



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**



**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Relación entre hipermagnesuria y claudina 16  
en diabetes experimental tipo 1.”**

**Tesis**

Que presenta

**Médico Cirujano y Partero María del Rocío Encarnación García**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias**

En la Especialidad  
**Fisiología Celular y Molecular**

Directores de tesis:

**Dr. José Luis Reyes Sánchez (Cinvestav)  
Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez (INCICH)**

Ciudad de México

Agosto, 2019

*“Tal es la esencia de la ciencia: plantéese una pregunta impertinente  
y se está en camino de obtener una respuesta pertinente.”*

**Jacob Bronowski**

### **Dedicatoria**

A Dios.

A mis padres, porque sin su amor, apoyo, sacrificio, comprensión, educación, paciencia y confianza esto no habría sido posible. Los amo infinitamente.

A Betty y Marielita, por todo su amor, tolerancia, apoyo y confianza. Las amo hermanitas.

A mis abuelos Leonor, Amalia y Juan; de quienes siempre tuve amor y comprensión.

A Cesar, porque siempre me apoyo en esta locura de la ciencia.

A mi Pancho, sé que desde donde estés, estarías feliz y orgulloso.

## **Agradecimientos**

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

A mi tutor, Dr. José Luis Reyes Sánchez, por confiar en mí, por aceptarme en su laboratorio y por lograr despertar mi interés por la nefrología, gracias por todas sus enseñanzas, por tu comprensión y su paciencia.

A mi tutora la Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez, por aceptarme en su laboratorio, por todos los consejos, por todas las enseñanzas y sobre todo por toda la paciencia, gracias por recordarme siempre que la constancia y la dedicación son la clave para tener buenos resultados.

Agradezco a mis asesores de tesis, por sus comentarios, correcciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer el trabajo. Dr. Marcos Nahmad Bensusan y Dr. Fanis Missirlis, gracias por todo.

A los auxiliares de investigación de CINVESTAV Zacatenco, Dr. Rafael Rodríguez Muñoz, Q.F.B Carmen Namorado Tónix por todo su apoyo en el laboratorio, por compartir su experiencia y conocimientos conmigo, por su compromiso con éste trabajo y sus contribuciones intelectuales. Agradezco a la secretaria Esther Vargas por todas las facilidades y el apoyo brindado en mi estancia en el laboratorio.

Gracias a la Q.F.B Elsa Irene Sánchez Montes de Oca por su apoyo, sus consejos, observaciones y contribuciones al proyecto, pero sobre todo gracias por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio: Dr. Pérez, Q.F.I. Luis Hernández, M. en C. Andrea Cetina, M. en C. Brenda Luna, M. en C. Edith Sierra, M. en C. Marlenne Terán, por su apoyo, consejos, su orientación, por compartirme sus experiencias y por sus enseñanzas. M. en C. Lorena Rosas, Loretta gracias por todas tus enseñanzas (sin tu ayuda nunca hubiese podido agarrar una rata y mucho menos aprender todo lo que aprendí), gracias por tu paciencia, los artículos, por escucharme, gracias por conducir prudentemente cuando iba contigo y sobre todo por ser una excelente amiga.

Gracias a todos los investigadores, personal de apoyo y alumnos del departamento de farmacología del INCICH, dónde siempre encontré un excelente ambiente de trabajo y que contribuyeron con ideas al desarrollo del proyecto. Especialmente gracias a la MC. Fabiola Cortes, en quien encontré a una amiga entrañable.

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, especialmente a Jyotsna, Miguel, Adán, Isabel Santos y Elizabeth Díaz (doctorado), de quienes aprendí muchas cosas y en quienes siempre encontré un gran apoyo. Gracias por todo su cariño, comprensión y amistad.

A los alumnos y personal del laboratorio del Dr. Fanis Missirlis, por todas las facilidades, orientación y apoyo en la medición de iones por ICP-OES.

A mis roomies Berenice Barrón, Mariana Rosales y Minerva Araiza, por siempre escucharme, por ser un ejemplo de vida, por ayudarme y por brindarme la familia no consanguínea más hermosa que pudiera haber imaginado.

A mis amigas Karen Tapia, Roxana Romero e Irma Rivera Malagón, porque en ellas encontré apoyo sincero, incondicional, referencias bibliográficas que desconocía y porque son un ejemplo de constancia y trabajo duro.

A mi familia, porque siempre han confiado en mis capacidades y apoyado mis sueños. Gracias por ser mi ejemplo, mi guía y mi ancla.

A Cesar, gracias por aguantar tantas platicas de magnesio y diabetes, gracias por comprenderme, por tu paciencia, tu amor, tu apoyo incondicional y por siempre estar a mi lado.

## Índice

<b>1</b>	<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Anatomía y fisiología renal.</b>	<b>8</b>
<b>3.2</b>	<b>La nefrona: unidad funcional del riñón.</b>	<b>10</b>
3.2.1	Filtración glomerular: el glomérulo y el mesangio.	11
3.2.1.1	Glomérulo	11
3.2.1.2	Mesangio	11
3.2.1.3	Filtración glomerular (FG)	12
<b>3.3</b>	<b>Reabsorción y secreción tubular renal: el papel del sistema tubular renal.</b>	<b>12</b>
3.3.1	Túbulos proximales	13
3.3.2	Asa de Henle	13
3.3.3	Túbulo distal	14
3.3.4	Conductos colectores	14
3.3.5	Cuantificación de la función renal	15
<b>3.4</b>	<b>Diabetes mellitus</b>	<b>16</b>
3.4.1	Definición.	16
3.4.2	Clasificación	16
3.4.3	Diagnóstico	17
3.4.4	Complicaciones de la diabetes mellitus	18
3.4.5	Nefropatía diabética	19
3.4.6	Modelos experimentales de Diabetes mellitus tipo 1	21
<b>3.5</b>	<b>Magnesio</b>	<b>21</b>
3.5.1	Manejo renal del magnesio	22
3.5.2	Transporte paracelular, unión estrecha y claudinas.	23
3.5.3	Asa ascendente gruesa de Henle: Claudina 16 (paracelina-1) y claudina 19	24
3.5.4	Transporte transcelular de magnesio: el papel del TRPM6	26
3.5.5	Magnesio y sus implicaciones en Diabetes mellitus	27
<b>4</b>	<b>Justificación</b>	<b>29</b>

<b>5</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
6.1	Objetivo general	30
6.2	Objetivos particulares	30
<b>7</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>31</b>
7.1	Modelo experimental	31
7.1.1	Diabetes tipo 1	31
7.2	Metodología	32
7.2.1	Obtención de la muestra	32
7.2.2	Determinación de electrolitos por espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).	33
7.2.3	Función renal: determinación de depuración de creatinina, proteinuria y fracción excretada de los iones.	34
7.2.4	Western blot	34
7.2.5	Inmunofluorescencia	36
7.2.6	Análisis estadístico	37
<b>8</b>	<b>Resultados.</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>Discusión</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Conclusión</b>	<b>47</b>
<b>11</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>47</b>
<b>12</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>48</b>

## 1 Resumen

La Diabetes se caracteriza por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina; la hiperglucemia crónica se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos. En México las complicaciones de la diabetes mellitus son la segunda causa de muerte, de ahí la importancia de conocer los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad.

El magnesio es el segundo catión divalente intracelular más abundante, y desempeña un papel fisiológico esencial participando en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>, como cofactor en varias reacciones enzimáticas y modulando la actividad de canales y transportadores de membrana. Entre el 50 al 70% del magnesio filtrado, se reabsorbe en la rama ascendente gruesa del asa de Henle por la ruta paracelular formada por las proteínas de la unión estrecha: claudina-16, claudina-19 y claudina-14, las cuales desempeñan un papel clave en la selectividad y conductancia paracelular de los iones calcio y magnesio

En las últimas décadas, la hipermagnesuria se ha asociado fuertemente con la diabetes mellitus.

Se ha descrito que la hiperglicemia induce alteraciones en la expresión de las proteínas de la unión estrecha como claudina-5 y claudina-2 induciendo aumento en la proteinuria y en la excreción fraccional de sodio, respectivamente. En el presente trabajo se evidencia que en un modelo de diabetes tipo 1, la claudina 16 se deslocaliza y su expresión disminuye en el asa ascendente gruesa de Henle, relacionándose con una disminución de la reabsorción de magnesio y calcio, teniendo como consecuencia final un aumento en la fracción excretada de magnesio y calcio.

## 2 Abstract

The diabetes is characterized by hyperglycemia resulting from defects in the secretion and/or action of insulin; the chronic hyperglycemia is associated with damage, dysfunction and failure of several organs. In Mexico the complications of diabetes mellitus are the second cause of death, hence the importance of knowing the mechanisms involved in the pathogenesis of the disease.

The magnesium is the second most abundant intracellular divalent cation and plays an essential physiological role by participating in the ATP /  $Mg^{2+}$  complex, as a cofactor in several enzymatic reactions and modulating the activity of membrane channels and transporters. In the kidney,  $Mg^{2+}$  is reabsorbed in ~60% at the thick ascending limb of Henle by the paracellular transport formed by claudin-16, claudin-19 and claudin-14.

Recently, hypermagnesuria has been strongly associated with diabetes mellitus.

It has been described that hyperglycemia induces alterations on the expression of tight junction proteins as claudin-5 and claudin-2 inducing an increase in proteinuria and fractional excretion of sodium, respectively; At the present work, we show that in a type 1 diabetes model, the expression of the claudin-16 protein is delocalizes and diminished at the thick ascending limb of Henle, being related to a decrease in the reabsorption of magnesium and calcium, having as a final consequence an increase in the excreted fraction of those ions.

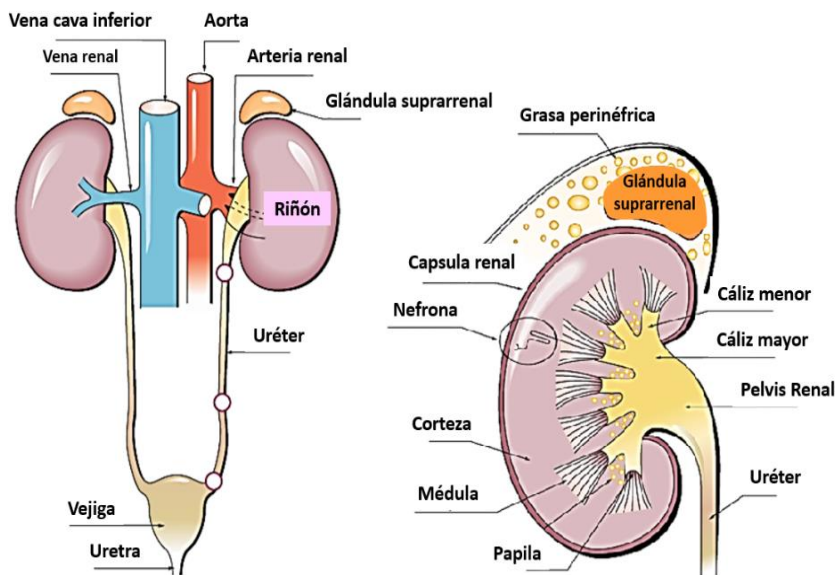


### 3 Introducción

#### 3.1 Anatomía y fisiología renal.

La supervivencia y función adecuadas de las células en los mamíferos depende del mantenimiento de concentraciones estables de los solutos, pH y agua en el medio intra y extracelular. Además se requiere de la eliminación constante de desechos metabólicos. Los riñones juegan un papel central en el mantenimiento de esta homeostasis.

Los riñones son un par de órganos retroperitoneales que normalmente se encuentran uno a cada lado de la columna vertebral. En el humano, el polo superior de cada riñón se encuentra a nivel de duodécima vértebra torácica, y el polo inferior se encuentra en la tercera vértebra lumbar [1]. En la superficie medial o cóncava de cada riñón hay una hendidura, llamada hilio, en donde se localizan la arteria y la vena renales, los vasos linfáticos, la inervación y el uréter, que transporta la orina desde el riñón hasta la vejiga; además cada riñón está rodeado por una cápsula fibrosa resistente y delgada. Figura 1 [2].



**Figura 1.** Organización general de los riñones y del sistema urinario. Tomado de O'Callaghan, 2000.

Si se realiza un corte coronal a los riñones, se pueden distinguir dos regiones: una externa y pálida llamada corteza y una más oscura e interna; la médula. La médula se divide en masas de tejido en forma de cono llamadas pirámides renales; la base de cada pirámide se origina en los

límites con la corteza y el vértice termina en la papila, que se proyecta en el espacio

de la pelvis renal, una continuación de la porción superior del uréter. El borde externo de la pelvis se divide en regiones llamadas cálices mayores, que se extienden hacia abajo y se dividen en los cálices menores, que recogen la orina de los túbulos que terminan en cada papila. Ahí la orina es transportada hacia la vejiga por estructuras llamadas uréteres; la vejiga es un receptáculo muscular en donde se almacena orina en cantidad suficiente para despertar el reflejo de la micción y finalmente salir a través de la uretra.

La irrigación de cada riñón depende de las arterias renales izquierda y derecha, que entran al riñón a través del hilio y después se ramifican progresivamente para formar las arterias interlobares, las arterias arciformes, arterias interlobulillares y las arterias aferentes que dan origen a los capilares glomerulares, donde se lleva a cabo el proceso de filtración (primer paso de la formación de orina) ya que a éste nivel la presión hidrostática es alta (60 mmHg) lo que permite que el proceso sea rápido, posteriormente dichos capilares se unen para formar la arteriola eferente que da origen a la segunda red capilar del riñón: los capilares peritubulares, los cuales están dispuestos alrededor del sistema tubular renal y donde la presión hidrostática disminuye hasta 13 mmHg aproximadamente, con lo cual se permite una reabsorción rápida de líquido. La regulación de la presión hidrostática de estos dos sistemas capilares se logra mediante el ajuste de la resistencia de las arteriolas aferente y eferente, con lo que el riñón puede cambiar el filtrado glomerular, la reabsorción tubular o ambas en función de las demandas homeostáticas del cuerpo [3].

Los capilares peritubulares desembocan en los vasos del sistema venoso que forman progresivamente venas de mayor calibre y que finalmente salen en forma de vena renal a través del hilio.

