



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“Estudio de la nefropatía diabética en
ratas”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

ELIDIA LOREDO NÚÑEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

APOYOS RECIBIDOS.

Durante el desarrollo de este trabajo recibí beca del CONACYT, con número de becario 182667.

Este proyecto fue financiado por el IMSS con el número de proyecto FP-2003/023.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL.

Dra. María Cristina Revilla Monsalve.

Dr. Raúl Mancilla Jiménez.

Dr. Sergio Agustín Islas Andrade.

DEDICATORIA.

A el amor de mi vida Abrahan, por tu apoyo incondicional.

A mis padres, mis padres adoptivos y mis hermanos, por su cariño y confianza.

A la Dra. Cristina Revilla y al Dr. Sergio Islas por permitirme ser parte de su equipo.

A los M en C. Alejandra Contreras y Miguel Ángel Palomino por el apoyo técnico y académico, pero sobre todo por su amistad.

AGRADECIMIENTOS.

A el comité tutorial , por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A el Dr. Pedro Martín Hernández Quiroz, por las asesorías recibidas.

A la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias y a sus alumnos: Karina, Perla y Ricardo por el apoyo técnico recibido en el manejo del Axioscop 4.

A el equipo número uno de la UIMEM: Graciela, Libo, Mario, Mari Carmen Miñana y Morelia.

A Minerva García Palacios por su amistad y confianza.

A Eva Ochoa por siempre darme ánimos para seguir adelante.

INDICE	PAG
Resumen.	I
Abstract.	II
Antecedentes.	1
1.Diabetes Mellitus (DM).	1
1.1Prevalencia.	1
1.2 Concepto.	2
1.3 Clasificación.	3
1.4 Complicaciones de DM.	4
1.5 Costos directos e indirectos atribuidos a DM y sus complicaciones.	7
2. Nefropatía Diabética (ND).	9
2.1 Cambios funcionales.	9
2.1.1 Hiperfiltración.	9
2.1.2 Microalbuminuria.	10
2.1.3 Proteinuria.	10
3. Mecanismos asociados al daño renal.	12
3.1 Glucotoxicidad.	12
3.2 Productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA).	13
3.3 Vía del poliol.	16
3.3.1 Mioinositol y ATPasa Na ⁺ - k ⁺ .	18
3.3.2 Sistema PKC.	18
3.4 Función endotelial anormal.	19
3.5 Especies reactivas de oxígeno.	20
3.6 Factores que intervienen en la acumulación de matriz extracelular.	21
3.6.1 Sistema renina angiotensina (SRA).	22
3.6.2 Factor transformante β (TFG- β).	22
3.6.2.1 Otros factores que regulan la actividad de TFG- β .	23
3.6.3 Factor de crecimiento de tejido conectivo.	24
3.6.4 Factor de crecimiento derivado de plaquetas.	24
3.6.5 Hormonas de crecimiento y factores de crecimiento similares a Insulina.	24
3.7 Matriz extracelular	25
3.8 Degradación de la matriz extracelular.	31
3.9 Cambios morfológicos.	36
3.10 Lesiones provocadas por la ND.	37
4. Alteraciones en el riñón de ratas con diabetes inducida.	41
5. Diabetes experimental.	46
5.1 Inducción de la Diabetes.	46
5.2 Modelos de Diabetes espontánea.	46
5.3 Modelos de Diabetes Inducida.	48
5.3.1 Inducción quirúrgica.	48
5.3.2 Inducción hormonal.	48
5.3.3 Inducción viral.	48
5.3.4 Inducción química.	49
5.3.4.1 Aloxana.	50
5.3.4.2 Estreptozotocina.	52

6. Planteamiento del problema.	56
7. Hipótesis.	56
8. Objetivos.	56
8.1 Objetivo general.	56
8.2 Objetivos particulares.	56
9. Material y métodos.	57
9.1 Parámetros bioquímicos.	58
9.2 Microscopia óptica de luz.	59
9.3 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia.	59
9.4 Análisis morfométrico.	60
9.5 Análisis de la intensidad de la inmunofluorescencia.	61
10. Análisis estadístico.	61
11. Resultados.	62
11.1 Peso.	62
11.2 Glucosa.	63
11.3 Proteinuria.	65
11.4 pH.	66
11.5 Glucosuria.	68
11.6 Hematuria.	69
12. Química sanguínea.	71
12.1 Hemoglobina glucosilada.	71
12.2 Glucosa Sérica.	72
12.3 Insulina.	73
12.4 Colesterol.	74
12.5 Triglicéridos.	75
12.6 VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad).	75
12.7 Creatinina.	76
12.8 Ácido úrico.	77
13. Riñones.	78
13.1 Peso.	78
14. Páncreas.	80
14.1 Peso.	80
15. Análisis morfológico del riñón.	82
16. Análisis morfométrico.	88
17. Inmunohistoquímica.	92
18. Microscopia confocal.	96
19. Análisis de la intensidad de la inmunofluorescencia.	100
20. Discusión.	104
21. Conclusiones.	111
22. Bibliografía.	112

RESUMEN.

Se realizó un estudio morfológico, inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia de la nefropatía diabética en ratas para demostrar el daño estructural del riñón y la alteración en la distribución y cantidad de tres moléculas de matriz extracelular. 85 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con peso 200-250g fueron divididas en 2 grupos, el grupo experimental (E), fue inyectado i.p. con 50 mg/kg de peso de estreptozotocina (STZ) y el grupo control (C), fue inyectado i.p. con amortiguador de acetatos 0.1M pH 4.3. Las ratas del grupo E con niveles de glucosa \geq 200 mg/dl, 48 horas después de la inyección de STZ se consideraron diabéticas. 19 ratas experimentales (EI) y 9 controles (CI) fueron sacrificadas el día 30. 17 ratas experimentales (EII) y 9 controles (CII) fueron sacrificadas el día 60. 21 ratas experimentales (EIII) y 10 controles (CIII) fueron sacrificadas el día 90. Se obtuvieron los riñones y se registro su peso y diámetro. Los riñones derechos se procesaron con técnicas convencionales de histología, para determinar su estructura. Se realizó el estudio inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia para determinar la distribución y cantidad de fibronectina (fb), laminina AB-1(lm) y colágena tipo IV (col IV).

El peso promedio de los riñones de los grupos E fue mayor que el de los grupos C, incrementando progresivamente a lo largo del estudio. El análisis morfológico de los riñones de los grupos E reveló dilatación de los túbulos colectores (tc) y túbulos proximales (tp) en los 3 grupos E, y fibrosis peritubular en los grupos EII y EIII. No se presentaron alteraciones en los túbulos distales. El análisis morfométrico demostró aumento del volumen glomerular y de la matriz mesangial; así como engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG) en los grupos E.

Los estudios inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia revelaron que en los grupos E la distribución normal de fb, lm y col IV es preservada. La cantidad de fb y lm incrementó a lo largo del estudio, la col IV incrementa en el grupo EI y disminuye considerablemente en los grupos EII y EIII.

Nosotros concluimos que la nefropatía diabética provoca cambios estructurales principalmente en la corteza renal caracterizados por engrosamiento de la MBG, incremento de la matriz mesangial y del volumen glomerular y alteración en la cantidad de fb, lm y col IV que contribuyen al deterioro progresivo de la función renal.

ABSTRACT.

A morphological, immunohistochemical and immunofluorescent study of the diabetic nephropathy was performed in rats to demonstrate the progressive structural damage of the kidneys and the alteration in the distribution and quantity of three extracellular matrix molecules. Eighty five female Sprague-Dawley rats, weighting 200-250 g were divided in two groups, the experimental group (E) was i.p. injected with 50 mg/kg BW of streptozotocine (STZ) and the control group (C) was i.p. injected with acetate buffer 0.1M pH 4.3. Rats of the E group with glucose values ≥ 200 mg/dl, 48 hrs after the STZ injection were considered diabetic. Nineteen experimental (EI) and nine control rats (CI) were sacrificed on day 30. Seventeen experimental (EII) and nine control rats (CII) were sacrificed on day 60 and twenty-one experimental (EIII) and ten control rats (CIII) were sacrificed on day 90. The kidneys were obtained and the ratio weight/diameter was registered. The right kidneys were processed with conventional histological techniques in order to analyze the structure. Immunohistochemical and immunofluorescence studies were performed to determine the distribution and quantity to fibronectine (fb), AB-1 laminine (lm) and type IV collagen (col IV).

The average weight of the kidneys was greater in the E group than in the C group rats, increasing progressively along the study. The histological analysis revealed dilatation of the collector (ct) and the proximal tubules (pt) in the EI, EII and EIII groups and peritubular fibrosis in the EII and EIII groups. No alterations were detected in the distal tubules. The morphometrical analysis demonstrated an increase of the glomerular volume and mesangial matrix and thickening of the glomerular basal membrane (MBG) in the E groups.

Immunohistochemical and immunofluorescent studies revealed that in the E groups the normal distribution of fb, lm and col IV is preserved. The quantity of fb and lm increased along the study and col IV increased in the EI group but decreased greatly in the EII and EIII groups.

We can conclude that the diabetic nephropathy provokes structural changes mainly in the renal cortex characterized by the thickening of the MBG, and increase in the mesangial matrix and in the glomerular volume and alteration in the quantity of fb, lm and col IV, alterations that contribute to the progressive damage of the renal function.

ANTECEDENTES

1. DIABETES MELLITUS (DM).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica progresiva que se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido al incremento en su prevalencia, cronicidad y complicaciones tardías incapacitantes.

Estudios realizados por King y colaboradores (1998), indican que la prevalencia de la diabetes tipo 2 aumentará del 4% que se había calculado en 1995 a 5.4% en 2025. El número de adultos diabéticos en el mundo aumentará de 135 millones que había en 1995 a 300 millones en 2025 y la mayor parte de este incremento ocurrirá en los países en vías de desarrollo en los que aumentará 170% con 228 millones de pacientes diabéticos. En el 2025 más del 75% de los pacientes diabéticos habitarán en países en vías del desarrollo y sus edades fluctuarán entre 45 y 64 años y habrá más mujeres que hombres diabéticos que se concentrarán en las áreas urbanas (1).

México ocupó el décimo lugar mundial en 1995 con casi 4 millones de enfermos. Se estima que en el año 2025 ocupará el séptimo lugar mundial con 12 millones de enfermos. Actualmente 65% de los diabéticos padecen de hipertensión arterial, y 60% tiene daño moderado a severo en el sistema nervioso, y tienen 2.4 veces mayor riesgo de sufrir un evento vascular cerebral, insuficiencia renal, ceguera, amputación de extremidades y ataques cardíacos, se considera que este problema de salud será mucho más severo de lo que actualmente representa (1,2,3).

