoforma beta de PKC (PKC- $\beta$ ) (Molina-Jijón et al., 2014). PKC, está involucrada en el manejo del tono vascular y, por lo tanto, regula el flujo sanguíneo. En condiciones hiperglucémicas, la activación de PKC se incrementa, dando lugar a la vasoconstricción. El aumento de PKC también puede regular la actividad de otras proteínas tales como VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), NF- $\kappa$ B y NADPH oxidasa, dando lugar a otras complicaciones tales como fibrosis y aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); y 3) El estrés oxidante también está involucrado en la regulación de las proteínas de la unión estrecha, el peroxinitrito generado por el desacople de eNOS provoca la nitración en el residuo de tirosina de claudina-2 (Molina-Jijón et al., 2014), esto sugiere que las proteínas de la unión estrecha pueden ser blanco del estrés oxidante provocado por la hiperglucemia crónica en la diabetes.

Considerando lo anterior, se sabe que la estimulación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs, específicamente la isoforma PPAR- $\alpha$ , tiene un efecto nefroprotector, a partir de la reducción de la inflamación renal, por la transrepresión de NF- $\kappa$ B, previene el desacople de la eNOS, disminuye la producción de ROS, previene la fibrosis y tiene actividad antioxidante por acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Balakumar, Kadian, & Mahadevan, 2012). Esto nos sugiere que la disminución en la expresión renal de esta isoforma en los segmentos de la nefrona (glomérulo y túbulo proximal) donde existe una pérdida de las proteínas de la unión estrecha claudinas 2 y 5 y ocludina debido a la diabetes, puede estar favoreciendo el aumento de los mecanismos anteriormente mencionados que disminuyen la expresión de las proteínas de la unión estrecha. Esto concuerda con lo observado en un modelo murino de diabetes tipo 2, en el que en ratones db/db disminuye la expresión y la actividad renal de esta isoforma y como consecuencia hay un aumento en la progresión de la nefropatía diabética (Park et al., 2006).

Por lo tanto, se puede sugerir que existe una relación entre la pérdida de la expresión renal de PPAR- $\alpha$  y la disminución de la expresión renal de claudinas 2 y 5 y ocludina, que puede estar constituyendo una parte fundamental en el inicio de la nefropatía diabética tipo 2.

## **9. CONCLUSIONES**

El presente trabajo aporta evidencia de que la diabetes tipo 2 altera la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-5, claudina-2 y ocludina, así como la de PPAR- $\alpha$ . Esto se relaciona con la pérdida de la función renal, por lo que se sugiere que la pérdida de estas proteínas es parte fundamental en las primeras etapas de la nefropatía diabética tipo 2.

## 10. PERSPECTIVAS

Debido a que nuestro estudio se limita a evaluar solo la expresión renal de las proteínas con la técnica de inmunofluorescencia se pretende corroborar los cambios en la expresión con la técnica de Western Blot en homogenados de glomérulos y túbulos proximales aislados. Por otro lado, se pretende evaluar si la estimulación de los PPAR- $\alpha$  a las 12 semanas, utilizando un agonista exógeno, evita la pérdida de la expresión de esta isoforma a la semana 14 en las ratas diabéticas y si esto se relaciona con una mejora en la expresión renal de las proteínas de la unión estrecha evaluadas en este trabajo a partir de un mecanismo directo por la regulación a nivel transcripcional y/o un mecanismo indirecto a partir de la participación de vías de señalización. Además, si este pre-tratamiento detiene las alteraciones funcionales presentes por la nefropatía diabética en etapas tempranas de dicha enfermedad.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 24), 4969–4976. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- Balakumar, P., Kadian, S., & Mahadevan, N. (2012). Are PPAR alpha agonists a rational therapeutic strategy for preventing abnormalities of the diabetic kidney? *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 65(4), 430–6. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.01.004>
- Cheng, C.-F., Chen, H.-H., & Lin, H. (2010). Role of PPAR $\alpha$  and Its Agonist in Renal Diseases. *PPAR Research*, 2010, 345098. <https://doi.org/10.1155/2010/345098>