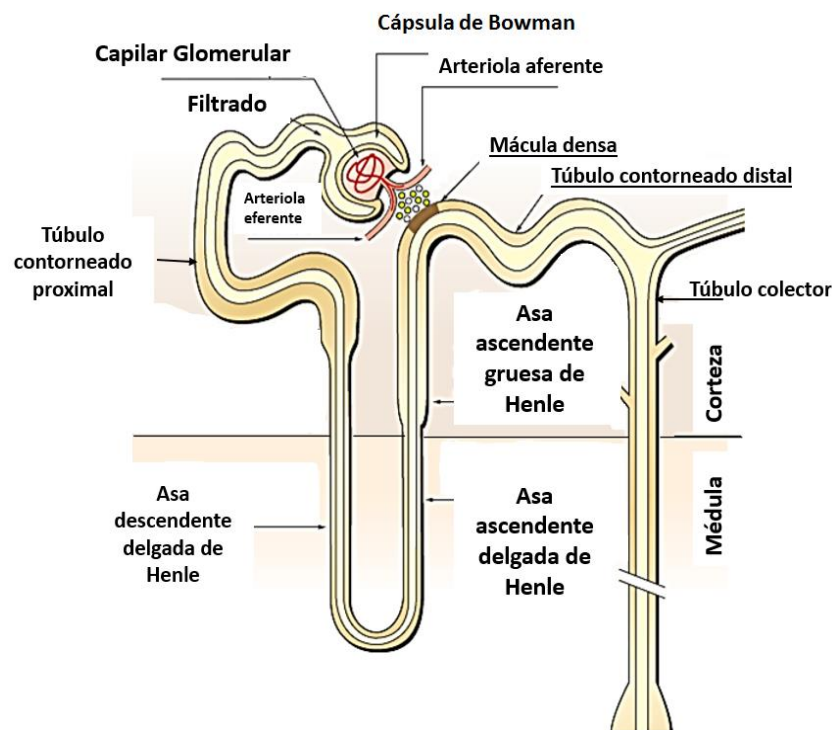
A ésta disposición de órganos la conocemos como sistema excretor y es el encargado de mantener, entre otras funciones, el balance de los solutos y agua corporales (regulación de la osmolaridad del líquido corporal), así como el aclaramiento de sustancias de desecho tales como productos del metabolismo de proteínas (urea), de la creatina muscular (creatinina), de los ácidos nucleicos (ácido

úrico), productos finales del metabolismo de la hemoglobina (urobilinógeno y bilirrubina), los metabolitos de diversas hormonas y xenobióticos.

Además de estas funciones los riñones también ejercen otras como: 1) regulación de la presión arterial (regulación de las concentraciones de sodio y de secreción renina), 2) regulación del equilibrio ácido-básico mediante la excreción de ácidos y la regulación de las reservas de amortiguadores de los fluidos corporales, 3) regulación de la producción de eritrocitos (secreción de eritropoyetina), 4) regulación de la producción de 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, y 5) gluconeogénesis durante el ayuno prolongado.

### 3.2 La nefrona: unidad funcional del riñón.

Dentro de cada riñón humano podemos encontrar alrededor de un millón de unidades funcionales (unidad más pequeña dentro de un órgano capaz de realizar todas las funciones de éste), denominadas nefrona, las cuales se encuentran unidas por tejido conjuntivo (estroma). El arreglo estructural de las nefronas da lugar a las



dos regiones antes mencionadas: corteza y médula. Cada nefrona contiene dos componentes: 1) componente vascular, un ovillo de capilares denominado glomérulo encargado de la filtración; 2) componente tubular, en el que el líquido filtrado se convierte en orina en su camino a la pelvis del riñón [2] (Figura 2).

**Figura 2.** La nefrona es la unidad anatómica y funcional del riñón. Tomado de O'Callaghan, 2000.

El glomérulo contiene una red de capilares, posee una presión hidrostática elevada; y todo el glomérulo está rodeado por la cápsula de Bowman; el líquido filtrado desde los capilares pasa a la cápsula de Bowman y después al túbulo proximal que se encuentra en la corteza renal. Desde este punto el líquido fluye hacia el asa de Henle que desciende (Rama descendente delgada de Henle) hasta la médula renal para después ascender (rama ascendente gruesa del asa de Henle) hasta la corteza, la pared del asa engrosa y se convierte en el asa ascendente gruesa de Henle. Al final de esta sección se encuentra una zona de células epiteliales especializadas denominada mácula densa; posteriormente el líquido discurre hacia el túbulo distal, a éste le sigue el túbulo conector y posteriormente el colector. Los conductos colectores se funden entre sí para dar origen a túbulos de mayor calibre que finalmente desembocan en la pelvis renal.

Tres procesos están involucrados en la función renal: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular; la suma de los tres procesos determina la intensidad con la que se excretan diferentes sustancias en la orina. En general la reabsorción tubular es cuantitativamente más importantes que la secreción tubular en la formación de la orina, pero la secreción es importante para determinar las cantidades de iones potasio e hidrogeno y algunas otras sustancias, así como en la eliminación de xenobióticos [1,2].

### 3.2.1 Filtración glomerular: el glomérulo y el mesangio.

#### 3.2.1.1 Glomérulo

El glomérulo es la estructura capilar donde tiene lugar la primera fase de la formación de orina; el plasma se filtra a través de la pared capilar glomerular a la cápsula de Bowman. La composición del ultrafiltrado que llega a la cápsula de Bowman depende de la barrera de filtración, que tiene tres capas: 1) células endoteliales del capilar glomerular, 2) membrana basal (modula la filtración de proteínas) y 3) células epiteliales de la cápsula de Bowman (podocitos).

#### 3.2.1.2 Mesangio

El mesangio también es una parte del corpúsculo renal y consiste en dos componentes: 1) Células mesangiales, 2) Matriz mesangial.

Las células mesangiales rodean a los capilares glomerulares y tienen una función similar a la de los macrófagos, aportan soporte estructural a los capilares, secretan la matriz extracelular y secretan prostaglandinas.

Las células mesangiales son contráctiles, lo que contribuye a regular el flujo sanguíneo de los capilares glomerulares y el área de los capilares, aumentando o disminuyendo la filtración glomerular.

### 3.2.1.3 Filtración glomerular (FG)

La composición del filtrado glomerular es casi idéntica a la del plasma (0.03% de proteínas). En un humano sano de 1.73 m<sup>2</sup> de superficie corporal, la FG es normalmente de 125 ml/min, o un 20% del flujo plasmático renal. Está determinada por la presión de filtración neta a través de los capilares y el coeficiente de filtración capilar glomerular que es producto de la permeabilidad y la superficie de los capilares. La presión de filtración neta es la suma de las fuerzas hidrostáticas y coloidosmótica que actúan a través de los capilares glomerulares, e incluye 1) la presión hidrostática glomerular, 2) la presión hidrostática en la cápsula de Bowman, 3) la presión coloidosmótica en el capilar glomerular, 4) la presión coloidosmótica en la capsula de Bowman y 5) la presión intratubular.

Los determinantes de la FG que son más variables y están sujetos al control fisiológico son la presión hidrostática glomerular y la presión coloidosmótica capilar glomerular. Estas variables a su vez, están influenciadas por el sistema nervioso simpático, algunas hormonas y los autacoides. Otros factores que alteran el flujo sanguíneo renal y la FG son: 1) ingesta elevada de proteínas, que aumenta el flujo sanguíneo renal y la FG; 2) los glucocorticoides, con aumento de FG, 3) fiebre, aumento del FG, 4) envejecimiento, disminución de la FG, 5) hiperglicemia, aumento del flujo sanguíneo renal y de la FG [2].

### 3.3 Reabsorción y secreción tubular renal: el papel del sistema tubular renal.

Una vez que el filtrado glomerular se ha formado, pasa a la luz de la nefrona; durante este recorrido algunas sustancias se reabsorben en los túbulos volviendo a la

sangre por el capilar peritubular, mientras que otras se secretan desde la sangre a los túbulos hasta conformar la orina.

En los procesos que tienen lugar en la nefrona y que dan por resultado la excreción de una sustancia, participan dos tipos de transporte de solutos: 1) movimiento paracelular, a través de las uniones estrechas. Éste se produce por gradientes de concentración, eléctrico y osmótico y está mediado por las claudinas; 2) Movimiento transcelular.

Algunas sustancia que se filtran, como la glucosa y los aminoácidos, se reabsorben del todo en los túbulos, por lo que excreción urinaria es prácticamente nula. La mayor parte de los iones del plasma (sodio, cloro y bicarbonato) se reabsorben en los túbulos pero su absorción y excreción urinarias varían dependiendo de las necesidades del organismo. Por otro lado los productos de desecho se absorben en grado variable en los túbulos y se excretan en cantidades relativamente grandes. Por lo tanto la reabsorción tubular es muy selectiva y permite que los riñones regulen la excreción de sustancias de manera independiente unas de otras.

### 3.3.1 Túbulos proximales

El 65% de la carga filtrada de agua, sodio, cloruro, potasio y varios electrolitos más se reabsorbe en los túbulos proximales. Por lo tanto una de las funciones importantes de esta porción de la nefrona es conservar a las sustancias que el cuerpo necesita (glucosa, aminoácidos, proteínas, agua y electrolitos).

### 3.3.2 Asa de Henle

Esta porción de la nefrona es importante en el mantenimiento de la concentración de la orina. La porción descendente fina es muy permeable al agua, que se reabsorbe con rapidez desde el líquido tubular hacia el intersticio hiperosmótico (la osmolaridad aumenta hasta 1200-1400 mOsm/L en el interior de la medula renal; alrededor del 20% del volumen del filtrado glomerular se reabsorbe en la rama descendente final del asa de Henle, con lo que el líquido tubular se torna hiperosmótico a medida que se desplaza hacia la zona más interna de la médula. En el siguiente segmento (fino y grueso ascendente) la permeabilidad al agua es

prácticamente nula, en este sitio se reabsorben grandes cantidades de sodio (relacionada por la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en la membrana basolateral), cloruro y potasio (cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ ), el líquido tubular se diluye a medida que vuelve a la corteza [2]. En la rama ascendente gruesa también se absorben cantidades considerables de otros iones como calcio (Claudina 16, Claudina 19), bicarbonato y magnesio (claudina 16, Claudina 19).

### 3.3.3 Túbulo distal

La porción inicial del túbulo distal forma parte del complejo yuxtaglomerular, que proporciona un control de la retroalimentación del FG y el flujo sanguíneo renal. La siguiente parte del túbulo reabsorbe con acidez la mayoría de los iones, pero es casi impermeable al agua y urea; también en este segmento se lleva a cabo una parte de la reabsorción del magnesio por parte del canal TRPM6; además el cotransportador Sodio/Cloro desplaza el cloruro de sodio desde la luz del túbulo hacia las células epiteliales.

En la segunda porción del túbulo distal y el túbulo colector se absorben el sodio y el agua desde la luz y secretan el potasio hacia la luz (células principales) y se reabsorben iones potasio y se secretan iones hidrogeno a la luz tubular (células intercaladas). Este segmento es impermeable a la urea. La permeabilidad al agua está controlada por la concentración de hormona antidiuretica (ADH) (concentraciones altas de ADH mayor permeabilidad al agua).

### 3.3.4 Conductos colectores

La permeabilidad al agua está controlada por la concentración de ADH, el agua se reabsorbe ávidamente y se concentran la mayoría de los solutos en orina. El conducto colector medular es muy permeable a la urea, esto permite que parte de la urea tubular se reabsorba en el intersticio medular. Por otro lado en esta parte se secretan iones hidrógeno contra un gran gradiente de concentración, por lo que participa en la regulación ácido-base.

### 3.3.5 Cuantificación de la función renal

El aclaramiento renal es el volumen de plasma que queda completamente desprovisto de una sustancia cada minuto [2]. Para cualquier sustancia, el aclaramiento renal se define como la relación entre la concentración de la sustancia (X) multiplicada por el flujo urinario y su concentración en plasma como se muestra en la siguiente formula:

$$\text{Aclaramiento renal de X (mL/min)} = \frac{[\text{X}] \text{ en orina} \times \text{Flujo de orina (mL/min)}}{[\text{X}] \text{ en plasma}}$$

El aclaramiento renal se usa para cuantificar aspectos funcionales renales como la tasa de filtración glomerular. La creatinina, un producto de desecho del metabolismo del músculo, es filtrada en los glomérulos, pero no se absorbe; esto significa que el aclaramiento de creatinina es aproximadamente igual a la FG, motivo por el cual se usa como un índice de FG. En los humanos y en las ratas la creatinina se secreta.

Otras sustancias como el ácido paraaminohipúrico (PAH) se filtra parcialmente y no son reabsorbidos en los túbulos, pero sí se secreta; así su aclaramiento renal es mayor que el FG; el aclaramiento renal de esta sustancia puede usarse para calcular el flujo plasmático.

En cuanto a las sustancias que se reabsorben por completo en los túbulos (aminoácidos y glucosa), el aclaramiento es cero porque su tasa de excreción en orina es cero. La tasa de reabsorción tubular se calcula como la diferencia entre la tasa de filtración de la sustancia y la tasa de excreción en orina, de la siguiente forma:

$$\text{Reabsorción} = ( \text{FG} * [\text{plasmática de X}] ) - ( [\text{Urinaria de X}] * \text{Flujo urinario} )$$

Por su parte la tasa de secreción de una sustancia es la diferencia entre la tasa de excreción en el orina y la tasa en la que es filtrada, de la siguiente forma:

$$\text{Secreción} = ( [\text{Urinaria de X}] * \text{Flujo urinario} ) - ( \text{FG} * [\text{plasmática de X}] )$$



### 3.4 Diabetes mellitus

#### 3.4.1 Definición.

La Diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas, crónicas y degenerativas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina; la hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos que finalmente conduce a la muerte del paciente [4].

Según algunas estimaciones más de 440 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad; la diabetes y sus complicaciones conllevan importantes pérdidas económicas para los sistemas de salud nacionales por los costos médicos directos y la pérdida de trabajo y sueldos; debido a ello la Organización Mundial de la Salud sitúa a la diabetes como un importante problema de salud pública y una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) para intervenir con carácter prioritario [3].

En México según datos del INEGI en 2015, las complicaciones de la diabetes mellitus son la segunda causa de muerte solo superada por las enfermedades cardiovasculares, de ahí la importancia de conocer los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad.