1.1 PREVALENCIA.

La prevalencia en muchos países está aumentando en forma acelerada, observándose un incremento del 40% de diabéticos diagnosticados entre 1991 y 1999, situación que paralelamente se acompaña en aumento en la prevalencia de obesidad.

México se encuentra dentro de los diez países con mayor número de diabéticos (4).

Prevalencia en México:

Durante la última década se han diagnosticado 1, 246,649 de casos nuevos de diabetes mellitus y se detectaron en promedio 285 diabéticos diariamente. De 1984 al 2000, el incremento de consultas en medicina familiar por diabetes mellitus, fue de 519.7% y de 274.3% en los servicios de especialidades médicas. El comportamiento en la demanda de atención por diabetes mellitus en medicina familiar, permite predecir un crecimiento anual promedio de 3.3% (4).

En cuanto a la demanda hospitalaria que genera la diabetes mellitus, el incremento ha sido dos veces mayor en comparación con los egresos totales. En el IMSS, durante los últimos diez años, han fallecido 138,409 derechohabientes por diabetes mellitus, con un promedio de 34 defunciones diarias, lo que representa la primera causa dentro de los principales motivos de mortalidad según frecuencia. En el año 2000 ocurrieron 14,520 defunciones, el grupo de mayor riesgo fue el adulto mayor con 282 defunciones por cada 100 mil derechohabientes usuarios (4).

Las muertes tempranas, asociadas a esta causa, generaron 113,014 años de vida potencial perdidos. (AVPP). El futuro de la diabetes es desalentador, por el incremento importante en el número de casos en población joven, aparición de factores de riesgo a edades cada vez más tempranas, aumento de complicaciones secundarias, carga económica elevada, desabasto para la demanda de atención y un número importante de AVPP (4).

1.2 CONCEPTO DE DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus es un grupo heterogéneo de alteraciones caracterizadas por hiperglucemia crónica asociada a una acción inadecuada de la insulina que es acompañada por una variedad de alteraciones bioquímicas y manifestaciones clínicas cuya naturaleza y gravedad dependen de la patogenia subyacente al estado diabético, del grado de deficiencia de insulina, de la participación de los factores ambientales y del daño progresivo de diversos órganos y tejidos (5).

Esta enfermedad está determinada genéticamente y el sujeto que la padece tiene alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas que coexisten con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables a ésta (5,6).

Cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y en la mayoría de los pacientes con larga evolución de la enfermedad por complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como macroangiopáticas con afección de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía.

La diabetes es generalmente diagnosticada sobre bases clínicas tomando en consideración los síntomas y las complicaciones agudas y/o crónicas, secundarias a los niveles de glucosa sanguínea elevados (6).

1.3 CLASIFICACIÓN.

A través del tiempo han existido diferentes clasificaciones de la enfermedad tomando en consideración diferentes criterios. Una de las clasificaciones que estuvo vigente por muchos años fue la que en 1985 propuso la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasificación que tomaba en cuenta los síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso) y eliminaba los números romanos de la clasificación anterior (Clasificación de National Diabetes Data Group), dejándola solamente como dependiente o no dependiente de insulina, con sus variedades de obeso y no obeso y mantenía la clasificación de Clases de Riesgo Estadístico. En 1997, un comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (Diabetes Care 1997), reclasificó a la enfermedad, en base al mejor entendimiento de los procesos etiopatogénicos y moleculares. Este grupo de expertos propuso que para establecer el diagnóstico de diabetes, además de tomar en cuenta los síntomas clásicos, se deberá contar con una determinación al azar de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl o una determinación de glucosa plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl o niveles de glucosa $>$ de 200 mg/dl a las 2 horas posteriores a la administración de una carga de 75 g de glucosa en agua (Curva de Tolerancia a Glucosa Oral, CTGO). Estos nuevos criterios tienen la ventaja de poder diagnosticar más tempranamente esta enfermedad, clasificarla adecuadamente y con poder establecer un control más estricto, que obligadamente contribuirá a prevenir la presentación de las complicaciones tardías de la enfermedad (5).

El concepto actual sobre la diabetes señala que la enfermedad, más que ser un solo desorden, es un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica, existiendo al menos cuatro grandes tipos de la enfermedad (7).

I. Diabetes tipo 1. - anteriormente conocida como Diabetes tipo I o Diabetes Mellitus Insulino-dependiente (IDDM), incluye a pacientes con destrucción ideopática o inmune de las células β del páncreas.

II. Diabetes tipo 2. - anteriormente conocida como Diabetes tipo II o Diabetes Mellitus no Insulino-dependiente (NIDDM), incluye pacientes con resistencia tisular a la acción de la insulina que pueden presentar de manera paralela defectos en la secreción de esta hormona.

III. Otros tipos de diabetes.- inducida por defectos genéticos a nivel de las células β del páncreas que son heredados en forma autosómica dominante o a nivel de alteraciones en la estructura de la molécula de insulina, por enfermedades del páncreas exócrino, por endocrinopatías, por drogas capaces de inducir el estado diabético, por infecciones, por mediación inmunológica o por síndromes asociados a la enfermedad.

IV. Diabetes gestacional.- comienza en el embarazo y desaparece después del parto. En estos casos, el efecto de la insulina es bloqueado parcialmente por hormonas antagonistas producidas por la placenta a partir de la vigésimo cuarta semana de la gestación humana -por lo que se dice que el embarazo es un estado diabetogénico *per se*.

1.4 COMPLICACIONES DE DM.

Las complicaciones de DM se presentan con mayor frecuencia en pacientes descontrolados, estas complicaciones pueden ser consideradas como agudas y crónicas; dentro de las complicaciones agudas se encuentran principalmente la cetoacidosis diabética (CAD) y el síndrome hiperosmolar no cetótico, menos frecuentemente se presentan la hipoglucemia y la acidosis láctica (Cuadro 1) (8).

La CAD provoca hiperglucemia debido a la ausencia casi absoluta de insulina así como el incremento de la producción de glucosa por el hígado vía la gluconeogénesis y la glucogenólisis (8, 9,10).

Además, durante la CAD también se producen hipercetonemia, acidosis metabólica y alteraciones hidroelectrolíticas (9).

La hipertonicidad no cetosica puede presentarse como primera manifestación de la diabetes mellitus tipo 2 y en otras ocasiones como resultado de factores desencadenantes en cualquier paciente diabético descontrolado.

Es un síndrome que puede aparecer por diversas causas como supresión inadecuada de hipoglucemiantes orales, insulina o ambos, infecciones concomitantes, infarto agudo del miocardio, accidente vascular cerebral, pancreatitis, etc (8).

La hipertonicidad indica un aumento en la concentración de solutos osmóticamente efectivos en plasma y líquido extracelular; por lo tanto, la consecuencia de la hipertonocidad es la deshidratación celular por agotamiento del líquido intracelular, que pasa al espacio extracelular con la finalidad de igualar la tonicidad (8).

La hipoglucemia se define como la concentración baja de glucosa plasmática con presencia de síntomas típicos como manifestaciones adrenérgicas y neuroglupenia que mejoran con la administración de glucosa. La falta de glucosa para el trabajo muscular induce fatiga y debilidad en grado variable.

Las causas de hipoglucemia en los pacientes diabéticos pueden ser debido a causa de ejercicio inesperado, omisión de un alimento, pero también ocurre sin que se conozca la causa que la desencadenó o como efecto secundario del uso de hipoglucemiantes orales (sulfonilureas) (8).

A largo plazo, el paciente diabético puede presentar 2 tipos de complicaciones vasculares: microangiopáticas y macroangiopáticas (11).

Dentro de las complicaciones crónicas presentes con mayor incidencia entre los pacientes diabéticos están la enfermedad coronaria arterial, los infartos y la enfermedad arterial periférica.

La enfermedad cardiovascular, en muchos casos, es causada por aterosclerosis, que es una acumulación en exceso de placa en la pared interior de los vasos sanguíneos, lo cual restringe el flujo de sangre (11).

Al comienzo de las complicaciones microangiopáticas se presentan alteraciones funcionales reversibles, más tarde se producen alteraciones morfológicas cuya estabilización o regresión solo es posible en las etapas iniciales de este proceso mediante la optimización del control metabólico (11).

Morfológicamente, la microangiopatía diabética se caracteriza por el engrosamiento difuso de las membranas basales capilares, sobre todo en la piel, músculo esquelético, retina, glomérulo renal y médula renal (11).

En los pacientes diabéticos, complicaciones tales como la ceguera son 25 veces más comunes que en los no diabéticos; esta afección se produce por daño capilar de la retina que desencadena edema, y neo-formación de vasos y hemorragias. Los pacientes con diabetes también presentan catarata con más frecuencia que los no diabéticos (9,11).

Las alteraciones crónicas a nivel capilar también producen adelgazamiento de la membrana basal glomerular, lo que se refleja en un daño renal crónico con proteinuria que es 17 veces más común en los pacientes diabéticos. A nivel del sistema nervioso periférico en los pacientes diabéticos se puede producir la desmielinización por segmentos, lo que se asocia con una alta incidencia de disfunciones motoras, sensoriales y autonómicas entre las que se incluyen la impotencia que afecta al 40% de los pacientes masculinos (Cuadro 1) (9,11).

La neuropatía es probablemente la complicación más común de la diabetes. Existen estudios que sugieren que más del 50% de las personas con diabetes están afectadas en diferente grado. El principal factor de riesgo es el nivel de glucosa en sangre y el tiempo que éste dure. La neuropatía puede llevar a la

pérdida sensorial y daño en las extremidades, ésta es también la principal causa de impotencia en el hombre diabético (9,11).

La diabetes mellitus afecta prácticamente todo el organismo, incluida la piel; se estima que una tercera parte de los pacientes presenta manifestaciones cutáneas durante el curso de su enfermedad. Algunas dermatosis se han llegado a considerar signos marcadores de la diabetes y tres de ellas se han considerado diagnósticas; éstas son la ampolla diabética, la dermatopatía diabética y el síndrome de movilidad articular limitada y piel cérea (12).

El pie diabético es un proceso infeccioso, isquémico o ambos que se presenta en los tejidos que conforman el pie y que abarca desde una pequeña lesión cutánea hasta la gangrena extensa con pérdida de la extremidad (12).

Las dos lesiones básicas que se presentan en alguna etapa de la evolución de la diabetes son: la neuropatía (pie indoloro) y la angiopatía, tanto en la macrocirculación como en la microcirculación (pie sin pulso). Son el origen de las complicaciones isquémicas e infecciosas que se presentan en el pie del diabético (12).