- Fox, S. . (2008). *Fisiología Humana. 10a. edición, Editorial M.-H. Interamericana. Madrid.* <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Gong, Y., & Hou, J. (2017). Claudins in barrier and transport function—the kidney. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1906-6>
- González-Mariscal, L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., & Bautista, P. (2012). Tight junctions. In *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology* (pp. 3–30). <https://doi.org/10.5772/35166>
- González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Guan, Y. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 15(11), 2801–15.* <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000139067.83419.46>
- International Diabetes Federation. (2006). *Diabetes Atlas - third edition. Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53).* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care, 21(9), 1414–1431.* <https://doi.org/10.2337/diacare.21.9.1414>
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., & Tsukita, S. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 13(4), 875–886.*
- Koda, R., Zhao, L., Yaoita, E., Yoshida, Y., Tsukita, S., Tamura, A., ... Yamamoto, T. (2011). Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell and Tissue Research, 343(3), 637–648.*

<https://doi.org/10.1007/s00441-010-1117-y>

- Luo, P., Peng, H., Li, C., Ye, Z., Tang, H., Tang, Y. ... Lou, T. (2015). Advanced glycation end products induce glomerular endothelial cell hyperpermeability by upregulating matrix metalloproteinase activity. *Molecular Medicine Reports*, 11, 4447–4453.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3269>
- Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Namorado, M. del C., Bautista-García, P., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. L. (2015). All-trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(5), 441–454.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.11.018>
- Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Namorado, M. D. C., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. L. (2014). Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radical Biology & Medicine*, 72C, 162–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040>
- Mount, D. B. (2016). *Transport of Sodium, Chloride, and Potassium. Brenner and Rector's The Kidney, 2-Volume Set*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4836-5.00006-0>
- Najafian, B., & Mauer, M. (2009). Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.08.024>
- Oidor-Chan, V. H., Hong, E., Pérez-Severiano, F., Montes, S., Torres-Narvaéz, J. C., Del Valle-Mondragón, L., ... Sánchez-Mendoza, A. (2016). Fenofibrate plus Metformin Produces Cardioprotection in a Type 2 Diabetes and Acute Myocardial Infarction Model. *PPAR Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8237264>
- OMS. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes*. WHO. Retrieved from

<http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>

- Pan American Health Organization. (2010). The U.S.–Mexico Border Diabetes Prevention and Control Project: prevalence study of type 2 diabetes and its risk factors. *PAHO El Paso, Tx*.
- Park, C. W., Zhang, Y., Zhang, X., Wu, J., Chen, L., Cha, D. R., ... Guan, Y. (2006). PPARalpha agonist fenofibrate improves diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney International*, 69(9), 1511–7. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000209>
- Portha, B., Blondel, O., Serradas, P., McEvoy, R., Giroix, M. H., Kergoat, M., & Bailbe, D. (1989). The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab*. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2525491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2525491)
- Reyes, J. L., Lamas, M., Martin, D., Namorado, M. D. C., Islas, S., Luna, J., ... González-Mariscal, L. (2002). The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney International*, 62(2), 476–487. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00479.x>
- Robinson, E., & Grieve, D. J. (2009). Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(3), 246–63. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.03.003>
- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J.-D., Amasheh, S., ... Fromm, M. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 11), 1913–1921. <https://doi.org/10.1242/jcs.060665>
- Schiffrin, E. L., Amiri, F., Benkirane, K., Iglarz, M., & Diep, Q. N. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: Vascular and cardiac effects in hypertension. In *Hypertension* (Vol. 42, pp. 664–668). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000084370.74777.B6>

- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., ... Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*, *285*(5424), 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
- Srinivasan, K., & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*.
- Tesch, G. H., & Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (methods in renal research). *Nephrology*, *12*(3), 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x>
- Yu, A. S. L. (2015). Claudins and the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1681/asn.2014030284>
- Yu, A. S. L., Cheng, M. H., Angelow, S., Günzel, D., Kanzawa, S. A., Schneeberger, E. E., ... Coalson, R. D. (2009). Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *The Journal of General Physiology*, *133*(1), 111–27. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810154>