#### 3.4.2 Clasificación

La diabetes mellitus puede ser clasificada en las siguientes categorías: **Diabetes tipo 1:** debido a la destrucción autoinmune de células  $\beta$ , que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

**Diabetes tipo 2:** debido a la pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células  $\beta$  con frecuencia en el marco de la resistencia a la insulina.

**Diabetes mellitus gestacional** (GDM, por sus siglas en inglés): diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no se reveló claramente como diabetes antes de la gestación).

**Tipos específicos de diabetes debido a otras causas:** por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y la diabetes de inicio en la madurez [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística

y la pancreatitis) y medicamentos - o diabetes inducida por sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH / SIDA o después de un trasplante de órganos).

La clasificación es importante para determinar la terapia ideal para el paciente [4].

### 3.4.3 Diagnóstico

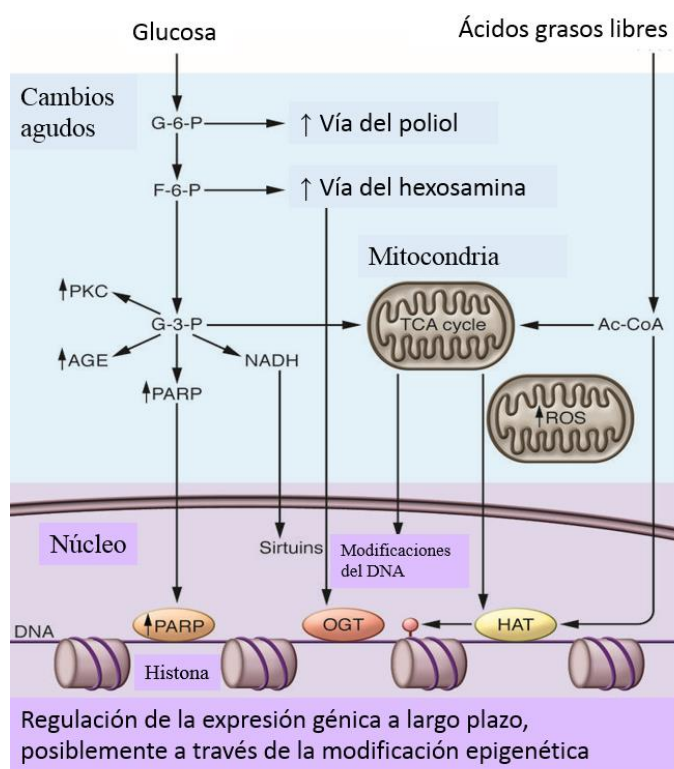
La diabetes mellitus puede ser diagnosticada según los valores de glucosa en sangre, ya sea la glucosa en plasma en ayunas (FPG) o el valor de la glucosa en plasma de 2 h (PG de 2 h) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) donde al paciente se le da una carga inicial de 75 g de glucosa y se sigue a lo largo de 2 horas los valores de glucosa, o los valores de hemoglobina glicosilada (HB 1AC), esta última proporciona información de los niveles de glucosa en los últimos tres meses [5].

En la siguiente tabla se muestran los valores que se consideran diagnósticos para la enfermedad (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Valor diagnóstico</b>
Glucosa plasmática en ayuno* * Ayuno al menos de 8 horas	≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
Curva de tolerancia a la glucosa* *Carga de 75 mg de glucosa y seguimiento cada 30 min por 120 min.	≥ 200mg/dL (11.1mmol/L) durante la duración de la prueba
Hemoglobina glicosilada (Hb A1C)	≥ 6.5% (48 mmol/mol)
Glucosa capilar aleatoria* * En pacientes con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica	≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

### 3.4.4 Complicaciones de la diabetes mellitus

Como se comentó anteriormente la hiperglucemia crónica o intermitente se asocia con el desarrollo de complicaciones diabéticas. La hiperglucemia desencadena varias vías de señalización metabólica que conducen a la secreción de citocinas, la inflamación, y representa una condición en la cual las células se vuelven susceptibles a la necroptosis, apoptosis y necrosis, dando como consecuencia daño tisular en el corazón, retina, los riñones y el sistema nervioso.



Se sabe que, además de sus efectos osmóticos en las células, la hiperglicemia activa la formación de diacilglicerol (DAG), junto con una activación de las cinasas PKC y NADPH-oxidasa (conocida como “ruta metabólica peligrosa en la diabetes”), que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al estrés oxidativo. El aumento de las ROS intracelulares hace que se activen mecanismo de eliminación de estrés oxidante pero cuando estos mecanismos de compensación fallan o no son suficientes, sobreviene el daño mitocondrial y la posterior activación de las caspasas y por

**Figura 3.** El metabolismo desregulado es un factor clave en el desarrollo de las complicaciones de la DM. Tomado de Reidy et al, JCI, 2014. G-6-P Glucosa-6 fosfato; F-6-P fructosa-6 fosfato; G-3-P glucosa 3-fosfato; PKC proteína cinasa C; AGE productos avanzados de la glicolisis; Ac. CoA acetil coenzima A; TCA cycle ciclo de Krebs.

ende de la apoptosis [6, 7] (Figura 3).

Por otro lado la hiperglicemia produce productos de glicosilación avanzada que al interactuar de manera covalente con algunas proteínas provocan cambios

conformacionales que en algunos casos causan aumento en su degradación o bien pérdida de la funcionalidad; algunas de estas proteínas están involucradas en la regulación génica e inician la transcripción de proteínas proinflamatorias y/o aumento de la producción de proteínas de la matriz extracelular. [7, 11].

En la diabetes, todo esto conduce a una inflamación crónica que es responsable en gran parte de las complicaciones [12].

#### 3.4.5 Nefropatía diabética

La enfermedad renal diabética (DKD, por sus siglas en inglés) es la principal causa de enfermedad renal en el mundo y es el predictor más sólido de la mortalidad en pacientes con diabetes [8]. Aproximadamente el 25% de los pacientes con DMT2 tienen enfermedad renal diabética, que se define como albuminuria persistente y/o tasa de filtración glomerular reducida persistente [9]. Sin embargo, incluso en el contexto de un control glucémico deficiente, los pacientes con diabetes no siempre desarrollarán DKD clínicamente evidente, lo que sugiere una posible predisposición genética para el desarrollo de la enfermedad.

La historia natural de la DKD fue descrita en la década de 1970 [10]. Estas descripciones clásicas indican que en pacientes con diabetes tipo 1 (DMT1), la DKD se desarrolla aproximadamente de 10 a 15 años después del inicio de la enfermedad. El signo más temprano es la microalbuminuria (> 30 mg / día), que luego progresa a macroalbuminuria (> 300 mg / día) y disminuye la tasa de filtración glomerular (GFR). En pacientes con DMT1, la enfermedad renal muestra una fuerte correlación con la retinopatía. El diagnóstico histopatológico es el "estándar de oro" para esta enfermedad, sin embargo la DM no es una indicación para realizar biopsia renal por las complicaciones y el riesgo que implica el procedimiento per se [11].

El engrosamiento de la membrana basal glomerular es la primera lesión observada (por microscopía electrónica); mientras que la expansión mesangial, causada por el agrandamiento celular y el aumento de la secreción de la matriz extracelular, es la lesión histopatológica más observada por microscopía óptica. Posteriormente, se puede observar glomeruloesclerosis nodular con nódulos de Kimmelstein-Wilson, la

cual es una lesión altamente específica pero menos sensible de la DKD. Las lesiones glomerulares se producen junto con lesiones vasculares específicas que incluyen hialinosis arterial. Los cambios tubulointersticiales (fibrosis) no son específicos para esta enfermedad, e incluyen la acumulación de miofibroblastos activados, colágeno atípico, células inflamatorias y pérdida de la arquitectura capilar [9, 11]. Si bien la expansión mesangial y el engrosamiento de membrana basal glomerular son las lesiones DKD observadas con mayor frecuencia, el análisis celular con muestras de pacientes diabéticos ha mostrado que el número de podocitos está altamente correlacionado con la proteinuria y parece ser uno de los mejores factores predictivos en diabetes mellitus tipo 1 [13]. La pérdida de podocitos puede derivarse de la generación de ROS inducida por la hiperglicemia que causa apoptosis o desprendimiento de los podocitos. La pérdida de podocitos representa un paso irreversible en el desarrollo de la enfermedad.

A nivel funcional los pacientes inicialmente presentan incrementos acentuados en el flujo sanguíneo renal y por ende hiperfiltración glomerular. Debido a que la glucosa se reabsorbe junto al sodio en el túbulo proximal, una mayor llegada de glucosa en el túbulo les hace reabsorber un exceso de sodio. Esto a su vez reduce la llegada de cloruro de sodio a la mácula densa, lo que activa la dilatación mediada por la retroalimentación tubuloglomerular de las arteriolas aferentes y los posteriores aumentos del flujo sanguíneo renal y del FG [2,11].

Mientras que la DKD se considera una complicación microvascular de la diabetes, la evidencia creciente indica que la pérdida de podocitos y la disfunción epitelial desempeñan alteraciones importantes. La inflamación, hipertrofia celular, y la desdiferenciación por la activación de vías clásicas de regeneración contribuye aún más a la progresión de la enfermedad.

El control de la presión arterial, especialmente con medicamentos que inhiben el sistema de angiotensina, es la única forma efectiva de retardar la progresión de la enfermedad.

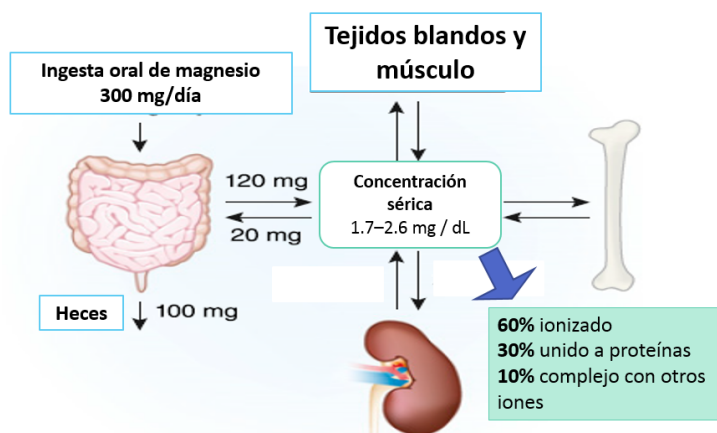
### 3.4.6 Modelos experimentales de Diabetes mellitus tipo 1

La estreptozotocina (STZ) es un antibiótico extraído de *Streptomyces acromogenes*, su peso molecular es 265 kDa. Rakieten y colaboradores en 1963 reportaron efectos diabetogénicos de este fármaco [14, 15]. La selectividad del daño a las células  $\beta$  pancreáticas se debe al motivo de unión al transportador de glucosa GLUT2 (abundantemente expresado en células beta pancreáticas) que se encuentra dentro de la estructura de la STZ. La toxicidad de la estreptozotocina depende de la actividad alquilante del ADN de su residuo metilnitrosourea. La transferencia del grupo metilo de la estreptozotocina a la molécula de ADN causa daño que resulta en la fragmentación del ADN. En el intento de reparar el ADN, la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) se sobreestimula. Esto disminuye  $\text{NAD}^+$  celular, y el ATP. El agotamiento de las reservas de energía celular finalmente resulta en necrosis de células beta [16].

El modelo para inducir diabetes tipo 1 fue descrito por primera vez en 1967 por Junod y col., en este trabajo se administró una dosis de 65 mg/kg de peso en ratas macho Wistar 165-230 gramos y se usó como vehículo ácido cítrico al 0.05 M la cual produjo necrosis de las células B, seguida de liberación de insulina pancreática e hipoglucemia. A las 24 horas, el contenido de insulina pancreática se reduce al 57% de lo normal [15].

### 3.5 Magnesio

El magnesio es el segundo catión divalente intracelular más abundante, y



**Figura 4.** Manejo del Magnesio corporal. Tomado y modificado de Blaine, Chonchol & Levi, 2014.

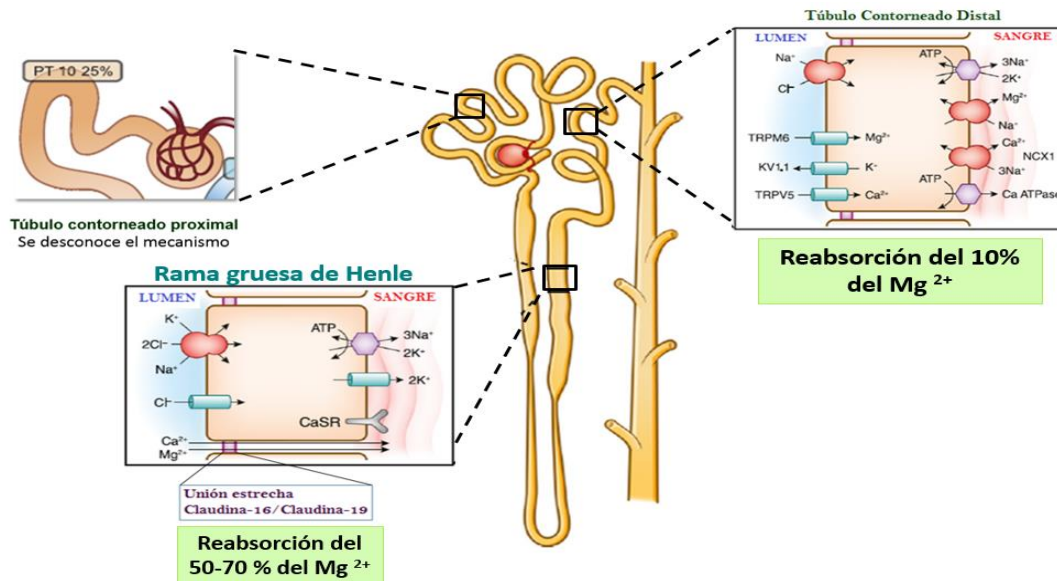
desempeña un papel fisiológico esencial como cofactor de numerosas enzimas y modulador de los canales iónicos y de los transportadores de membrana, participando en el complejo  $\text{ATP/Mg}^{2+}$ .