La gangrena que lleva a amputación es por lo menos 5 veces más frecuente en los diabéticos. La expectativa de vida de los diabéticos en promedio, es de tan sólo dos terceras partes que el de la población general (9,12).

Cuadro1. Complicaciones agudas y crónicas en pacientes diabéticos

<p>AGUDAS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cetoacidosis diabética (CAD) • Síndrome hiperosmolar no cetótico • Hipoglucemia • Acidosis láctica <p>VASCULARES</p> <p>Macrovasculares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arteriosclerosis coronaria acelerada • Arteriosclerosis cerebrovascular acelerada • Vasculopatía periférica acelerada <p>Microvasculares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retinopatía • Nefropatía 	<p>NEUROPÁTICAS</p> <p>Neuropatía Sensomotora</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bilateral simétrica en extremidades inferiores • Bilateral simétrica en extremidades superiores • Mononeuropatía • Úlcera neuropática • Amiotrofia diabética • Caquexia neuropática <p>Neuropatía Autonómica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gastroparesia • Diarrea • Vejiga neurogénica • Impotencia • Reflejos cardiovasculares alterados
---	--

1.5 COSTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE DM Y SUS COMPLICACIONES.

El incremento en la morbilidad por DM se relaciona con el daño renal que ocasiona un incremento hasta 2 veces el riesgo de muerte. Aproximadamente 33% de estos casos corresponde a nefropatía diabética (ND), lo que convierte a este padecimiento en la causa más común de enfermedad renal terminal en el mundo occidental (13).

Se ha reportado que la enfermedad renal es la primera causa de muerte en pacientes con DM. En el IMSS la nefropatía diabética (ND) está dentro de las 5 primeras causas de atención médica en hospitales de zona y en los de alta especialidad.

La población con insuficiencia renal crónica en fase terminal que requiere terapia sustitutiva (diálisis o trasplante renal) se ha incrementado en México y en todo el mundo en forma alarmante. A nivel mundial hay más de un millón de pacientes en diálisis y se estima que el número actual de pacientes en alguna modalidad dialítica en México es superior a 24,000, lo que denota un crecimiento de alrededor del 11% anual durante los últimos ocho años. Del total de estos pacientes mexicanos en diálisis, cerca del 50% son diabéticos y es éste el subgrupo que se ha incrementado más rápidamente. Es importante señalar que el tratamiento de la insuficiencia renal crónica terminal (diálisis y trasplante) requiere de grandes cantidades de recursos económicos (13).

En México el tratamiento sustitutivo de la insuficiencia renal crónica consume una gran proporción de los recursos de salud, es causa muy frecuente de incapacidad, productividad laboral disminuida y ocupa el segundo lugar en años de vida saludables perdidos. A la luz de las perspectivas epidemiológicas de crecimiento de la población diabética con insuficiencia renal crónica terminal y su gran impacto sobre los sistemas de salud nacionales, particularmente en el de algunas naciones como México, es claro que requerimos de esfuerzos importantes para encontrar estrategias que nos permitan prevenir o retrasar la progresión del daño renal en la nefropatía diabética (13,14).

Barceló y colaboradores (2003), estimaron los costos de la diabetes en Latinoamérica y el Caribe, a partir de un cálculo de costos directos (uso de medicamentos, hospitalización, consultas y manejo de las complicaciones) y costos indirectos (pérdida de recursos potenciales). El número de muertes por diabetes fue estimada en 339.035, lo que representa una pérdida de 3 billones de dólares.

El costo anual total asociado con diabetes fue estimado en 65.216 millones de dólares con un total de costos directos por 10.721 millones de dólares e indirectos 54.496 millones de dólares (15).

Estudios previos realizados para obtener estos cálculos para la población mexicana reportan un costo total de 430 millones de dólares (130 millones en costos directos y 300 en costos indirectos). Los cálculos obtenidos por estos investigadores reportan un costo total de 15.1 billones de dólares (1.9 billones en costos directos y 13.1 en costos indirectos).

Estiman que el costo de la nefropatía en México es de 468.5 millones de dólares anuales y los costos totales anuales atribuidos a la diabetes es de 15.118.3 billones de dólares (15).

Para el año 2007 el IMSS estima otorgar casi siete millones de consultas a derechohabientes con DM, con un costo de 1,400 millones de pesos, lo que hace evidente la considerable carga financiera que representa para la institución, y que aumentaría aún más, al considerar el 30% de personas que desconocen ser diabéticas (4)

Estos datos por demás preocupantes hacen necesario realizar todo esfuerzo que esté a nuestro alcance para prevenir el desarrollo de esta enfermedad y para brindar a estos pacientes diversas alternativas de tratamiento antes de que desarrollen las complicaciones tardías, que necesariamente provocarán un deterioro en su calidad de vida y finalmente su muerte, independientemente del gran costo económico y social.

2. NEFROPATÍA DIABÉTICA.

Muchos son los factores que intervienen en la fisiopatología de esta enfermedad siendo uno de los factores más importantes en el desarrollo de las complicaciones, la hiperglucemia. Sin embargo, el deterioro progresivo de la función renal no depende únicamente de los niveles de glucosa, ya que otros factores pueden contribuir en las manifestaciones de esta compleja patología que presenta cambios hemodinámicos, metabólicos y estructurales (6).

2.1 CAMBIOS FUNCIONALES

La nefropatía evoluciona por varias fases interconectadas: 1) una fase temprana de anomalías fisiológicas de la función renal conocida como de microalbuminuria, 2) una fase clínica con proteinuria persistente y 3) una etapa final de insuficiencia renal (6).

2.1.1 HIPERFILTRACION

Al inicio de la nefropatía diabética se producen cambios estructurales en la microcirculación caracterizados por engrosamiento de la membrana basal endotelial, aumento de tejido mesangial y esclerosis del glomérulo, y cambios funcionales, entre ellos, el primero que se presenta, es la hiperfiltración (aumento en la tasa de filtración glomerular). Ésta puede acompañarse por un aumento en la fuga a través de la membrana basal glomerular, con paso de albúmina al filtrado glomerular y por lo tanto a la orina (6).

La albuminuria es un signo temprano y fácil de detectar en el diagnóstico de nefropatía diabética en desarrollo; pero es necesario descartar otras causas de proteinuria.

En condiciones normales el glomérulo permite el paso de agua y moléculas pequeñas como la glucosa y urea, y retiene proteínas mayores; las moléculas de 2.0 nm pasan con rapidez, pero proteínas con un peso molecular > 40 000 daltones pasan con mucha dificultad. Las macromoléculas como la albúmina se reabsorben en el túbulo proximal, por lo que la concentración de esta proteína en la orina es mínima. En pacientes con diabetes la membrana basal de los glomérulos permite el paso de proteínas de gran peso molecular, pierde compuestos aniónicos lo cual modifica su carga eléctrica y por lo tanto aumenta la filtración urinaria de la albúmina que tiene una carga negativa a pH fisiológico (7).

La barrera entre el capilar glomerular y el espacio urinario de la cápsula de Bowman puede ser considerada como una membrana perforada por poros con un tamaño promedio de 5.5nm, con cargas eléctricas negativas que son atribuidas al heparan sulfato, ácido siálico y otras proteoglicanos.

El tamaño y la carga de las moléculas determina su paso a través de la membrana, además de fuerzas hemodinámicas que controlan la filtración glomerular (16).

2.1.2 MICROALBUMINURIA.

En la microalbuminuria temprana, la depuración de albúmina e IgG se encuentran incrementadas; esto es muy probablemente debido a un incremento en la presión trans-glomerular favoreciendo el incremento en la filtración de proteínas en general independientemente de su carga.

Subsecuentemente, hay un incremento en el tamaño del poro, favoreciendo el paso de microalbuminuria a macroalbuminuria (6,16).

La microalbuminuria es la primera evidencia de nefropatía detectada en el laboratorio. Se define como el aumento en la velocidad de excreción de albúmina que va de 30 mg/min a 200 mg/min.

Los valores normales son de 1.5 a 20 mg/min con una media de 6.5 mg/min y 300 mg en 24 horas.

2.1.3 PROTEINURIA.

Inicialmente, la proteinuria es inconstante, aunque después se hace más evidente y puede alcanzar niveles o rangos nefróticos. Existen varios factores que explican la presencia de la proteinuria.

El primero es un efecto en la selectividad del tamaño y las alteraciones de la permeabilidad del glomérulo. El defecto ocurre a partir de una población de poros grandes, con poca selectividad, que determina el aumento de la fracción de filtración para moléculas mayores de 46 \AA ; esto permite el paso de proteínas plasmáticas grandes a la orina. El trastorno también es secundario al desprendimiento de células epiteliales y a los defectos consecuentes de la membrana basal (6, 7,16).

El segundo se refiere a la permeabilidad y la selectividad, que se modifican por una disminución de las cargas negativas de la pared capilar glomerular y por una reducción de ácido siálico y de heparan sulfato, que son dos de los principales componentes de la barrera. La glucosilación de las proteínas circulantes también influye en estas alteraciones del gradiente de presión hidráulica transcápilar (17,18).

La proteinuria se define como una pérdida de selectividad de tamaño y carga en la MBG. Una vez determinada persiste con valores >500 mg/día (6).

Los cambios histológicos característicos de la glomerulopatía diabética están presentes en más del 96% de los pacientes con DM tipo 1 con proteinuria y en aproximadamente el 85% de los pacientes con DM tipo 2 con proteinuria y retinopatía concomitante. Un 30% de los pacientes con DM tipo 2 con proteinuria sólo tienen una lesión renal no diabética (7).

3. MECANISMOS ASOCIADOS AL DAÑO RENAL.

3.1 GLUCOTOXICIDAD.

La glucosa por si misma puede causar efectos tóxicos directos en las células. Lorenzi demostró en cultivos de células endoteliales humanas expuestas a altas concentraciones de glucosa anomalías en la función celular (19). Los altos niveles de glucosa alteran el ciclo celular y la proliferación, incrementan la expresión y síntesis de colágena, fibronectina y laminina, que podrían explicar parcialmente el aumento en la producción de matriz extracelular observada en la nefropatía diabética (20).

Las células mesangiales expuestas a concentraciones de glucosa sintetizan menos heparan sulfato (21) y esto podría teóricamente contribuir en la reducción de cargas electronegativas en las membranas basales, que normalmente restringen el flujo transcápilar a la circulación de la albúmina; esto podría favorecer la progresión a proteinuria. En las células mesangiales los altos niveles de glucosa inducen la transcripción y producción de TGF- β que es la única citosina que estimula la síntesis de matriz e inhibe su degradación (22).

La hiperglucemia puede dañar a los tejidos promoviendo cambios agudos o reversibles en el metabolismo celular, o alteraciones irreversibles en macromoléculas estables como los matriz extracelular y ácidos nucleicos.