Diariamente se ingieren

aproximadamente 300 mg de magnesio de los cuales se absorben netamente 120, el resto es eliminado en las heces. La mayor parte del magnesio es absorbido por el intestino delgado y, en menor medida, por el colon. La absorción transcelular de magnesio está permitida por el potencial de receptor transitorio melastatin (TRPM), canales catiónicos TRPM6 y TRPM7. El contenido corporal total de magnesio en adultos es de aproximadamente 24 g, el 99% es intracelular, solo el 1% está en el espacio extracelular. La concentración sérica de magnesio es de 1.8 mEq/L. Más de la mitad está unido a proteínas plasmáticas y solo 0.8 mEq/L se encuentra en forma ionizada [2, 17] (Figura 4). Su excreción es por vía renal.

### 3.5.1 Manejo renal del magnesio

En el glomérulo, el magnesio que no está unido a proteínas se filtra libremente para después reabsorberse a lo largo de la nefrona. Del 10-25% se reabsorbe en el túbulo proximal y se desconoce el mecanismo mediante el cual éste proceso se lleva a cabo; del 50-70% se reabsorbe en la rama ascendente gruesa del asa de Henle por la ruta paracelular mediante las proteínas de unión estrecha: claudina 16 y claudina 19. Un 5-10% adicional se reabsorbe en los túbulos distales a través del canal TRPM6 (Figura 5)



**Figura 5.** Manejo renal del magnesio. Tomado y modificado de Blaine, Chonchol & Levi, 2014.

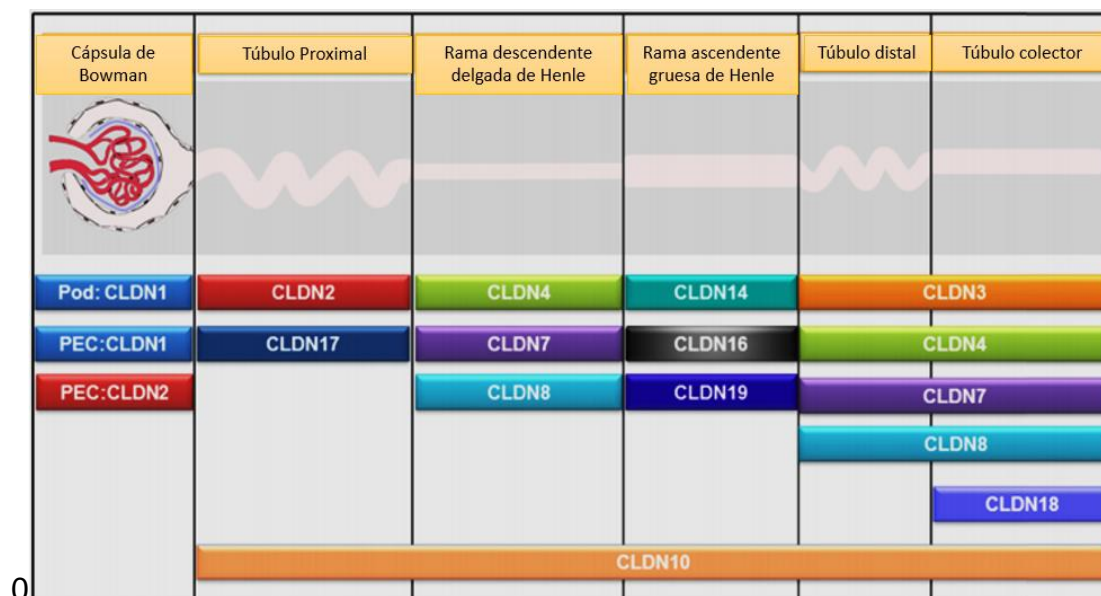
### 3.5.2 Transporte paracelular, unión estrecha y claudinas.

Trabajos previos han evidenciado las funciones de las uniones estrechas entre las que destacan: a) formar una barrera contra el paso paracelular, b) ser límite en topográfico entre membrana basolateral y membrana apical, c) la formación de poros para el paso de iones entre células vecinas; a este tipo de transporte se le denomina transporte paracelular [18].

Las claudinas son las proteínas de membrana integrales de membrana, de entre 21–28 kDa que consisten en cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares, dominios citoplasmáticos terminales amino y carboxilo. Éstas proteínas se asocian en cis dentro de la membrana plasmática de la célula en dímeros o estados oligoméricos superiores. Estas asociaciones son seguidas por interacciones trans entre claudinas de células adyacentes. Las interacciones pueden involucrar un solo tipo o diferentes tipos de claudinas (interacción heteromérica); la disposición, el tipo de interacción así como el sitio donde se encuentren determina la función fisiológica en la que se ve implicada [18,19].

Así por ejemplo tenemos que a lo largo de la nefrona se expresan diversos tipos de claudinas que contribuyen de manera importante a la reabsorción o a la impermeabilidad a ciertos cationes; por ejemplo a nivel del túbulo proximal se encuentra expresada claudina-2, la cual forma un poro catiónico para sodio permitiendo su reabsorción. En la figura 6 se ilustran las diferentes claudinas presentes a lo largo de la nefrona [19].





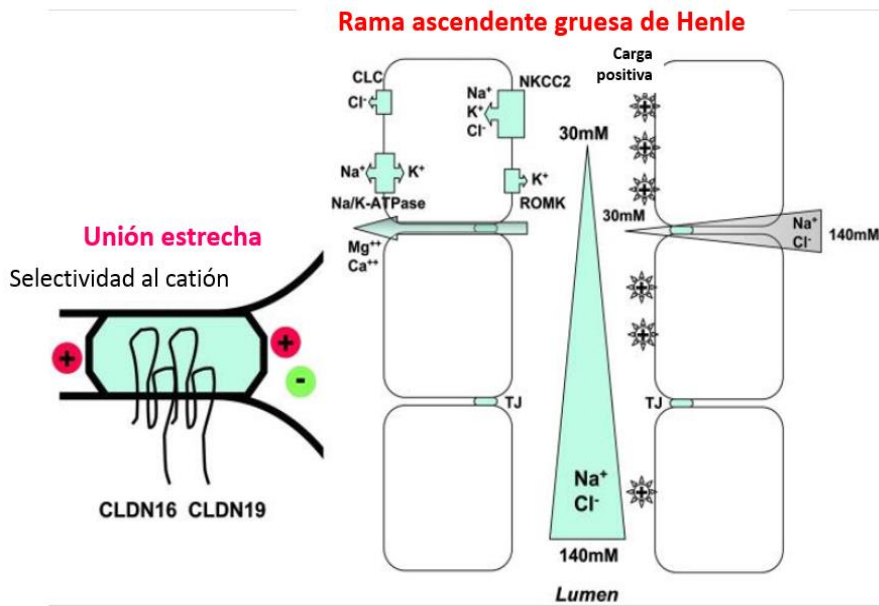
**Figura 6.** Esquema del perfil de expresión de claudinas en la nefrona.

### 3.5.3 Asa ascendente gruesa de Henle: Claudina 16 (paracelina-1) y claudina 19

En el asa ascendente gruesa de Henle se encuentra una estructura denominada unión estrecha, ésta estructura se encuentra conformada por claudina-16, claudina-19 y claudina-14; las cuales desempeñan un papel clave en la selectividad y conductancia paracelular de los iones calcio y magnesio.

Sin embargo dicha región de la nefrona tiene otras funciones: 1) absorción de cloruro de sodio; y 2) la generación de un gradiente osmótico como requisito previo para la reabsorción de agua en los siguientes segmentos de la nefrona [20].

La reabsorción de sodio ocurre a través de 2 vías diferentes: un transporte transcelular activo y una ruta paracelular pasiva. El primero está mediado por el cotransportador sodio/potasio 2 Cloruro (NKCC2) en la membrana apical y la bomba de sodio y potasio (Na-K-ATPasa) en la membrana basolateral. Al mismo tiempo, la reabsorción pasiva de sodio paracelular se produce a través de la unión estrecha por el potencial de conductancia positivo. El transporte activo de sodio también



proporciona la fuerza motriz para la absorción de potasio y cloruro a través del NKCC2 apical. Mientras que los iones de cloruro salen de la célula hacia el intersticio a través de los canales de

**Figura 7.** Función de la unión estrecha y mecanismo de reabsorción de magnesio. canales de cloruro, sólo una pequeña cantidad de potasio se reabsorbe a través de los canales de potasio en la membrana basolateral. En contraste, la mayoría del potasio se recicla de nuevo en la orina a través de canales específicos de potasio ubicados en la membrana apical de las células del asa ascendente gruesa [20, 21, 22, 23]. (Figura 7).

El transporte paracelular en esta sección de la nefrona depende de la selectividad de la unión estrecha a los cationes (calcio y magnesio) y la fuerza motriz. El primero es proporcionado por una composición específica de claudinas (claudina 16 y claudina 19) [22], el segundo por la actividad de la ATPasa dependiente de sodio y potasio.

A lo largo del asa ascendente gruesa de Henle, el potencial de lumen positivo aumenta constantemente; el gradiente de sodio producido conduce a un refluj

paracelular de sodio a través de unión estrecha. Esto a su vez conduce a un incremento adicional en el potencial de lumen positivo y, por lo tanto, proporciona una fuerza motriz adicional para el transporte paracelular exclusivo de magnesio y calcio.

La expresión de claudina-16 y claudina-19 es crítica para la reabsorción de calcio y magnesio en el riñón [20, 23, 24]. Las claudinas son proteínas tetraspan que consisten en una familia de 27 miembros que forman los canales paracelulares que permiten la penetración selectiva de iones a través de la unión estrecha. Mutaciones en claudina-16 o claudina-19 conducen a una patología autosómica recesiva llamada hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis; una enfermedad renal progresiva caracterizada por la pérdida renal primaria de magnesio con hipomagnesemia, hipercalciuria y nefrocalcinosis. Con frecuencia se observan infecciones del tracto urinario recurrentes y cálculos renales. A pesar de la hipercalciuria, los pacientes no presentan hipocalcemia [20, 22, 23].

Además en este segmento de la nefrona se ha identificado la expresión de la claudina-14, estudios han evidenciado que esta proteína tiene función de barrera catiónica (papel fisiológico en el oído interno); interactúa físicamente con claudina-16 pero no con claudina-19 y bloquea directamente su permeabilidad catiónica de la siguiente forma: se conoce que la conductancia del canal varía con la valencia de carga efectiva en la cadena lateral del residuo 65, claudina-14 tiene un residuo no cargado (glutamina) en esa posición, que reduce la densidad de carga efectiva del poro del canal de claudina-16, lo que lleva a una disminución de la penetración de los cationes [25].

#### 3.5.4 Transporte transcelular de magnesio: el papel del TRPM6

En membrana apical de las células del túbulo contorneado distal se encuentra el canal TRPM6, una proteína bifuncional de 6 dominios transmembranales que comprende un segmento de canal de catión TRP enlazado covalentemente a una serina/treonina protein cinasa de tipo  $\alpha$  [26]. Éste canal transporta selectivamente a  $Mg^{2+}$ . Se ha encontrado que está constitutivamente abierto, pero está fuertemente regulado por los niveles intracelulares de  $Mg^{2+}$ . Además, la actividad del canal se

potencia mediante un pH extracelular ácido. Éste canal es regulado, tanto es su expresión como en su función por algunas hormonas como: EGF (aumenta la actividad del canal y redistribuye la proteína TRPM6 de la endomembrana a la membrana plasmática) [27] y los estrógenos (17 beta-estradiol regula a la alza los niveles de mRNA de TRPM6) [28, 29].

Se encuentra muy expresado en riñón y colon. Existen tres isoformas de la proteína; las isoformas TRPM6a y TRPM6b se coexpresan con TRPM7 en el riñón (forma heterodímeros con TRPM7. TRPM6 requiere de la presencia de TRPM7 para localizarse en la membrana celular) [30] y los testículos. La isoforma TRPM6c se detecta solo en los testículos y en las células de carcinoma de pulmón de células pequeñas NCI-H510A.

El gen humano TRPM6 está ubicado en el cromosoma 9 (9q21.13) y comprende 39 exones que codifican una proteína de 2022 aminoácidos, con un peso molecular de 231.7 kDa. Sus ortólogos se encuentran en todas las especies de vertebrados [30]. Las mutaciones en el gen TRPM6 causan el trastorno autosómico recesivo hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria, que se caracteriza por niveles séricos de  $Mg^{2+}$  extremadamente bajos (0.1–0.3 mmol / l) acompañados de bajos niveles séricos de  $Ca^{2+}$ . [32].

### 3.5.5 Magnesio y sus implicaciones en Diabetes mellitus

En las últimas décadas, la hipomagnesemia ( $Mg^{2+}$  sérico <0.7 mmol / L) se ha asociado fuertemente con la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) (Tabla 2). Los pacientes con hipomagnesemia muestran una progresión de la enfermedad más rápida y tienen un mayor riesgo de complicaciones [33, 34]. Se ha reportado que niveles séricos de magnesio disminuidos (hipomagnesemia), son comunes en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y se han asociado con resultados clínicos deficientes [35]. Además estudios clínicos demuestran que los pacientes con DM2 con hipomagnesemia tienen reducida la actividad de las células  $\beta$  pancreáticas y son más resistentes a la insulina [34].

**Tabla 2. Estudios clínicos que relacionan la DM y el Magnesio.**

<b>Referencia</b>	<b>Poblaciones</b>	<b>Hallazgos</b>
<b>Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study [36].</b>	12,000 adultos (6 años de seguimiento) sin diabetes al inicio del estudio.	Niveles séricos bajos de magnesio estaban asociados con un mayor riesgo de diabetes  No había correlación entre el magnesio en la dieta y el riesgo de diabetes
<b>Iowa Women's Health Study and Honolulu Heart Programme [37].</b>	Cohorte prospectivo de 35988 mujeres no diabéticas, y seguimiento durante 6 años	Mostró una correlación inversa entre la ingesta de magnesio y el riesgo de diabetes
<b>Nurses' Health Study and Health Professional Follow up Study [38]</b>	85,060 mujeres (18 años de seguimiento) 42,872 hombres (12 años de seguimiento).	Dieta rica en magnesio reduce el riesgo de desarrollar diabetes en un 34% en mujeres y 33% en los hombres.
<b>Song, Manson, Buring &amp; Liu, 2004  Women's Heart Study [39]</b>	39,345 mujeres y seguimiento de 6 años.	Relación inversa significativa entre la ingesta de magnesio en la dieta y el riesgo de desarrollar diabetes
<b>División de Nefrología, Olive View-UCLA Medical Center, Sylmar, CA. [40]</b>	252 hombres y 298 mujeres con un seguimiento medio de $5 \pm 1.8$ años	Una $[Mg^{2+}]$ baja se asocia con una tasa de deterioro de la función renal más rápida en pacientes con DM2.

<b>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. [41]</b>	Estudio en 32 mexicanos con resistencia a la insulina	Mayor ingesta de Mg se asocia de forma independiente con mejor sensibilidad a la insulina en pacientes con riesgo de DM tipo 2.
--	---	---

El  $Mg^{2+}$  intracelular regula la glucocinasa, los canales de potasio y los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L en las células  $\beta$  pancreáticas, que preceden a la secreción de insulina. Además, la autofosforilación del receptor de insulina depende de las concentraciones intracelulares de  $Mg^{2+}$  ya que estabiliza la fosforilación del receptor de insulina y permite que desencadene cascadas de señalización lo que hace que este ion sea un factor directo en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

En el riñón, la insulina activa el canal de  $Mg^{2+}$  TRPM6 que determina la excreción urinaria final de  $Mg^{2+}$ . Por consiguiente, existe un “círculo vicioso” en el que la hipomagnesemia causa resistencia a la insulina y la resistencia a la insulina reduce las concentraciones séricas de  $Mg^{2+}$  [33].

En el laboratorio del Dr. Reyes del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, Molina-Jijón y col. en 2014, observaron en un modelo de diabetes tipo 1, disminución de la proteína de la unión estrecha claudina-2 [42, 43]; y que esta disminución se relaciona con un aumento en la excreción urinaria de sodio; por otro lado Rosas Lorena y col. en 2017 [44] en su tesis de maestría describe en un modelo experimental de diabetes tipo 2 aumento de la fracción excretada de sodio (FENa), potasio (FEK), magnesio (FEMg) y calcio (FECa). Sin embargo el papel de las claudinas reguladoras de magnesio en la homeostasis de este ion durante el desarrollo y progresión de la DM no está bien entendido.

#### 4 Justificación

Se ha descrito que la hiperglicemia en un modelo experimental de diabetes tipo 1 induce alteraciones en la expresión de las proteínas de la unión estrecha como

claudina-5 y claudina-2 induciendo alteraciones en la función renal como aumento en la proteinuria y en la excreción fraccional de sodio.

El aumento de la excreción urinaria de magnesio (hipermagnesuria) aparece en fases tempranas de la nefropatía diabética.

En las uniones estrechas del asa ascendente gruesa de Henle se encuentra la claudina-16, proteína encargada de la reabsorción de calcio y magnesio. Hasta el momento se desconoce si la hiperglicemia induce cambios en la expresión de esta proteína. Es posible que la hiperglicemia disminuya la expresión de claudina-16 en el asa ascendente gruesa de Henle disminuyendo la reabsorción del magnesio en este segmento tubular, favoreciendo su excreción.

## 5 Hipótesis

En el modelo experimental de diabetes tipo la hiperglucemia disminuirá la expresión renal de la proteína de la unión estrecha claudina-16, teniendo como consecuencia la disminución de la reabsorción del magnesio, favoreciendo su excreción por la orina (hipermagnesuria).

## 6 Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la hipermagnesuria y la alteración en la expresión de la proteína de la unión estrecha claudina-16, en un modelo experimental de diabetes tipo 1.

### 6.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la función renal en ratas de siete, catorce y veintiún días con diabetes tipo 1.
- 2) Evaluar concentraciones urinarias y séricas de electrolitos como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  por espectrometría de emisión con fuente de ionización (ICP-OES) en ratas de siete, catorce y veintiún días con diabetes tipo 1.
- 3) Evaluar si existen cambios en la expresión de la claudina 16 mediante inmunofluorescencia y western blot en ratas de siete, catorce y veintiún días con diabetes tipo 1.

## 7 Materiales y métodos

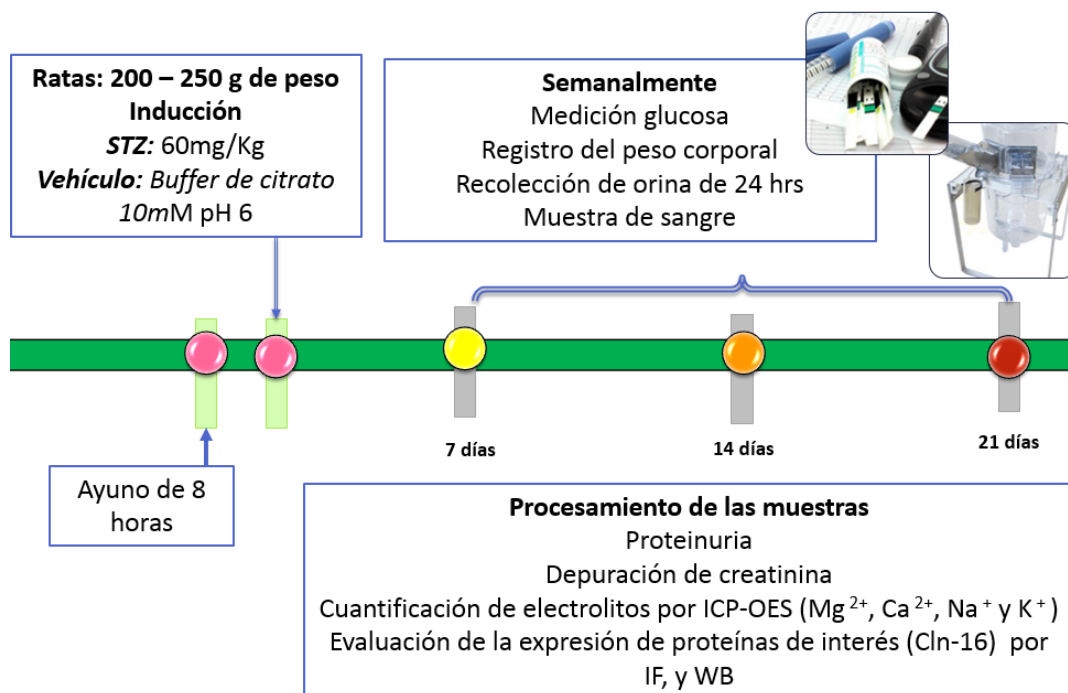
### 7.1 Modelo experimental

#### 7.1.1 Diabetes tipo 1

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 O178-16). Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal entre 200-250 g. Las ratas se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) a 22 +/- 1 °C de temperatura ambiente y 50 +/- 5% de humedad ambiental. Los animales se mantuvieron con acceso libre a agua y alimento (PicoLab® Rodent Diet 20 5053\*).

Para inducir el modelo de diabetes tipo 1, se usó una dosis de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) de 60 mg/kg de peso, usando como vehículo Buffer de citratos 10 mM , pH 6 por vía intraperitoneal. Como control se utilizan ratas macho del mismo peso (entre 200-250 gramos) a los cuales se les administra el vehículo. Tres días posteriores a 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. Las ratas se sacrificaron en los días 7, 14 y 21 después de la administración de STZ (Figura 7).





**Figura 8.** Protocolo experimental.

## 7.2 Metodología

### 7.2.1 Obtención de la muestra

Una vez que se han seleccionado las ratas que cumplen con los criterios de diagnóstico de Diabetes mellitus; semanalmente durante tres semanas se procede a registrar su peso corporal, posteriormente se introducen en jaula metabólica por 24 horas para recolectar la orina. Se realizan alícuotas de la muestra de orina, se congelan con nitrógeno líquido y se almacenan a  $-80^{\circ}C$ .

Posteriormente, las ratas se anestesiaron con isoflurano a una dosis de inducción del 5% y una dosis de mantenimiento 3% para llevar a cabo la recolección de sangre por punción cardiaca. Se obtuvo un volumen aproximado de 5 mL de sangre total, se centrifugó la muestra a 3500 rpm por 5 minutos y se separó el suero para después congelarlo con nitrógeno líquido y almacenarlo a  $-80^{\circ}C$ .

Para la obtención del tejido renal; los riñones se disecaron, y se sumergieron en solución salina isotónica fría (SSI, 0.9% NaCl), se les quitó la cápsula renal, se

pesaron y se realizaron cortes transversales de 5-7 mm aproximadamente (4-5 cortes). Posteriormente se criopreservaron, sumergiéndose por 1 minuto en 2-metilbutano, seguido de 5 minutos en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80 °C, para su posterior análisis. El tejido renal será utilizado para los ensayos de Western blot e inmunofluorescencia.

#### 7.2.2 Determinación de electrolitos por espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

Para determinar las concentraciones séricas y urinarias de los electrolitos sodio, potasio, calcio y magnesio utilizamos la espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Ésta técnica consiste en un tipo de espectroscopia de emisión que utiliza el plasma acoplado inductivamente para producir la excitación de los electrones a niveles de energía superiores. Tras dicha excitación, los electrones regresan a su estado original, emitiendo rayos de luz con una longitud de onda característica para cada elemento. La intensidad de la luz emitida es proporcional al número de átomos del elemento presente en la muestra. Con esta técnica se pueden analizar simultáneamente todos los elementos de interés y en niveles tan bajos como 1-10 partes por mil millones o ppb.

Para la realización de este experimento se requiere de la digestión previa de la muestra para lo cual se realiza la siguiente metodología:

Se diluyó la muestra de suero (1:10) en agua desionizada, posteriormente se colocan volúmenes de 40, 60, 80 y 100 µL de la dilución en tubos Eppendorff®, se agregaron 400 µL de ácido nítrico 65% Suprapur® (Merck KGaA 64271 Darmstadt, Alemania). Se incubaron en un horno de microondas por 48 horas a 58°C. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 1 min y se agregaron 800 µL de agua desionizada y se realizó la lectura de las muestras en ICP-OES Optima 8000 (Perkin Elmer). Para la determinación de iones en orina no es necesario realizar la dilución de la muestra.

### 7.2.3 Función renal: determinación de depuración de creatinina, proteinuria y fracción excretada de los iones.

Para evaluar el estado de la función renal se determinan la creatinina en suero y orina, depuración de creatinina y proteinuria. Para la determinación de creatinina sérica y urinaria se usa el método de Jaffé [45]. La depuración de creatinina se corrige con el peso corporal, expresándose en mL/min/100 g.p.c. la depuración de creatinina se determina mediante la fórmula de aclaramiento:

$$\text{Depuración de creatinina (mL/min)} = \frac{[\text{creatinina}] \text{ en orina (mg/dL)} \times \text{Flujo de orina (mL/min)}}{[\text{creatinina}] \text{ en plasma}}$$

La proteinuria se midió mediante el método de Lowry modificado (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Para evaluar la función tubular se midió la excreción fraccional de sodio (FENa), excreción fraccional de potasio (FEK), excreción fraccional de calcio (FECa), excreción fraccional de magnesio (FEMg); para lo cual se usó la siguiente fórmula:

$$\text{FE Elemento (\%)} = \frac{\text{Depuración del elemento}}{\text{Depuración de creatinina}} * 100$$

$$\text{Depuración del elemento (mL/min)} = \frac{[\text{elemento}] \text{ en orina (mg/dL)} \times \text{Flujo de orina (mL/min)}}{[\text{elemento}] \text{ en plasma}}$$

### 7.2.4 Western blot

Para realizar la extracción de las proteínas totales, la corteza renal se lavó tres veces con RKB frío y se resuspendió en 10 mL de RKB con 15 mg de colagenasa tipo II. Las muestras se gasificaron durante 20 min con 95% de CO<sub>2</sub>/5% de aire atmosférico en un baño de agua a 37°C con agitación vigorosa. Después de la agitación, se adicionaron 20 mL de RKB frío que contenía al cocktail de inhibidores de proteasas (Complete 1x; Boehringer Mannheim, Alemania) y fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (PMSF, 20 g/mL) para inactivar la colagenasa. La suspensión se filtró para remover las fibras de colágeno y se centrifugó (18 x g/10 min). El botón se resuspendió en 10 mL de RKB frío que contenía un cocktail de inhibidores de proteasas y se centrifugó nuevamente (18 x g/10 min). Este procedimiento de lavado se repitió una vez más. El botón final se resuspendió en 300 µL de amortiguador de extracción RIPA, que contenía, en mM: 40 Tris-HCl, 150 NaCl, 2 EDTA, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio y 0.2% de dodecil sulfato de sodio (SDS) a pH 7.6 y se incubó durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se sonicaron 3 veces durante 30 s cada vez en un sonicador ultrasónico de alta intensidad (Vibra Cell; Sonic & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) y se centrifugaron a 20 000 rpm x g a 4°C durante 40 min. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes los cuales contenían las proteínas totales de corteza renal

La cantidad de proteína presente en la muestra se midió mediante el método de Lowry modificado (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Las muestras se diluyeron (1:5) en amortiguador de Laemmli con urea (5 M) y se desnaturalizaron por calentamiento durante 12 min. Las proteínas se colocaron en geles SDS-PAGE al 12% (claudina-16) y 8% (THP). En paralelo con las muestras se colocaron 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 PVDF (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). Las uniones no específicas se bloquearon con una disolución de caseína al 1% disuelta en PBS con 0.05 % de Tween 20. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios. Posteriormente, las membranas se lavaron 6 veces con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios. Después de 6 lavados (con PBS con 0.05 % de Tween 20 durante 5 min), las membranas se revelaron con el reactivo de detección Luminata. La

quimioluminiscencia se detectó mediante el sistema ChemiDoc Touch Imaging System. La densitometría de las bandas se cuantificó mediante el software ImageJ.