En modelos experimentales, los cambios irreversibles ocasionados por la hiperglucemia incluyen; defectos en la unión a la matriz del inhibidor de heparan sulfato (23), rompimiento de la estructura tridimensional de las membranas basales y la colágena (24), e incremento en la tasa de mutación (25).

En humanos, existe evidencia convincente que indica que el riesgo a desarrollar nefropatía está relacionado con el grado de hiperglucemia. Sin embargo, la hiperglucemia es necesaria pero no suficiente para explicar la enfermedad renal diabética, ya que muchos pacientes escapan de la nefropatía, aun sin control glucémico.

La hiperglucemia puede causar daño renal mediante la glucosilación no enzimática de las proteínas, también llamada por su unión a proteínas productos finales de glucosilación avanzada (PFGA). La hiperglucemia crónica puede activar la vía del poliol y afectar directamente a las células y su crecimiento celular.

3.2 PRODUCTOS FINALES DE LA GLUCOSILACIÓN AVANZADA (PFGA).

Los productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA) son el resultado de una serie secuencial de reacciones bioquímicas que involucran la glucosilación no enzimática de las proteínas y lípidos. Los productos intermediarios y tardíos de esta cascada de eventos pueden describirse como una clase de aductos de aminoácidos-azúcar que se forman de la progresiva deshidratación, condensación, oxidación y reacciones cíclicas que son llamadas colectivamente productos finales de la glucosilación avanzada (26, 27,28).

Algunos de estos productos han sido identificados químicamente mediante la exposición de ciertas proteínas a glucosa e incluyen la carboximetil-lisina y la pentosidina. Un resumen de las propiedades químicas de los PFGA se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Propiedades químicas de los PFGA

- *PFGA se forman en lípidos y ácidos nucleicos
- *PFGA son modificaciones irreversibles
- *PFGA su formación en proteínas confiere gran resistencia a la digestión proteolítica
- *PFGA son sustancias altamente reactivas que causan:
 - a) uniones entre los polipéptidos de algunas proteínas, Ej; colágena
 - b) atrapando proteínas no glucosiladas, Ej; LDL e inmunoglobulinas
- *PFGA induce oxidación de los lípidos
- *PFGA es químicamente inactivada por óxido nítrico

Datos mostrados de la inhibición de PFGA con aminoguanidina *in vivo* e *in vitro*

Aunque la formación de estos productos ocurre como un proceso de generación normal; este se encuentra marcadamente acelerado durante la diabetes, a consecuencia del incremento en el sustrato, por ejemplo, glucosa y el predominante stress oxidante en esta enfermedad (29). La patogenicidad de los PFGA se ha relacionado con su habilidad para acumularse en los tejidos, con la formación de uniones y la generación de radicales libres derivados de oxígeno.

Se han propuesto tres principales mecanismos para explicar como la glucosilación no enzimática de las proteínas puede contribuir en la patogénesis de las complicaciones causadas por diabetes.

- 1) PFGA pueden alterar la estructura y función de las proteínas de matriz extracelular.
- 2) La glucosilación puede afectar directamente la función de las enzimas y otras proteínas.
- 3) PFGA puede afectar la actividad de señales como: citocinas, factores de crecimiento y radicales libres, por la interacción con los receptores-PFGA en varios tejidos (Fig.1).

Estudios recientes han mostrado que los PFGA se unen a receptores específicos de PFGA identificados en macrófagos, células endoteliales, células mesangiales (30) induciendo la síntesis y secreción de citocinas, incluyendo la interleucina 1 (IL-1) y el factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1)(31,32).

Este efecto puede estimular la proliferación de células mesangiales y también la síntesis glomerular de colágena tipo IV (33). Por otra parte, la glucosilación avanzada parece reducir la actividad mitógena del factor básico de crecimiento fibroblástico (b-FGF) en células endoteliales en cultivo (34).

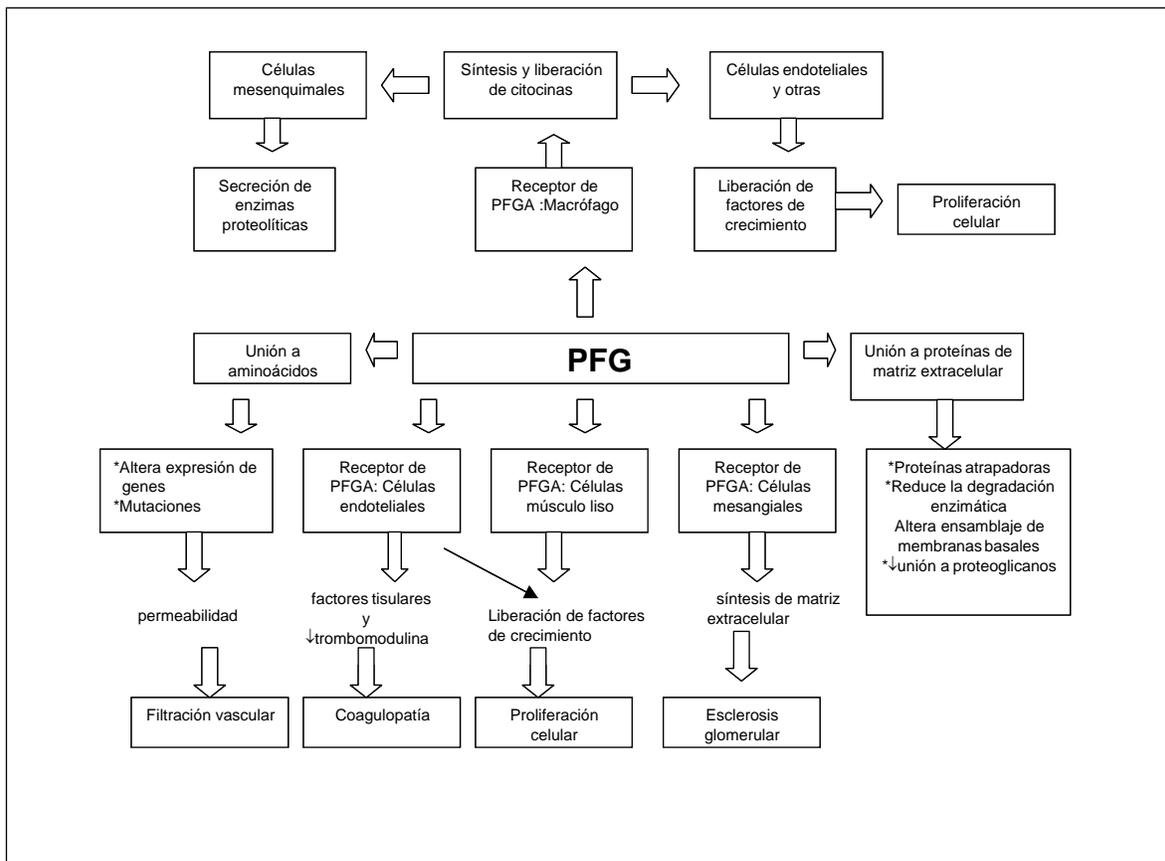


Fig 1. Representación esquemática del posible mecanismo mediante el cual los receptores PFGA pueden contribuir en la patogénesis de la nefropatía diabética.

PFGA puede inducir uniones excesivas de moléculas de colágena, afectando el ensamblaje y la arquitectura de las membranas basales glomerulares y la matriz mesangial, y puede, además, activar a las células mesangiales vía factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), promoviendo el aumento de matriz extracelular (35).

Todos estos procesos pueden contribuir en el depósito de proteínas de matriz extracelular en el mesangio, e interferir en la depuración de macromoléculas y alterar la función de los macrófagos, por lo tanto contribuir en la expansión mesangial y la oclusión glomerular. También se ha demostrado que los PFGA inactivan al óxido nítrico (NO), de manera dosis dependiente (Cuadro 3) (36).

Cuadro 3. Efectos de los PFGA a nivel celular y tisular.

Peróxidación de los lípidos	
Disfunción endotelial	
↑Producción de especies reactivas de oxígeno	} ↑peróxidación de lípidos
↓Función de la superóxido dismutasa	
↓Óxido nítrico	
↑Endotelina-1	} ↑vasoconstricción
Estimulación actividad celular inapropiada	
↑VCAM-1	} ↑remodelación de tejidos y engrosamiento de la membrana basal endotelial
↑Secreción de citocinas IL-1, TNF-β, IGF-1A	
↑Mitogénesis	
↑Quimiotaxis de células mononucleares	
↑Estimulación de células T y producción de Interferon-γ	
Cambios estructurales	
↑Rompimiento del orden molecular y cambios en la carga de superficie; Ej. causa cambios conformacionales en:	
a) El lente del cristalino ↑ la opacidad y ceguera	
b) Cambios prematuros en la colágena	
↑Unión irreversible entre las proteínas	
↑Cambios en la membrana celular y matriz de los riñones diabéticos: principalmente secreción de matriz mesangial, permeabilidad vascular y glomeruloesclerosis	
↑Interferencia de interacciones matriz-célula que afectan la adhesión	
Trombosis y fibrinólisis	
↑Factor tisular	
↓Trombulina	
↑Agregación plaquetaria y la estabilización de fibrina, posiblemente mediada por efectos de PFGA sobre PG-I ₂ (prostaciclina anti-trombotica), con ↓ de los efectos de PFGA sobre PAI-1 proteasa de serina (inhibidor de la fibrinólisis).	
↓Sobrevivencia de plaquetas	
↑Adelgazamiento de plaquetas seguido de la glucosilación de las glucoproteínas de receptores IIB y IIIA plaquetarios.	
↓Reduciendo la sensibilidad de fibrina/fibrinógeno hacia plasmina seguido de la glucosilación	
↓Reduciendo la actividad de trombina catalizada por heparina seguido de la glucosilación de anti-trombina III.	

Además de estar relacionados con la enfermedad microvascular diabética, los PFGA están implicados en diversas patologías; estudios histopatológicos han mostrado acumulación de estos productos en una variedad de tejidos que incluyen ateroma coronario, corteza renal, mesangio y membrana basal glomerular (37), así como en las placas amiloides del Alzheimer's, en el cartílago de la artritis reumatoide (38), músculo cardíaco, pulmón e hígado (39).

En modelos animales de diabetes inducida con STZ se ha mostrado que los PFGA incrementan su concentración pocas semanas después de que los animales son diabéticos, este incremento sistémico ocurren en riñón, piel y tejido vascular (40).

Algunos métodos para reducir la formación de los PFGA se centran alrededor de terapias con drogas, otras modalidades de tratamiento incluyen intervenciones terapéuticas. Otras estrategias incluyen la inhibición de receptores de PFGA usando anticuerpos neutralizantes o supresores de señales post-receptor, usando antioxidantes; el agente más investigado es la aminoguanidina (41).