En la siguiente tabla se enlistan los anticuerpos utilizados, las diluciones, el fabricante y número de catálogo.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para Western Blot**

Anticuerpo (especie)	Dilución	Fabricante	Número de catalogo
<b>Anti CLDN16 (conejo)</b>	1:500	Abcam	Ab106504
<b>THP (B-2) (mouse)</b>	1:500	Santa Cruz	sc-271022
<b>HRP beta-Actina</b>	1:40000	Invitrogen	MA5-15739-HRP

#### 7.2.5 Inmunofluorescencia

Se cortaron rebanadas transversales de riñón de aproximadamente 0.5 cm de espesor y se sumergieron durante 5 min en 2-metilbutano a 4°C para congelarlas posteriormente en nitrógeno líquido. Se cortaron rebanadas de 4 µm de espesor en un crióstato (Leica CM 1510 Cryostat, Wetzlar, Alemania) y se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina que se conservaron a -70 °C hasta el día de los experimentos. Para los experimentos de inmunofluorescencia, los cortes se fijaron en metanol (10 min a -20 °C ), después se hidrataron con PBS 1% (5 min a temperatura ambiente), posteriormente se permeabilizaron con PBS con 1% Tritón X-100 0.2% (durante 5 min a temperatura ambiente) y se lavaron dos veces por 5 min (PBS 1%). Las muestras se bloquearon (30 minutos a temperatura ambiente) con solución albumina libre de IgG al 0.5% (Research Organics, Cleveland, OH, USA) y se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C). Se utilizó DAPI para marcar los núcleos. Los anticuerpos secundarios (mencionados en la tabla 2), se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS 1% (durante 10 min a temperatura ambiente) 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.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia**

Anticuerpo (especie)	Dilución	Casa comercial	Número de catalogo
Anti CLDN16 (conejo)	1:100	Abcam	Ab106504
THP (B-2) (mouse)G	1:100	Santa Cruz	sc-271022
Alexa-flúor 488 (conejo)	1:500	Invitrogen	A21206
Alexa-flúor 594 (ratón)	1:500	Invitrogen	A21203

#### 7.2.6 Análisis estadístico

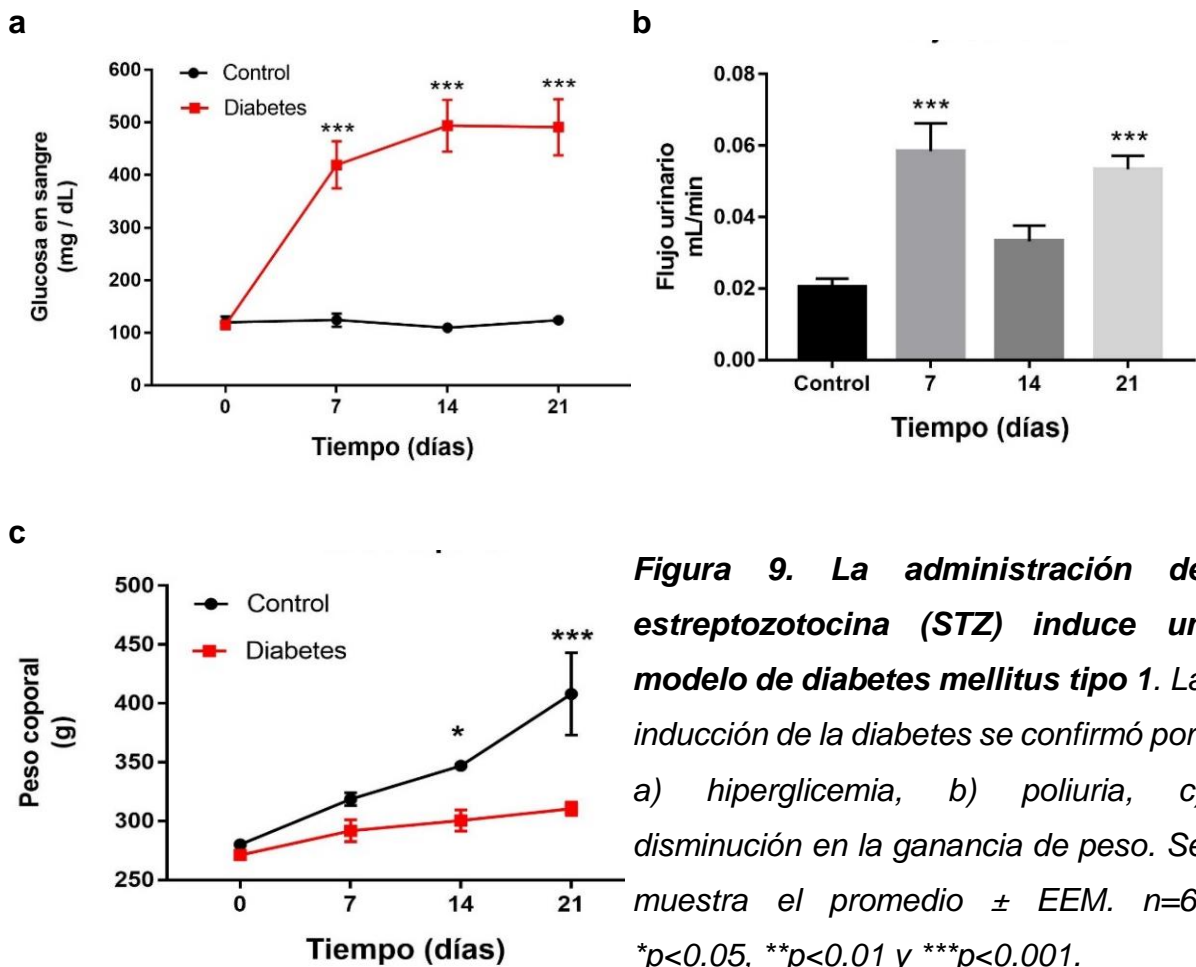
Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre los promedios se analizaron mediante t de student (para comparar entre dos grupos) o análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de Bonferroni (para comparar el curso temporal)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

## 8 Resultados.

### 6.1 La administración de estreptozotocina en ratas Wistar induce un modelo experimental de diabetes tipo 1 y daño renal.

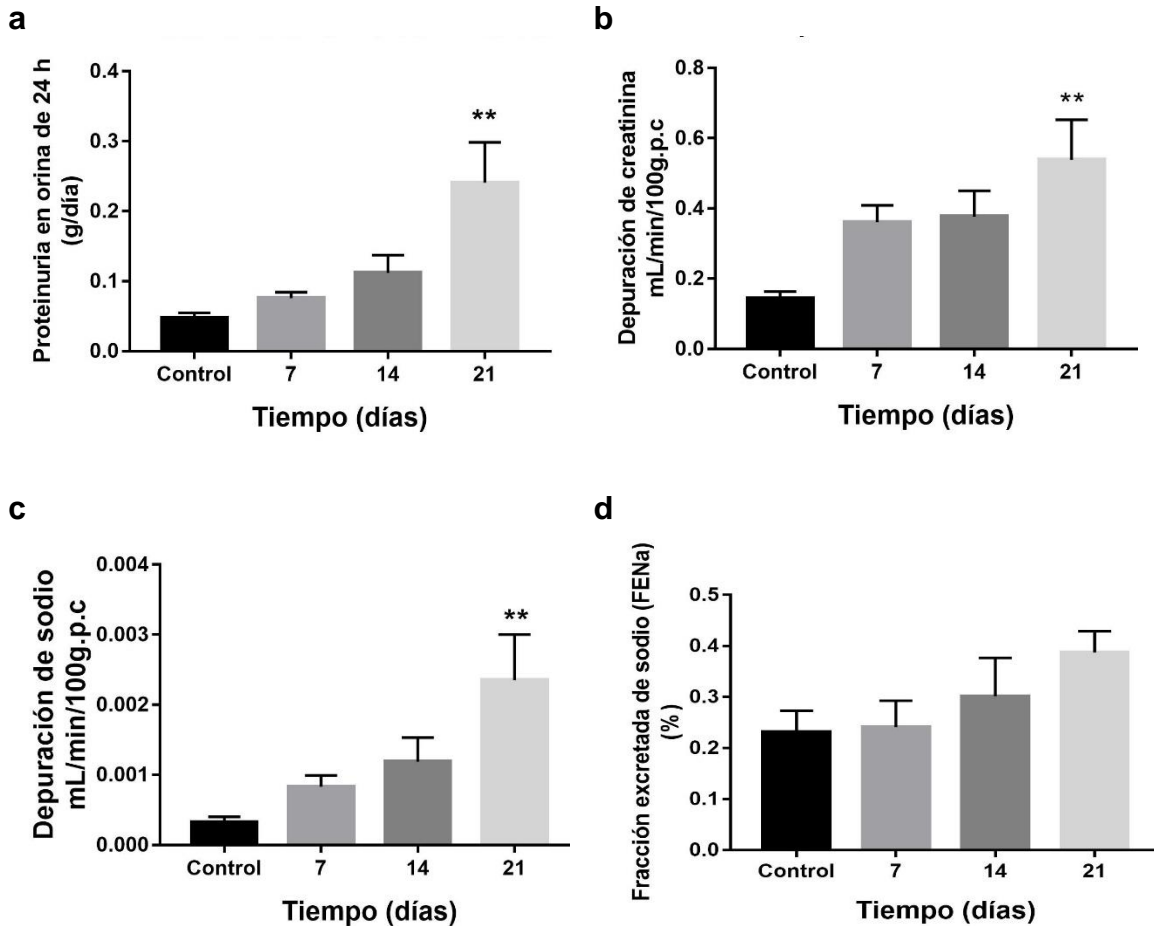
El primer objetivo fue inducir el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 usando una dosis de estreptozotocina de 60 mg/kg en ratas de entre 200-250 gramos de peso. Para el diagnóstico de la enfermedad se midieron los niveles de glucosa en ayuno, considerándose un valor mayor de 200 mg/dL como diagnóstico de la enfermedad. En la figura 9 podemos observar que las ratas en los días 7 (  $419.3 \pm 109.2$  mg/dL), 14 (  $493.8 \pm 120.7$  mg/dL) y 21 (  $491 \pm 130$  mg/dL) posteriores a la inducción presentan aumento en los valores de glucosa respecto a los animales control de 7 (  $124 \pm 12$  mg/dL), 14 (  $109.5 \pm 2.1$  mg/dL) y 21 (  $124 \pm 2.8$  mg/dL) días

respectivamente. Además se observó que las ratas diabéticas presentan aumento en el flujo urinario en los días 7 ( $0.05845 \pm 0.019$  mL/min), 14 ( $0.0332 \pm 0.01$  mL/min) y 21 ( $0.05336 \pm 0.009$  mL/min) respecto a los controles ( $0.0204 \pm 0.005$  mL/min) y disminución en la ganancia de peso en el día 7 ( $291.8 \pm 22.7$  g), día 14 ( $300.5 \pm 21.9$  g) y 21 días ( $310.5 \pm 13.9$  g) contra los controles ( día 7:  $318.6 \pm 9.2$  g; día 14:  $347 \pm 1.4$  g; día 21:  $408 \pm 49$  g) en comparación con los animales controles; con lo que se corroboró la inducción del modelo.



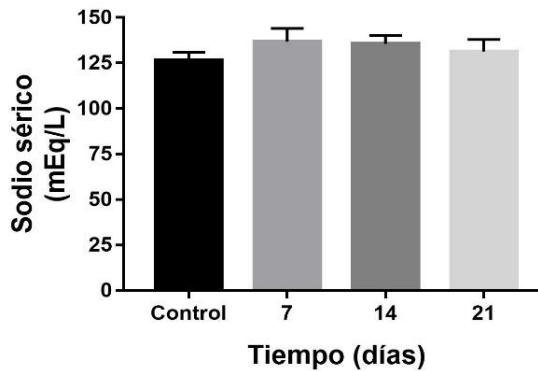
Además se evaluó la función renal y se encontró que la diabetes indujo aumento en los valores de proteinuria en el día 21 ( $0.2407 \pm 0.14$  g/día) respecto al control ( $0.0469 \pm 0.019$  g/día); se observó aumento de los valores de la depuración de creatinina en el día 21 ( $0.5383 \pm 0.28$  mL/min/100g.p.c.) respecto a los controles

( $0.1435 \pm 0.047$  mL/min/100g.p.c). También se observaron alteraciones en el manejo de electrolitos: aumento en los valores de la depuración de sodio en el día 21 ( $0.00235 \pm 0.001$  mL/min/100g.p.c) respecto al control ( $0.0003 \pm 0.0001$  mL/min/100g.p.c), sin embargo no hubo cambios estadísticamente significativos en los valores de la fracción excretada de sodio (FENa); no se modificaron los valores séricos de sodio





e

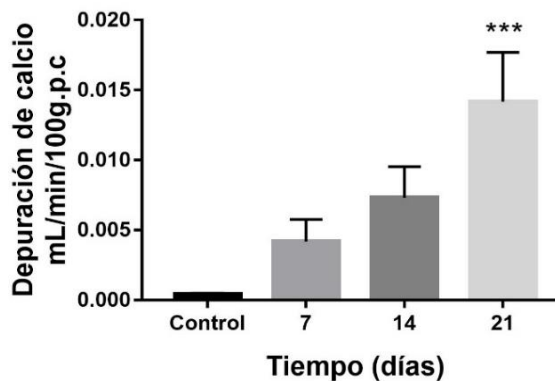


**Figura 10. La diabetes induce disfunción renal.** a) proteinuria en orina de 24 horas, b) depuración de creatinina, c) depuración de sodio, d) excreción fraccional de sodio (FeNa), e) concentración de sodio sérico. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM.  $n = 6$ . Estadística: ANOVA 1 vía, Bonferroni \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

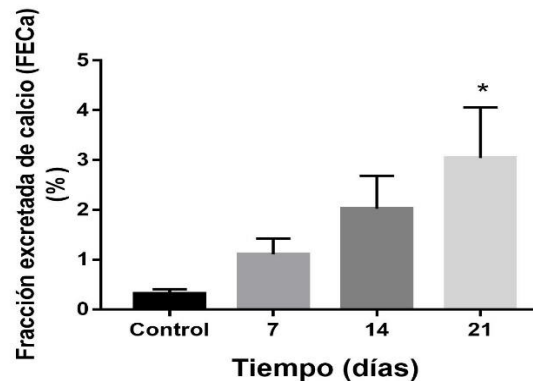
## 6.2 Las ratas diabéticas tipo 1 presentan aumento en la fracción de excreción de los iones calcio y magnesio.