La aminoguanidina, un derivado de la hidracina que une irreversiblemente productos de glucosilación tempranos, previene la formación de los PFGA y la unión de los PFGA a proteínas. En animales diabéticos, la aminoguanidina puede prevenir la albuminuria, expansión mesangial y engrosamiento de la membrana basal glomerular (42,43).

3.3 LA VIA DEL POLIOL.

La vía del polioliol está compuesta por una familia de enzimas aldoceto-reductasas, que utilizan como sustratos una variedad de sustratos derivados de azúcar y son reducidos por la nicotin adenin dinucleotido fosfato (NADPH) a sus respectivos alcoholes azucarados (polioles); por ejemplo, la glucosa es convertida a sorbitol, y la galactosa a galactitol.

El primer paso de la vía del polioliol es dirigido por la aldosa reductasa, que se encuentra en tejidos como nervios, retina, glomérulo, y paredes de los vasos sanguíneos; en estos tejidos insulino-independientes, las concentraciones intracelulares de glucosa se elevan en forma paralela a la hiperglucemia (44).

Como la k_m de la aldosa reductasa es mucho más grande que la de la glucosa y otros sustratos encontrados dentro de las células, la vía permanece relativamente inactiva. Sin embargo, el flujo de la vía se incrementa como respuesta a la hiperglucemia, incrementando los niveles intracelulares de glucosa y sustratos derivados de glucosa como el metil-glioxal y su producto reducido, el acetol. En muchos tejidos, el sorbitol producido por la glucosa es subsecuentemente oxidado a fructosa por una deshidrogenasa específica, usando NAD como cofactor (45).

La hiperglucemia crónica puede conducir a la acumulación de sorbitol en una gran variedad de tejidos, incluidos los túbulos renales y el glomérulo; el sorbitol no difunde fácilmente a través de las membranas celulares y puede acumularse fácilmente en ciertas células causando daño osmótico e hinchazón, un ejemplo es el cristalino durante el desarrollo de catarata diabética (46).

La declinación de NADPH celular causa un incremento en el flujo de la aldosa reductasa, disminuyendo la generación de óxido nítrico en las células endoteliales y alterar el balance celular redox.

Se ha sugerido que el estado redox alterado de los nucleótidos de piridina, por ejemplo, el incremento en la tasa intracelular de NADH/NAD⁺ tiene como resultado la oxidación de sorbitol por NAD.

El incremento en la tasa de NADH/NAD⁺ podría elevar los niveles intracelulares de azúcares altamente reactivos por inhibición de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y acelerar la reducción de fosfato dihidroxiacetona a α - glicerol-3-fosfato, el precursor de diacilglicerol que estimula a la proteína cinasa C (PKC). Aunque otra posibilidad basada en datos animales sugiere que el incremento en la actividad de la vía del poliol tiene como resultado la disminución de mio-inositol intracelular (46)

La disminución de fosfoinositides puede tener como resultado la reducción de la hidrólisis de fosfatidil-inositol bifosfato y un decremento en la formación de diacilglicerol. El diacilglicerol es el mayor mediador celular endógeno de la activación de PKC, por lo que ha sido implicado en la patogénesis de la enfermedad renal diabética (44,46).

Algunos efectos benéficos en la inhibición de la aldosa reductasa han sido reportados en animales diabéticos. El incremento en la tasa de filtración glomerular (TFG) y proteinuria en ratas con diabetes inducida con STZ puede ser reducida por inhibidores de la aldosa reductasa como el sorbinil, o bien por la suplementación de mio-inositol (47).

En ratas diabéticas de la cepa Sprague Dawley, varios inhibidores de aldosa reductasa fueron capaces de normalizar la incrementada TFG y de reducir la permeabilidad vascular a albúmina y su penetración en las paredes de los vasos (48), sugiriendo que los cambios renales funcionales tempranos y vasculares están relacionados con la aldosa reductasa. Sin embargo, el sorbinil puede tener efectos vasoconstrictivos y disminuir la síntesis renal de prostaglandinas (49), y podría modificar la hemodinamia renal independientemente de la vía del poliol.

3.3.1 Mioinositol y ATPasa Na⁺ - K⁺.

El mioinositol es un precursor de los fosfoinositidos como el fosfatidil-inositol, es estructuralmente similar a la glucosa y esta presente en tejidos de plantas y animales. Algunos estudios en animales diabéticos han demostrado la disminución en los niveles de mioinositol en tejidos insulino-independientes en los cuales la vía del poliol opera (nervios, retina, glomérulo). El mioinositol celular total no está disminuido; algunos investigadores han sugerido que la disminución de mioinositol está restringido a discretos pools intracelulares, se ha propuesto que estos pools están involucrados específicamente en un componente de la síntesis de fosfatidilinositol que modula la actividad de la ATPasa Na⁺ - K⁺ (50).

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la disminución del mioinositol en la diabetes. Una propone que la glucosa compite con el mioinositol en las células, y que su transporte está comprometido por la hiperglucemia. Otra, sugerida de las observaciones realizadas con inhibidores de aldosa demuestran que se pueden bloquear la disminución de mioinositol en los tejidos, ya que la acumulación de sorbitol de alguna manera es mucho más baja que los niveles de mioinositol. Finalmente, las elevadas concentraciones de Na⁺ intracelular en el tejido nervioso pueden reducir la disponibilidad de mioinositol (50).

3.3.2 Sistema PKC.

PKC, es una familia de 12 isoenzimas ampliamente distribuidas, las cinasas de serina y treonina tienen sustratos específicos en varios tipos celulares. PKC es translocada del citosol a la membrana plasmática siguiendo el estímulo apropiado, y de ese modo es activada (51). PKC está involucrada en diversas funciones celulares como: señales de transducción, respuestas celulares a hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, prostaglandinas y ciertas drogas (52); modula la tasa de crecimiento, síntesis de DNA y el recambio de receptores para hormonas y factores de crecimiento, incrementa la actividad antiporte sodio-hidrogeno, y la contractilidad de músculo liso (52).

Las actividades celulares de PKC son reguladas por niveles de diacilglicerol e inositol fosfato. En animales diabéticos, la síntesis de *novo* de diacilglicerol es debida al incremento en la formación de precursores derivados de glucosa (53, 54,55).

Las implicaciones precisas de esta anomalía son desconocidas, pero el incremento en la actividad de PKC altera algunas funciones celulares relevantes para el desarrollo de las complicaciones microvasculares diabéticas (55).

Algunos de estos efectos incluyen la estimulación de la neovascularización, alteración en la síntesis de colágena, fibronectina y laminina.

El efecto de las altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de fibronectina y colágena tipo IV pueden ser prevenidos por inhibidores de PKC como la estaurosporina o calpostina (56,57), el tratamiento con agonistas de PKC estimula la expresión de colágena tipo IV (57) y la acumulación de fibronectina (58), sugiriendo que los efectos de las altas concentraciones de glucosa sobre la producción de proteínas de matriz extracelular son mediados por la actividad de PKC.

Además, la activación de PKC incrementa la expresión de TFG- β , que es uno de los más importantes factores de crecimiento implicados en la regulación de la acumulación de matriz extracelular en la nefropatía diabética.

3.4 FUNCIÓN ENDOTELIAL ANORMAL.

Las células endoteliales, forman una monocapa que recubre la superficie de todos los vasos sanguíneos por lo que son particularmente susceptibles a daños físicos y químicos. Estas células son metabólicamente activas, con un amplio rango de funciones que incluyen el transporte de moléculas plasmáticas y el control del tono vascular. En particular, seleccionan e inactivan hormonas, convierten precursores inactivos, como la angiotensina I, en productos activos y sintetizan mediadores vasoactivos que actúan sobre el músculo liso, óxido nítrico y endotelinas (59).

Algunas anomalías endoteliales han sido descritas durante la diabetes, incluyendo el aumento de la proliferación celular, denudación endotelial, alteración en la forma celular en áreas de ateroma (60). Niveles circulantes del factor de Von Willebrand (61) trombomodulina (62), proteínas que son sintetizadas por células endoteliales y liberadas como reflejo del daño endotelial, se incrementan en pacientes diabéticos con microalbuminuria (63).

La microalbuminuria puede ser el resultado generalizado del daño endotelial, consecuencia del incremento en el escape transcápilar de albúmina (64).

Las posibles vías por las cuales la diabetes puede afectar la función endotelial incluyen la glucotoxicidad, el incremento en la vía del poliol, la actividad de PKC, aumento en la generación de radicales libres derivados de oxígeno y la formación de PFGA.

Se ha sugerido que la nefropatía diabética es una manifestación específica y generalizada de la disfunción endotelial (65) y la glomeruloesclerosis resultado de la alterada interacción entre el endotelio glomerular y el mesangio.

Además, la disfunción endotelial puede proveer una explicación de la asociación entre la elevada tasa de excreción de albúmina urinaria y la enfermedad vascular arteriosclerótica en la diabetes.

Anormalidades en diversos factores homeostáticos, han sido reportados en pacientes con microalbuminuria favoreciendo la hipercoagulabilidad, dentro de ellos se ha reportado al fibrinógeno, al inhibidor 1 activado por plasminogeno (PAI-1) y la lipoproteína A (66,67).

3.5 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).

Estudios *in vivo e in vitro* han demostrado que diferentes factores de crecimiento son regulados corriente arriba en la nefropatía diabética y las vías de señalización que activan y regulan factores de transcripción contribuyen en la acumulación de matriz extracelular (MET).

Las altas concentraciones de glucosa (68), los productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA) (69,70), la angiotensina II (Ang II) (71) y TFG β -1 (72), inducen la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células renales que contribuyen al desarrollo y la progresión del daño renal. La generación de ERO en células mesangiales es bloqueada efectivamente por calpostina C, un inhibidor de la proteína cinasa C (PKC), o por disminución intracelular de PKC, en células preincubadas con PMA por 24hr (68), sugiriendo que las altas concentraciones de glucosa inducen la generación de ERO en células mesangiales, es dependiente de PKC en músculo liso y células endoteliales (73).

PKC juega un papel muy importante en la activación de la NADPH-oxidasa (73,74), la NADPH-oxidasa es el mecanismo más importante para la generación de ERO en células fagocíticas y no fagocíticas (75,76).

Nishikawa y colaboradores (77) demostraron que las altas concentraciones de glucosa generan aniones superóxido en células endoteliales de aorta de bovino a través del metabolismo mitocondrial. Para normalizar la sobreproducción de superóxido mitocondrial, inhibieron la activación de PKC, la formación de PFGA y la vía de la aldosa reductasa, sus resultados sugirieron que las ERO producidas por la mitocondria juegan un papel importante en las complicaciones vasculares diabéticas inducidas por glucosa.

Ha y colaboradores (78), demostraron que los antioxidantes inhiben la traslocación a la membrana de PKC δ y PKC ϵ en el glomérulo de ratas con diabetes inducida con STZ, ellos sugieren que las ERO activan a PKC en el riñón diabético.

Dunlop y colaboradores (79), demuestran la aumentada actividad de p38 MAPK en el glomérulo de ratas con diabetes inducida con STZ, mientras que, en los glomérulos controles, el H₂O₂ activa a p38 MAPK.

Wang y colaboradores (80) encontraron que las altas concentraciones de glucosa activan a la cinasa Janus, transductores de señales y activadores de transcripción (JAK/STAT) en células mesangiales.

Las ERO regulan la actividad de JAK/STAT en fibroblastos y células de carcinoma A-431(81), y activan factores de transcripción (82). Las altas concentraciones de glucosa y H₂O₂ activan a NF-κB (68) y la proteína 1 activada (AP-1) (83) en células mesangiales.

La activación de NF-κB es requerida para regular corriente arriba la expresión de la proteína quimiotáctica de monocito-1 en cultivos de células mesangiales (84). Los eventos inflamatorios iniciados por la infiltración de monocitos están involucrados en la patogénesis glomerular diabética (84) y lesiones tubulares (84,85).

AP-1 media la activación del promotor de TGF β-1 en células mesangiales (86) y TGF-β1 regula la remodelación del mesangio (87), la transición tubular mesenquimo/epitelial (TME) (88); así como genes que codifican para proteasas (89).

Yang y Lui (90) demostraron que TME es un proceso altamente regulado y que involucra 4 pasos: 1) pérdida de adhesión celular, 2) expresión y reorganización de α-actina, 3) rompimiento de la membrana basal tubular y 4) migración celular e invasión al intersticio.

TME puede ser inducida por TGF β-1 (91), PFGA (88) y Ang II (92).

3.6 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ACUMULACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que algunos factores de crecimiento afectan la acumulación de matriz extracelular (MET). Los principales factores y hormonas involucradas son la angiotensina II (Ang II), el factor de crecimiento tumoral β (TGF-β), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la hormona del crecimiento (GH) y factores de crecimiento similares a insulina (IGF) (93).

3.6.1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA).

La activación del sistema renal renina angiotensina, y su papel en la patogénesis de la ND, ha sido atribuido a varios estudios que demuestran que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y receptores-I antagonistas de angiotensina atenúan la ND (94, 95,96). Estudios *in vitro* muestran un incremento en la expresión de angiotensina en células mesangiales y tubulares en respuesta a glucosa (97,98). Esta respuesta esta mediada, al menos en parte, por la sintetasa del oxido nítrico (ROS) y la subsecuente activación de p58 MAPK en células tubulares (99).

La angiotensina II (Ang II), un octapéptido derivado del angiotensinogeno, además, estimula la generación de las ERO en células del músculo liso (100) y células mesangiales (101). La vía de señalización de las ERO activa a NF- κ β , el cual media adicionalmente la expresión del angiotensinogeno, así la generación de ERO puede ser parte de un feedback positivo (102).

El incremento de Ang II, además, genera hipertensión, un desorden que generalmente acompaña a la diabetes y acelera la progresión a ND (103). Varios cambios hemodinámicos intrarenales, incluyendo la hipertensión capilar glomerular, ocurren tempranamente durante en la diabetes experimental. Este y el subsecuente desarrollo de albuminuria y cambios glomerulares estructurales son atenuados por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (104), demostrando la importancia de los factores hemodinámicos en la patogénesis de la ND.

La hipertensión intraglomerular puede ocurrir en la diabetes aun en ausencia de hipertensión sistémica (105); sin embargo, la AngII esta asociada con efectos renales sistémicos y hemodinámicos y también con efectos directos no hemodinámicos sobre las células glomerulares, particularmente sobre las células mesangiales. La Ang II incrementa la acumulación de moléculas de matriz extracelular, principalmente vía la estimulación de la expresión de TFG- β (106, 107, 108,109).

3.6.2 FACTOR TRANSFORMANTE β (TFG- β).

Numerosos estudios indican que la hiperglucemia induce un incremento en la expresión de RNAm y los niveles de TFG- β , en diabetes humana y en modelos experimentales (109), así como en cultivos de células mesangiales (110). TFG- β parece estar involucrado en estadios tempranos y tardíos de la ND. En ratas con diabetes inducida con STZ, la expresión de TFG- β incrementa tempranamente; 24 horas después de iniciada la hiperglucemia (111).

Todas las isoformas del receptor de TFG- β , TFG- β 1, β 2 y β 3 y el receptor TFG- β tipo II se han reportado aumentados en modelos de diabetes experimental (112). El incremento en la producción renal de TFG- β en pacientes con diabetes y ND han sido reportados (109). Además, algunos estudios *in vitro* muestran que la expresión de TFG- β se incrementa en cultivos de células renales con elevadas cantidades de glucosa o con PFGA (113); aunque no está claro si TFG- β media la producción de diversas moléculas de matriz extracelular en células mesangiales, células epiteliales, células intersticiales renales y fibroblastos (113).

TFG- β , además, influye sobre las enzimas que degradan la matriz extracelular mediante la inhibición de la síntesis de colagenasas y estimula la producción del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) y el inhibidor activado por plaminogeno (PAI-1) (114,115). TFG- β puede, además, influir en los depósitos locales de matriz por regulación corriente arriba de diferentes receptores de moléculas de matriz extracelular (114).

3.6.2.1 OTROS FACTORES QUE REGULAN LA ACTIVIDAD DE TFG- β .

Trombospondina-1 (TSP-1). TSP-1 es una de las cinco isoformas de la trombospondina, es sintetizada y secretada por una variedad de células renales, incluidas las células mesangiales (116). La exposición a altas concentraciones de glucosa regula la expresión de TSP-1 en células mesangiales (116), e incrementa los niveles de glicoproteínas en el glomérulo de animales diabéticos (117) y en ND humana (118). TSP-1 interactúa con muchas otras proteínas de matriz, modula su nivel de síntesis y parece tener la habilidad de activar al latente TFG- β (119).

Decorina (DCN). La expresión de DCN, un proteoglicano pequeño, está incrementada en células mesangiales expuestas a altas concentraciones de glucosa (113) y en los glomérulos de pacientes con ND, sin embargo, la acumulación de la proteína solo ocurre en estadios tardíos de la enfermedad (120).

La decorina se une a la colágena tipo I (121) y a otras proteínas de matriz extracelular, incluyendo el TFG- β activado (121); y posiblemente forme un complejo ternario con colágenas fibrilares en estadios avanzados de ND; los complejos DCN-TFG- β son excretados en la orina en etapas tardías de DN (120).

3.6.3 FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF); es otra citosina proesclerótica que también a sido involucrada en los estadios tempranos y tardíos de la ND. Su expresión se incrementa durante la glomeruloesclerosis experimental (122). Los niveles elevados de CTGF en el glomérulo de ratones NOD están correlacionados con la duración de la diabetes (123).

La inducción de CTGF en células mesangiales por hiperglucemia puede ser en parte dependiente de TFG- β y PKC (123). Evidencias obtenidas de estudios *in vitro* en células renales, incluidas las células mesangiales, indican que CTGF es un mediador crucial para la expresión de proteínas de matriz extracelular y es estimulada por TFG- β .

CTGF interviene en la inducción de TFG- β , incrementando a la fibronectina (123), colágena tipo I (124) y el receptor de la fibronectina (integrina $\alpha 5\beta 1$) (125). Otras proteínas de matriz extracelular han sido reportadas en diferentes células renales, incluyen a la colágena tipo I, III, IV, tenascina y trombospondina -1 (126).

3.6.4 FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.

Los niveles de RNAm glomerular de la cadena del factor de crecimiento derivado de plaquetas-B (PDGF-B) están aumentados cinco veces en animales con diabetes experimental (127).

PDGF se ha reportado como mediador de las concentraciones altas de glucosa y la inducción dependiente de los PFGA sobre la colágena tipo III en de células mesangiales de rata. Sin embargo, este efecto parece aumentar a través de la producción de TFG- β (128). Los anticuerpos anti-PDGF solo atenúan la producción aumentada de colágena tipo IV en células mesangiales expuestas a PFGA, lo que sugiere que PDGF actúa como un factor intermediario (129).

3.6.5 HORMONAS DE CRECIMIENTO Y FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A INSULINA.

Clásicamente, la hormona del crecimiento (GH) secretada por la pituitaria induce la síntesis de factores de crecimiento similares a insulina (IGF) en varios tejidos a través de la activación de los receptores de hormonas del crecimiento (GHR). Dos líneas de evidencia implican a GH en la patogénesis glomerular en modelos de diabetes experimental. Una es el efecto renoprotector de los análogos de somatostatina y antagonistas de GHR (130).

La otra es la falla de los ratones tratados con STZ, transgénicos con la GH mutada, con un antagonista nativo de GH, o “Knock out” a genes de proteínas de unión a GHR; desarrollan lesiones glomerulares (131).

IGF-I puede ser expresada en el riñón independientemente de GH. Cultivos de células mesangiales con albúmina glucosilada incrementan la producción de IGF-I (132), el factor de crecimiento estimula directamente la síntesis de laminina, fibronectina, proteoglicanos y colágena tipo IV en estas células (132). Las células mesangiales del ratón NOD secretan una gran cantidad de IGF-I, y esto probablemente contribuya al incremento en la acumulación de moléculas de matriz extracelular, en gran parte, aunque IGF-I medie la reducción en la actividad de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2).

3.7 MATRIZ EXTRACELULAR.

El material que se encuentra fuera de las células, entre los límites epiteliales y endotelial de los animales multicelulares, se conoce como matriz extracelular.

La matriz extracelular (MET) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares. Sin embargo, este material estructural está lejos de ser una sustancia de soporte inerte como se pensaba en el pasado y, por el contrario, ahora se sabe que la matriz desempeña un papel activo y complejo en la regulación de los procesos básicos de las células que tienen contacto con ella. Así, por ejemplo, la MET ejerce una función moduladora del crecimiento, migración, proliferación y diferenciación celular; así como la muerte celular programada (apoptosis) entre otras. Muchas de estas actividades son reguladas por un conjunto de señales que se registran directamente a través de receptores a las moléculas de matriz tales como las integrinas (133).