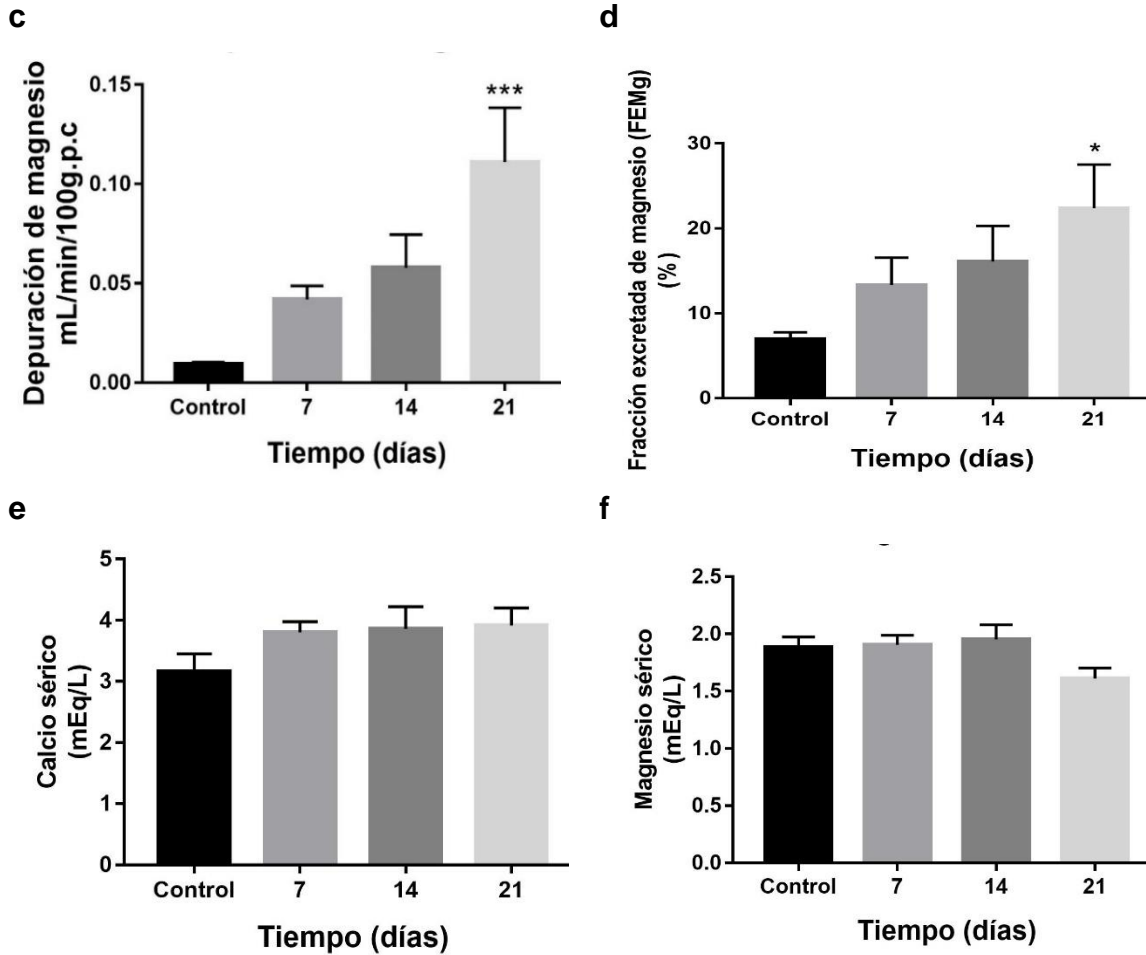
Se evaluaron también las concentraciones séricas y urinarias de los iones calcio y magnesio para poder calcular los parámetros de fracción excretada y la depuración de cada ion. En la figura 11 podemos observar un aumento de los valores de depuración de calcio en el día 21 ( $0.01417 \pm 0.008$  mL/min/100 g.p.c.) y de los valores de la fracción excretada ( $3.041 \pm 2.4$  %) respecto a los controles ( $0.0004 \pm 0.0002$  mL/min/100 g.p.c.,  $0.3136 \pm 0.22$  % respectivamente); se observa aumento de los valores de la depuración de magnesio ( $0.111 \pm 0.06$  mL/min/100 g.p.c) y de los valores de fracción excretada ( $22.37 \pm 12.5$  %) contra controles ( $0.009 \pm 0.002$  mL/min/100 g.p.c,  $6.9 \pm 1.9$  %, respectivamente). Sin embargo los valores séricos de estos iones no presentan alteraciones.

a



b



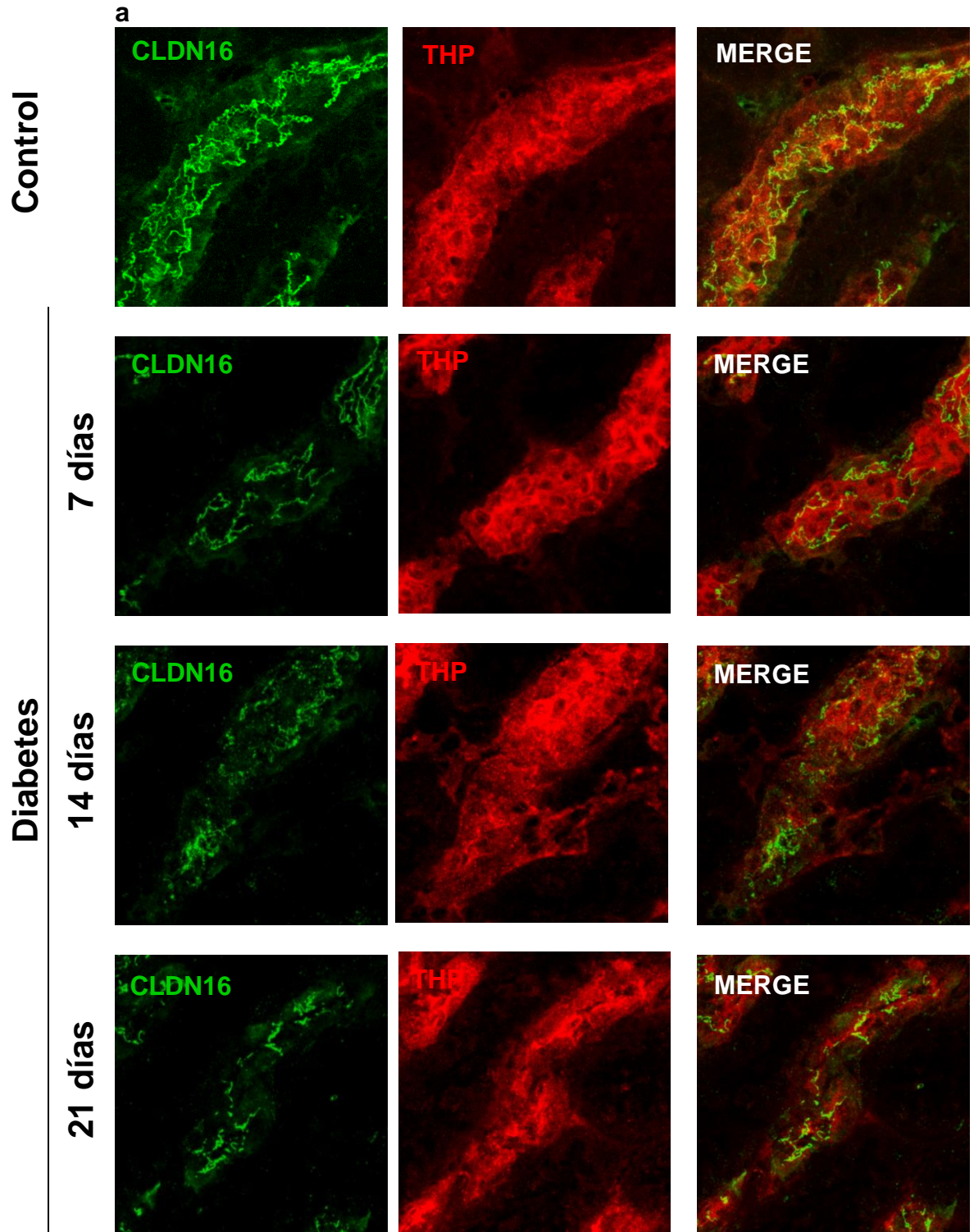


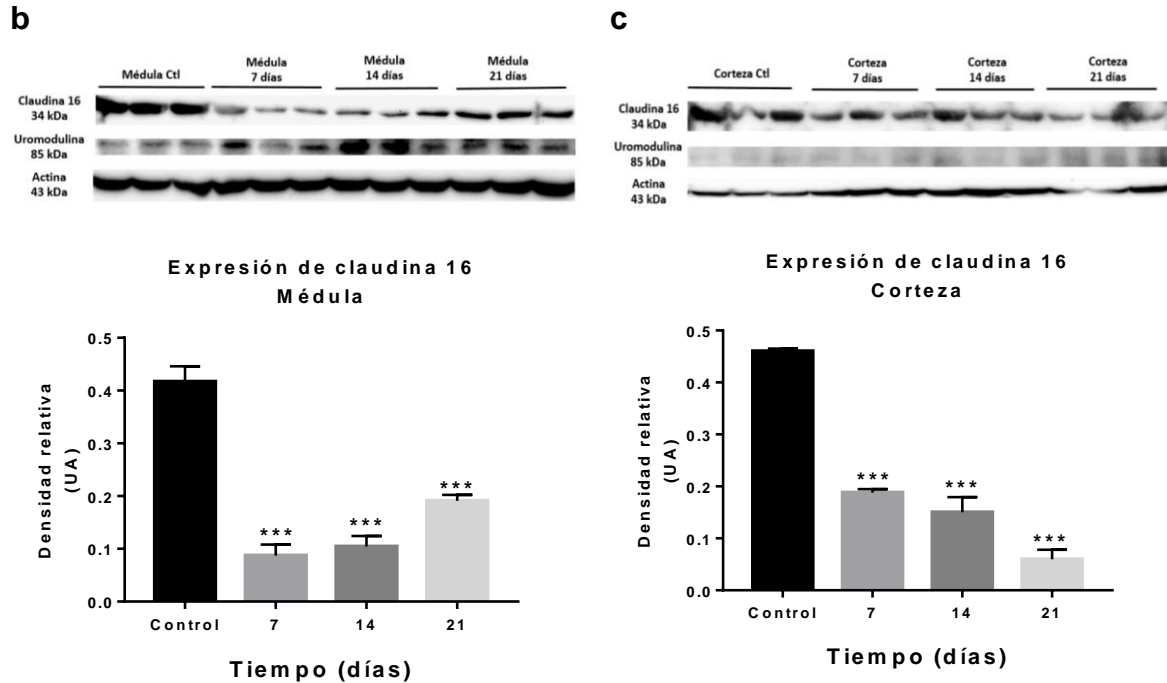
**Figura 11.** Las ratas diabéticas tipo 1 presentan aumento en la fracción de excreción de los iones calcio y magnesio. a) depuración de calcio ajustada por 100g de peso corporal, b) fracción excretada de calcio, c) depuración de magnesio ajustada por 100 g de peso corporal, d) fracción excretada de magnesio, e) valores séricos de calcio, f) valores séricos de magnesio. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM.  $n=6$ . Estadística: ANOVA 1 vía, Bonferroni \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  y \*\*\* $p<0.001$ .

### 6.3 La expresión de claudina-16 en el asa ascendente gruesa de Henle disminuye en ratas diabéticas tipo 1.

Evaluamos la expresión de las proteínas encargadas de la regulación de iones divalentes a nivel del asa ascendente gruesa de Henle (claudina-16) mediante inmunofluorescencia y western blot. Mediante la técnica de inmunofluorescencia

(Figura 12) se observó que en condiciones normales el patrón de claudina-16 es como “serpenteo” continuo sin embargo en la condición diabética el patrón se pierde y se deslocaliza la señal haciéndose citoplasmática. Como marcador de asa ascendente se usó THP (proteína de Tamm-Horsfall o uromodulina) (marcada en rojo). Estos cambios se confirmaron mediante el análisis cuantitativo de la expresión de la proteína en la fracción medular y de corteza mediante la técnica de Western blot; donde se observó una disminución en la expresión de claudina-16 en medula en el día 7 ( $0.874 \pm 0.036$  UA), día 14 ( $0.1045 \pm 0.034$  UA) y día 21 ( $0.191 \pm 0.019$  UA) respecto a los controles ( $0.417 \pm 0.05$ ). Además se observó una disminución de la expresión de claudina-16 en corteza en los días 7 ( $0.1881 \pm 0.01$  UA), en el día 14 ( $0.1504 \pm 0.05$  UA) y día 21 ( $0.0597 \pm 0.02$  UA) respecto a los controles ( $0.4604 \pm 0.007$  UA).





**Figura 12. La diabetes disminuye la expresión de claudina-16 en el asa ascendente gruesa de Henle evaluado mediante el análisis por inmunofluorescencia.** a) Expresión de claudina-16 en asa ascendente gruesa de Henle (marca verde), se usó THP como marcador de asa ascendente (marca en rojo), b) cuantificación por Western blot de claudina-16 en médula, c) cuantificación por Western blot de claudina-16 en corteza. La  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. UA, unidades arbitrarias. Se muestra el promedio  $\pm$  EEM.  $n=6$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  y \*\*\* $p<0.001$ .

## 9 Discusión

La hiperglicemia presente en la diabetes mellitus ocasiona daños en el funcionamiento renal que a largo plazo culminan en insuficiencia renal. Se conoce que en fases tempranas de nefropatía diabética hay daño diferencial sobre la expresión de las proteínas de la unión estrecha dando como consecuencia aumento

en la excreción fraccional de sodio [41,42] Diversos estudios han evidenciado la relación existente entre diabetes mellitus y aumento en la excreción de magnesio.

En este estudio se evaluó el efecto de la hiperglicemia sobre la expresión de la molécula de la unión estrecha claudina-16, localizada en el asa ascendente gruesa de Henle y su relación con el manejo renal de los iones magnesio y calcio. Nuestros resultados sugieren que el aumento en la fracción de excreción de los iones calcio y magnesio se encuentra relacionado con la disminución de la expresión de claudina-16 a nivel del asa ascendente gruesa de Henle.

Nosotros consideramos que a los 21 días nuestro modelo se encuentra en la fase temprana de la nefropatía diabética, ya que el aumento en la depuración de creatinina (hiperfiltración glomerular) y el aumento en la proteinuria al día 21 se han descrito clásicamente como cambios tempranos de nefropatía [7, 9, 12, 41]. Lo que posiblemente pudiera explicar que en nuestro estudio los niveles séricos de magnesio no disminuyeron en ratas diabéticas durante los 21 días de seguimiento, creemos que la hipomagnesemia puede hacerse evidente con un seguimiento más largo, debido a que observamos que los valores de magnesio sérico en el día 21 parecen disminuir (Figura 11 f) sin embargo no alcanzan diferencia estadísticamente significativa.

En nuestro trabajo observamos la disminución de la expresión de claudina-16 a nivel del asa ascendente gruesa de Henle en las ratas diabéticas (Figura 12 d, e), lo cual podría explicar parcialmente el aumento en la excreción fraccional de magnesio y calcio; además observamos una deslocalización de la proteína claudina-16, observándola más citoplasmática que membranal lo cual podría contribuir a su mal funcionamiento. La claudina-16 ha sido identificada como una de las moléculas implicadas en la reabsorción de magnesio a nivel del asa ascendente gruesa de Henle sitio donde se lleva a cabo el mayor porcentaje de reabsorción de calcio y magnesio mediante transporte paracelular; sin embargo no sólo esta molécula ha sido implicada en el transporte de iones divalentes a nivel del asa ascendente gruesa, otras claudinas como claudina-19 y claudina-14 se encuentran regulando el paso de los iones por la ruta paracelular (mutaciones en claudina-16 [21] y en

claudina-19 [45] dan origen a un síndrome monogénico llamado hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis (FHHNC; OMIM #248250)).

Se sabe que en condiciones fisiológicas normales, claudina 19 y claudina-16 forman un canal de catiónico heteromérico que brinda a la selectividad a los iones calcio y magnesio necesaria para su reabsorción en éste segmento de la nefrona [22, 23, 24]. Por otro lado, claudina-14 interactúa físicamente con claudina-16 pero no de manera directa con claudina-19 y bloquea su permeabilidad catiónica, se ha evidenciado que la transcripción y los niveles de claudina-14 están regulados positivamente por una dieta alta en calcio, además los animales con delección de claudin-14 desarrollan hipermagnesemia, hipomagnesuria e hipocalciuria en condiciones dietéticas altas de calcio [25].

El otro sitio encargado de la reabsorción de magnesio es el túbulo contorneado distal, donde el canal TRPM6 permite la reabsorción del ion, aunque la cantidad de magnesio reabsorbido en este segmento no es abundante, el túbulo contorneado distal es un segmento crítico ya que se ha evidenciado que mutaciones en el canal TRPM6 causan un trastorno genético con hipomagnesemia e hipermagnesuria [26, 30, 31, 32].

En un estudio previo en un modelo de diabetes mellitus tipo 1 y con tiempo de seguimiento de 14 días [46], se demostró al igual que en nuestro estudio que no existen cambios en los niveles séricos de magnesio, sin embargo dicho trabajo no reporta alteraciones en la expresión de claudina-16 aunque sí un aumento en la expresión de TRPM6, con lo que sugieren un papel como posible mecanismo compensatorio ante la pérdida aumentada de magnesio.

Por otro lado, existe evidencia usando ratas obesas y diabéticas tipo 2 (OLETF y LETO) a las edades de 16, 24 y 34 semanas; de un aumento en la excreción de magnesio a las 24 semanas de edad, mientras que la hipomagnesemia fue aparente hasta las 34 semanas de seguimiento; aunque en éste estudio la expresión de claudina-16 en uniones estrechas de la rama ascendente gruesa de Henle no sufrió alteraciones, se evidenció la regulación a la baja del canal TRPM6, resultados que

contrastan con los observados previamente en un modelo tipo 1 [47]. Estas observaciones sugieren evaluar el papel de la insulina, así como los niveles de glucosa, en la regulación de la reabsorción de magnesio.

Las claudinas (claudina-14 y 19) y el canal TRPM6 no fueron evaluadas en nuestro trabajo; sin embargo, el aumento en la excreción fraccional de calcio y magnesio, sugieren la alteración en la expresión de estas proteínas.

## 10 Conclusión

La hiperglicemia altera de manera diferencial la expresión de las proteínas de la unión estrecha ocasionando en algunos casos alteración en el manejo renal de electrolitos; en el presente trabajo se evidencia que en un modelo de diabetes tipo 1 se disminuye la expresión de la proteína claudina-16 presente en las uniones estrechas del asa ascendente gruesa de Henle y además se observa una deslocalización de la proteína, relacionándose con una disminución de la reabsorción de magnesio y calcio, teniendo como consecuencia final un aumento en la fracción excretada de dichos iones.

## 11 Perspectivas

Debido a que este trabajo se limita a evaluar solo la expresión renal de la proteína claudina-16, se pretende evaluar mediante inmunofluorescencia y western blot cambios en la expresión de claudina-14 y 19, y cómo se encuentran alteradas las interacciones entre las mismas. Además se pretende evaluar el túbulo contorneado distal mediante la cuantificación de la expresión de TRPM6. Evaluar el impacto de la corrección de las cifras de glucosa (mediante la administración de insulina a las ratas inducidas con estreptozotocina) sobre la expresión de las proteínas claudina-16, claudina-19, claudina-14 y TRPM6. Se pretende además prolongar el tiempo de seguimiento de las ratas diabéticas tipo 1, para evaluar si en algún momento el aumento de en la fracción excretada de magnesio aumente de tal manera que cause disminución en los niveles séricos del ion y evaluar si existe una relación entre éste fenómeno y el deterioro en la función renal. Evaluar en un modelo de diabetes tipo



2 las alteraciones en las proteínas encargadas de la reabsorción de magnesio a nivel renal.

## 12 Bibliografía

- [1] Brenner, B., Rector, F., & Skorecki, K. (2018). Brenner y Rector, el riñón. Madrid: Elsevier España.
- [2] Hall, J., & Guyton, A. (2016). Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- [3] Informe mundial sobre la diabetes. (2016). Retrieved from <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>.
- [4] American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2018. Diabetes Care 2018;41(Suppl. 1):S13–S27
- [5] American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes--2018. Diabetes Care 2018;41(Suppl. 1):S13–S27
- [6] Harcourt, B., Penfold, S., & Forbes, J. (2013). Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. Nature Reviews Endocrinology, 9(2), 113-123. doi: 10.1038/nrendo.2012.236
- [7] Yan, S., Ramasamy, R., & Schmidt, A. (2008). Mechanisms of Disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, 4(5), 285-293. doi: 10.1038/ncpendmet0786
- [8] Zheng, Y., Ley, S., & Hu, F. (2017). Global etiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology, 14(2), 88-98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151
- [9] Afkarian, M. et al. Clinical manifestations of kidney disease among US adults with diabetes, 1988–2014. JAMA 316, 602–610 (2016).
- [10] Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients. N Engl J Med. 1984;311(2):89–93.

- [11] Reidy, K., Kang, H., Hostetter, T., & Susztak, K. (2014). Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *Journal Of Clinical Investigation*, 124(6), 2333-2340. doi: 10.1172/jci72271
- [12] Sierra-Mondragon, E., Molina-Jijon, E., Namorado-Tonix, C., Rodríguez-Muñoz, R., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. (2018). All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF-κB during initiation of diabetic nephropathy. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 60, 47-60. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.002.
- [13] White KE, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*. 2002;51(10):3083–3089.
- [14] Rerup C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22:485–518
- [15] Junod, A., Lambert, A., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A., & Renold, A. (1967). Studies of the Diabetogenic Action of Streptozotocin. *Experimental Biology And Medicine*, 126(1), 201-205. doi: 10.3181/00379727-126-32401
- [16] Lenzen, S. (2007). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7
- [17] Blaine, J., Chonchol, M., & Levi, M. (2014). Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clinical Journal Of The American Society Of Nephrology*, 10(7), 1257-1272. doi: 10.2215/cjn.09750913.
- [18] Krug, S., Schulzke, J., & Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 36, 166-176. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.002
- [19] Gong, Y., & Hou, J. (2016). Claudins in barrier and transport function—the kidney. *Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology*, 469(1), 105-113. doi: 10.1007/s00424-016-1906-6
- [20] Haisch, L., Almeida, J., Abreu da Silva, P., Schlingmann, K., & Konrad, M. (2011). The Role of Tight Junctions in Paracellular Ion Transport in the Renal Tubule: Lessons Learned From a Rare Inherited Tubular Disorder. *American Journal Of Kidney Diseases*, 57(2), 320-330. doi: 10.1053/j.ajkd.2010.08.038.

- [21] Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science* 285: 103–106
- [22] Hou, J. (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal Of Cell Science*, 118(21), 5109-5118. doi: 10.1242/jcs.02631.
- [23] Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A., Schneeberger, E., & Paul, D. et al. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *Journal Of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/jci33970
- [24] Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15350–15355.
- [25] Gong, Y., Renigunta, V., Himmerkus, N., Zhang, J., Renigunta, A., Bleich, M., & Hou, J. (2012). Claudin-14 regulates renal Ca<sup>++</sup> transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *The EMBO Journal*, 31(8), 1999-2012. doi: 10.1038/emboj.2012.49
- [26] Chubanov V., Gudermann T. (2014) TRPM6. In: Nilius B., Flockerzi V. (eds) *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 222. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [27] Thebault S, Alexander RT, Tiel Groenestege WM, et al. EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:78–85.
- [28] Groenestege WMT, Hoenderop JG, van den Heuvel L, et al. The epithelial Mg<sup>2+</sup> channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg<sup>2+</sup> content and estrogens. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1035–1043.
- [29] Cao G, van der Wijst J, van der Kemp A, et al. Regulation of the epithelial Mg<sup>2+</sup> channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *J Biol Chem* 2009; 284:14788–14795.
- [30] Chubanov, V., Waldegger, S., Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M., & Seyberth, H. et al. (2004). Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary

- hypocalcemia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 101(9), 2894-2899. doi: 10.1073/pnas.0305252101.
- [31] van der Wijst, J., Bindels, R., & Hoenderop, J. (2014). Mg<sup>2+</sup> homeostasis: the balancing act of TRPM6. *Current Opinion In Nephrology And Hypertension*, 23(4), 361-369. doi: 10.1097/01.mnh.0000447023.59346.ab
- [32] Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 31: 166–170, 2002
- [33] Gommers, L., Hoenderop, J., Bindels, R., & de Baaij, J. (2015). Hypomagnesemia in Type 2 Diabetes: A Vicious Circle?. *Diabetes*, 65(1), 3-13. doi: 10.2337/db15-1028
- [34] Chaudhary, D., Sharma, R., & Bansal, D. (2009). Implications of Magnesium Deficiency in Type 2 Diabetes: A Review. *Biological Trace Element Research*, 134(2), 119-129. doi: 10.1007/s12011-009-8465-z.
- [35] Floege, J. (2014). Magnesium in CKD: more than a calcification inhibitor?. *Journal Of Nephrology*, 28(3), 269-277. doi: 10.1007/s40620-014-0140-6.
- [36] Kao, W., Folsom, A., Nieto, F., Mo, J., Watson, R., & Brancati, F. (1999). Serum and Dietary Magnesium and the Risk for Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives Of Internal Medicine*, 159(18), 2151. doi: 10.1001/archinte.159.18.2151.
- [37] Meyer, K., Kushi, L., Jacobs, D., Slavin, J., Sellers, T., & Folsom, A. (2000). Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 71(4), 921-930. doi: 10.1093/ajcn/71.4.921.
- [38] Lopez-Ridaura, R., Willett, W., Rimm, E., Liu, S., Stampfer, M., Manson, J., & Hu, F. (2003). Magnesium Intake and Risk of Type 2 Diabetes in Men and Women. *Diabetes Care*, 27(1), 134-140. doi: 10.2337/diacare.27.1.134.
- [39] Song, Y., Manson, J., Buring, J., & Liu, S. (2004). A Prospective Study of Red Meat Consumption and Type 2 Diabetes in Middle-Aged and Elderly Women:

- The Women's Health Study. *Diabetes Care*, 27(9), 2108-2115. doi: 10.2337/diacare.27.9.2108.
- [40] Pham, P., Pham, P., Pham, P., Pham, S., Pham, H., & Miller, J. et al. (2005). Lower serum magnesium levels are associated with more rapid decline of renal function in patients with diabetes mellitus type 2. *Clinical Nephrology*, 63(06), 429-436. doi: 10.5414/cnp63429.
- [41] Moctezuma-Velázquez, C., Gómez-Sámamo, M., Cajas-Sánchez, M., Reyes-Molina, D., Galindo-Guzmán, M., & Meza-Arana, C. et al. (2017). High Dietary Magnesium Intake is Significantly and Independently Associated with Higher Insulin Sensitivity in a Mexican-Mestizo Population: A Brief Cross-Sectional Report. *Revista De Investigación Clínica*, 69(1). doi: 10.24875/ric.17002086
- [42] Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Namorado, M., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. (2014). Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radical Biology And Medicine*, 72, 162-175. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040.
- [43] Molina-Jijón, E., Rodríguez-Muñoz, R., Namorado, M., Bautista-García, P., Medina-Campos, O., Pedraza-Chaverri, J., & Reyes, J. (2015). All- trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 26(5), 441-454. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.018
- [44] Rosas Lorena, et. Al (2017), Expresión renal de las proteínas de la unión estrecha claudina-2, claudina-5 y ocludina y del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ) en un modelo experimental de nefropatía diabética tipo 2. (Tesis de maestría). Cinvestav, México.
- [45] Arreola-Mendoza, L., Reyes, J., Melendez, E., Martin, D., Namorado, M., Sanchez, E., & Del Razo, L. (2005). Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology*. doi: 10.1016/j.tox.2005.11.010
- [46] Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakaloglu SA,

- Hediger MA, Gallati S et al (2006) Mutations in the tight junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 79: 949–957
- [47] Lee, C., Lien, Y., Lai, L., Chen, J., Lin, C., & Chen, H. (2006). Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney International*, 69(10), 1786-1791. doi: 10.1038/sj.ki.5000344
- [48] Takayanagi, K., Shimizu, T., Tayama, Y., Ikari, A., Anzai, N., & Iwashita, T. et al. (2015). Downregulation of transient receptor potential M6 channels as a cause of hypermagnesiuric hypomagnesemia in obese type 2 diabetic rats. *American Journal Of Physiology-Renal Physiology*, 308(12), F1386-F1397. doi: 10.1152/ajprenal.00593.2013.