Hallazgos recientes demuestran que la MET sirve, además, como un sitio de almacenamiento para factores de crecimiento polipéptidicos. Dos categorías de factores de crecimiento se almacenan en la MET: factores que se asocian con el heparán-sulfato extracelular, tales como la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos y factores que se unen a las proteínas de la MET, entre los que destacan el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de crecimiento transformante beta (TNF α y TNF β 1).

La MET está constituida por una gran variedad de moléculas, las cuales interactúan entre sí, generando una estructura tridimensional a la cual las moléculas se adhieren ya sea por receptores específicos o ligandos.

Las macromoléculas que constituyen la MET incluyen, entre otras, a la familia de las colágenas, que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que les confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como la laminina y la fibronectina y los proteoglicanos que son esenciales en la adhesividad (133).

COLÁGENAS.

Las proteínas colágenas son el constituyente principal de las matrices extracelulares. Su nombre proviene del griego *cola*, que significa pegamento, y *genos*, nacimiento.

Las colágenas son una clase heterogénea de moléculas que forman parte de una superfamilia de genes altamente relacionados. Históricamente se definen como proteínas estructurales de la matriz, cuya secuencia se caracteriza por una unidad de tres aminoácidos Gly, X y Y, donde X y Y corresponden usualmente a prolina e hidroxiprolina respectivamente. Sin embargo, este motivo se ha identificado en ciertos dominios de otras proteínas, incluidos la subunidad C1q del complemento, las colectinas y ciertos receptores de macrófagos.

A la fecha, se han descrito en vertebrados 18 tipos genéticos de colágenas, todos los cuales tienen en común uno o más dominios con una estructura de triple hélice (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tipos de colágena.

TIPO	FORMA	COMPOSICIÓN	DISTRIBUCIÓN
I	Fibrilar	$[\alpha 1(I)]_2, [\alpha 2(I)], [\alpha 1(I)]_3$	Piel, hueso, tendón, ligamentos, córnea, dentina.
II	Fibrilar	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago, humor vítreo, notocorda.
III	Fibrilar	$[\alpha 1(III)]_3$	Acompaña a tipo I en fibrillas heterotípicas: vasos sanguíneos, piel, órganos internos.
IV	Reticular	$[\alpha 1(IV)]_2, [\alpha 2(IV)], \alpha 3(IV), \alpha 4(IV), \alpha 5(IV)$.	Membranas basales Membranas basales de glomérulo
V	Fibrilar	$[\alpha 1(V)]_3, [\alpha 1(V)]_2, [\alpha 2(V)], \alpha 1(V), \alpha 2(V) \alpha 3(V)$.	Acompaña a tipo I en fibrillas heterotípicas: fibrillas delgadas.
VI	Filamentosa	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$.	Filamentos en rosario de matrices del estroma que interactúan con fibrillas y células.
VII	Cadena larga	$[\alpha 1(VII)]_3$	Filamentos de anclaje que se unen a membranas basales epiteliales.
VIII	Cadena corta	$[\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII)] \text{ ¿?}$	Matrices subendoteliales, cutícula de gusanos, exoesqueleto de esponjas.
IX	Asociada a fibras	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$.	Superficie de fibras de colágena tipo II en cartílago hialino, humor vítreo.
X	Cadena corta	$[\alpha 1(X)]_3$	Cartílago hipertrófico.
XI	Fibrilar	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$.	Acompaña a la tipo II en fibras heterotípicas.
XII	Asociadas a fibras	$[\alpha 1(XII)]_3$	Tendón y piel embrionarios acompaña a algunas matrices que contienen tipo I.
XIII		$[\alpha 1(XIII)] \text{ ¿?}$	Células endoteliales
XIV	Asociadas a fibras	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Piel fetal y tendón.
XV		$[\alpha 1(XV)] \text{ ¿?}$	

En las colágenas intersticiales, más e 95% de su estructura es de triple hélice, mientras que en otras es sólo una fracción de su masa molecular. La triple hélice consiste en tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tienen la forma de una hélice que gira a mano izquierda con alrededor de 3.3 residuos de aminoácidos por cada vuelta. Estas tres cadenas helicoidales están, además, enrolladas con un giro a mano derecha, sobreponiéndose una encima de la otra, para producir una estructura de triple hélice (133).

Las fibras colágenas de un mismo organismo están hechas de distintos tipos de moléculas de colágena y algunos tipos genéticos de esta proteína ni siquiera forman fibras. A los diferentes tipos de colágena se les asigna un número romano que generalmente refleja el orden cronológico en el que fueron descubiertas. Sus cadenas polipeptídicas individuales se llaman cadenas alfa y están numeradas con números arábigos para cada tipo genético de colágena (cuadro 4).

FIBRONECTINA.

La fibronectina constituye una familia de glucoproteínas multifuncionales, que se pueden encontrar tanto en forma insoluble, formando parte de la MET, como en forma soluble circulando en el plasma. Las moléculas de fibronectina están constituidas por dos subunidades polipeptídicas de 230 y 250 kDa, respectivamente, que se encuentran ligadas por uniones disulfuro (133).

Los más de 20 miembros que constituyen esta familia derivan de un gen estructural único que presenta procesamiento alternativo del RNA y posteriormente diferentes modificaciones postraduccionales, que pueden incluir glucosilación, fosforilación y sulfatación. El procesamiento alternativo ocurre en tres sitios del transcrito primario y da origen a los múltiples polipéptidos que forman la familia de la fibronectina (133).

La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva y es altamente repetitiva, con tres unidades básicas, denominadas homologías tipo I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína (133).

Existen 12 homologías tipo I, de aproximadamente 45 residuos de extensión, las cuales están involucradas en la actividad de unión a fibrina. En esta área se localiza, además, un sitio de unión de baja afinidad para heparina. Intercaladas en el agrupamiento amino-terminal de las homologías tipo I se encuentran dos homologías tipo II, las cuales son probablemente parte del sitio de unión a colágena. Esta actividad de unión está directamente dirigida contra la colágena tipo I desnaturalizada, aunque también es activa para otros tipos de colágenas.

Finalmente, entre dos agrupamientos de homologías tipo I, se interpone una larga región compuesta por 15 a 17 homologías tipo III. Esta región es responsable de varias actividades de unión, destacando entre ellas las interacciones con receptores de la superficie celular y una unión de alta afinidad con heparina. Por otro lado, esta región tipo III es responsable de todas las variaciones en la estructura primaria de pre-RNA_m en tres sitios conocidos como extradominio B, extradominio A, y el segmento de conexión tipo III (133).

La fibronectina desempeña un papel fisiológico importante no sólo en la formación de matriz extracelular, sino, además, en la adhesión y migración celular, en la opsonización y en la cicatrización de heridas, entre otras (133).

De manera relevante, la fibronectina extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y la organogénesis; por ejemplo durante la gastrulación, en la migración de las células de la cresta neural, la diferenciación de las células hematopoyéticas y el desarrollo cardíaco y pulmonar entre otras. Para tal efecto, las células interactúan con la fibronectina vía un receptor de membrana, el cual es una proteína dimérica que contiene subunidades de 140 y 120 kDa, respectivamente (133).

La fibronectina plasmática, que se encuentra en una concentración de 0.3 g/L, parece estar implicada en varias actividades biológicas tales como la organización del coágulo y el almacenamiento de varias partículas por el sistema reticuloendotelial. Esta última función de opsonización podría estar relacionada con la capacidad que tiene la fibronectina de unirse a fibrina, restos tisulares y bacterias, y de esta manera se encuentra implicada como parte de los mecanismos de defensa contra patógenos (133).

Finalmente, la fibronectina también parece desempeñar un papel en la reparación de los tejidos y la cicatrización de las heridas. En este sentido, se sabe que la fibronectina y la fibrina se concentran inmediatamente en las áreas lesionadas donde forman una matriz provisional que favorece el ensamblaje del tejido de granulación (133).

LAMININA.

La laminina tiene una estructura altamente conservada en diferentes especies como el hombre, ratón, sanguijuelas, *Drosophila* y estrellas de mar. Consiste de tres cadenas polipeptídicas: A (400 kDa), B1 (200kDa) y B2 (205kDa), unidas por enlaces disulfuro para formar una estructura en forma de cruz con terminaciones globulares. Este modelo que corresponde a la laminina de ratón, parece repetirse en las lamininas de otras especies. Cada una de las tres cadenas polipeptídicas se ha subdividido en dominios numerados del I al VI (133).

El brazo rígido contiene fundamentalmente los dominios I y II y tiene estructura de espiral enrollada (superhélice) que es un producto de tres cadenas. Está región es rica en helices α , en las cuales existen repeticiones de aminoácidos hidrofóbicos localizados en la primera y cuarta posición, favoreciendo la formación de estructuras de espiral enrollada. Los segmentos tipo bastón de los brazos cortos III y V, consisten en repeticiones de cisteína homólogos al factor de crecimiento epidérmico. Cada uno de estos contiene de 50-60 aminoácidos con ocho residuos de cisteína en posiciones altamente conservadas.

Las estructuras globulares que se observan con el microscopio electrónico corresponden a los dominios IV y VI. La terminación globular al final del brazo largo, que deriva únicamente de la región carboxilo de la cadena A, contiene cinco repetidos homólogos como la estructura de un pie y se le llama el dominio G (133).

Los dominios II y IV de la cadena A están subdivididos en subdominios a y b con base en su secuencia de aminoácidos. En la cadena B1 se forma un asa de 40 aminoácidos entre los dominios I y II referido como el dominio alfa. En la laminina de ratón los tres brazos cortos se derivan individualmente de las regiones amino-terminales de las cadenas A, B1 y B2.

La molécula de laminina esta extensamente glucosilada y aproximadamente 15 a 30% de su peso consiste en carbohidratos. Hay 46 sitios potenciales de glucosilación en la cadena A y 13 a 14 en las cadenas B1 y B2, aunque la glucosilación no es necesaria para el ensamblaje de las cadenas o su estabilidad (133).

Los cambios en la composición de subunidades de laminina puede influir no sólo en la interacción con los receptores celulares, sino también en la interacción con otras moléculas de matriz extracelular y, por lo tanto, en la arquitectura de la membrana basal.

La laminina tiene una variedad de actividades biológicas que incluyen la promoción del crecimiento, unión celular, polarización del epitelio renal durante el desarrollo, diferenciación de las células endoteliales en estructuras capilares, tiene, además, un efecto inductivo en la expresión de genes específicos como la beta-caseína en el epitelio mamario (133).

En las láminas basales la laminina se une a la triple hélice de la colágena tipo IV a través de varias regiones diferentes, por otra parte, un sitio de unión a heparán sulfato y la heparina se encuentran en el dominio globular de la cadena A y sitios débiles de unión en los brazos cortos. La laminina tiene una gran tendencia a formar complejos con la entactina (133).

TENACINAS.

Las tenacinas constituyen una familia de proteínas multiméricas de matriz extracelular conformadas por módulos estructurales repetidos que incluyen repeticiones de setena, de fibronectina tipo III , de un fragmento similar al factor de crecimiento epidérmico y de un dominio globular compartido con los fibrinógenos. A la fecha se han descrito tres miembros de esta familia: la tenacina-C, tenacina-R y tenacina-X (133).

PROTEOGLICANOS.

Los proteoglicanos representan un conjunto de proteínas cuyo rasgo estructural común es que todos ellos están conformados por una proteína central, generalmente rica en residuos de serina y treonina, a la cual se unen una o múltiples cadenas lineales de carbohidratos conocidos como glucosaminoglicanos. La heterogeneidad de este grupo de macromoléculas radica principalmente en la gran diversidad de las proteínas que forman su parte central, así como los tipos,

número y grado de sulfatación de las cadenas laterales de glucosaminoglicanos que se unen a ella (133).

Las cadenas de glucosaminoglicanos son lineales sin ramificaciones y generalmente forman una estructura dimérica repetida, por sus características estructurales los proteoglicanos son aniónicos. Están representados por: heparina, heparán-sulfato, condroitín-sulfato, dermatán-sulfato, keratán-sulfato y el ácido hialurónico; aunque también se conocen proteoglicanos grandes como el agregacán y el versicán. Estas moléculas poseen propiedades adhesivas y antiadhesivas (133).

ENTACTINA.

La entactina es una glucoproteína sulfatada que forma un complejo muy estable con la laminina. Al ser observada con el microscopio electrónico, muestra una estructura asimétrica característica, con dos extremos globulares de una masa estimada de 38 a 85 kDa separados por un tronco de 17 nm. La entactina contiene 5 a 13% de carbohidratos en la forma de *N*- y *O*-oligosácaridos y está *O*-sulfatada en residuos de tirosina, que se ha sugerido podrían estar involucrados en la interacción proteína-proteína (133).

El examen de las membranas basales con microscopía electrónica revela que están compuestas de una red tridimensional que consiste en filamentos de colágena tipo IV, a la cual se unen laminina, entactina y heparán-sulfato. La entactina forma un complejo no covalente fuertemente ligado a la laminina, además, la entactina se une con una afinidad menor a la fibronectina y la colágena tipo IV (133).

3.8 DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis e inflamación (133).

Las MMP se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y las metaloproteinasas “tipo membrana” (Cuadro 5).

Las colagenasas rompen la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y a la fecha se han clonado tres de sus miembros: MMP-1, MMP-8 y MMP-13 (133).

La subfamilia de las gelatinasas degradan colágena tipo IV, principal constituyente de las membranas basales, fibronectina y elastina, a la fecha se han caracterizado dos, la gelatinasa A y B (133).

La subfamilia de estromelisinias tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina y laminina. Se han clasificado la estromelisinina 1, 2, 3, matrilisina y la metaloelastasa (133).

Las recientemente descubiertas metaloproteinasas de membrana se caracterizan por la presencia de un dominio transmembranal que es una extensión rica en residuos hidrofóbicos (133).

Cuadro 5. Familia de las Metaloproteinasas.

<p>Colagenasas Colagenasa de fibroblastos (MMP-1) Colagenasa de polimorfonucleares (MMP-8) Colagenasa 3 (MMP-13)</p> <p>Gelatinasas Gelatinasa A (MMP-2) Gelatinasa B (MMP-9)</p> <p>Estromelisinias Estromelisinias 1 (MMP-3) Estromelisinias 2 (MMP-10) Estromelisinias 3 (MMP-11) Metaloelastasa (MMP-12) Matrilisina (MMP-7)</p> <p>Metaloproteinasas de membrana MT-MMP-1 MT-MMP-2 MT-MMP-3 MT-MMP-4 MT-MMP-5 MT-MMP-6</p>

La cantidad de MET depositada en el riñón depende del balance entre su síntesis y degradación.

Las ERO juegan un papel central en la disminución de la degradación de matriz extracelular, las altas concentraciones de glucosa y TGF β -1 inducen la inhibición dos grandes sistemas de proteasas involucrados en la degradación de matriz extracelular (134), el activador del plasminogeno (PA) y sus inhibidores (PAI-1) y el sistema de metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores tisulares (TIMP).

La activación del plasminogeno a plasmina es el evento clave de la fibrinólisis. La plasmina (PI) es una proteasa de serina involucrada en la disolución de coágulos sanguíneos (fibrinólisis intravascular, fig 2); mas aun, PI juega un papel clave en otras cascadas de activación, como la activación de las metaloproteinasas de matriz, las cuales están implicadas en la remodelación tisular, angiogénesis, embriogénesis, metástasis, así como la invasión celular de tumores y patógenos (proteolisis pericelular, fig 2) (135).

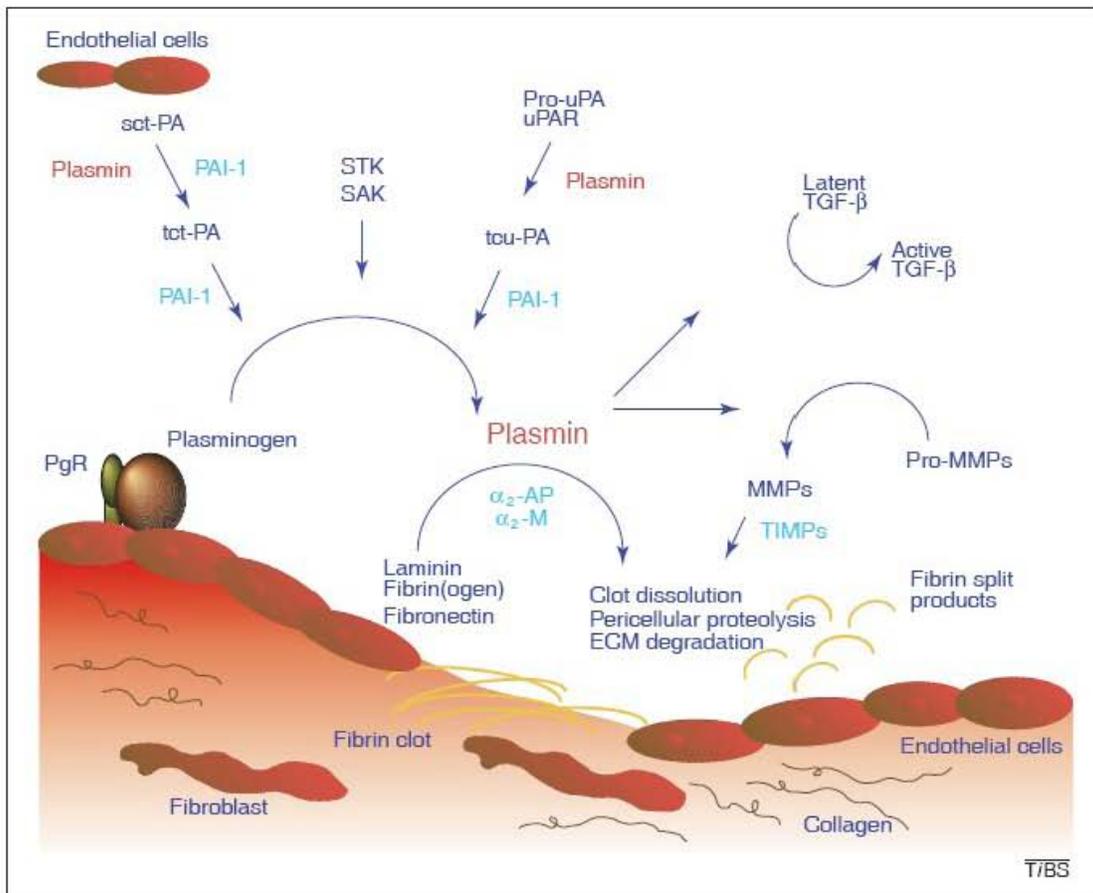
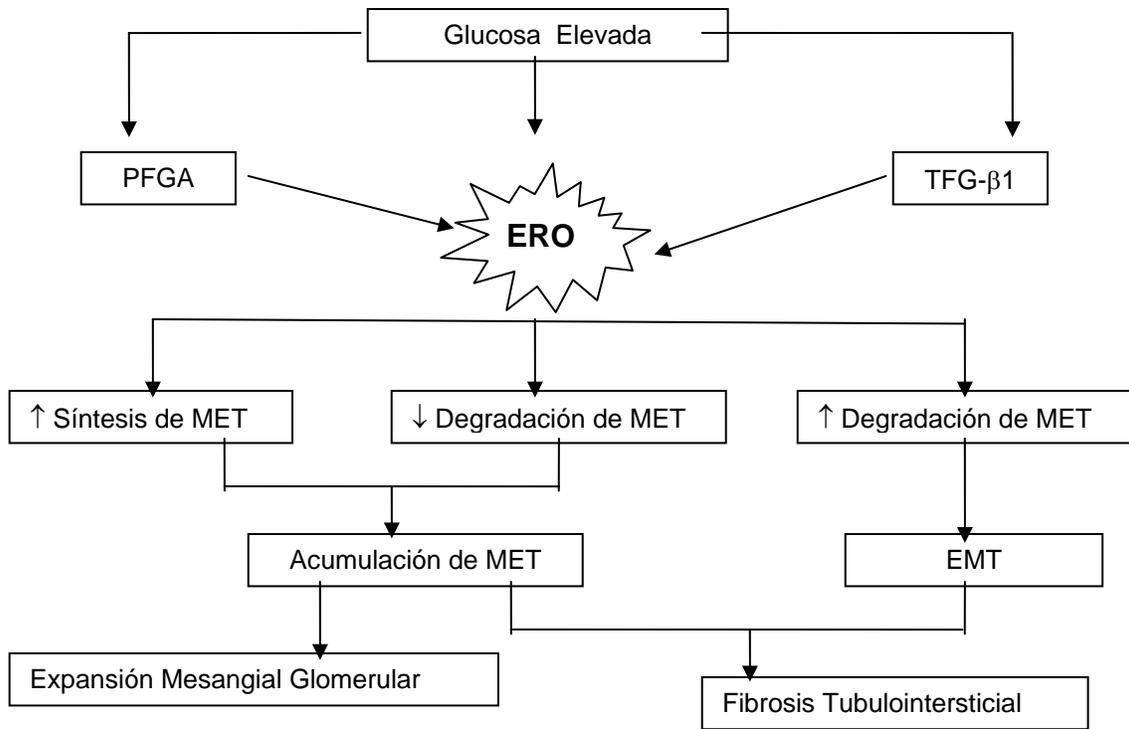


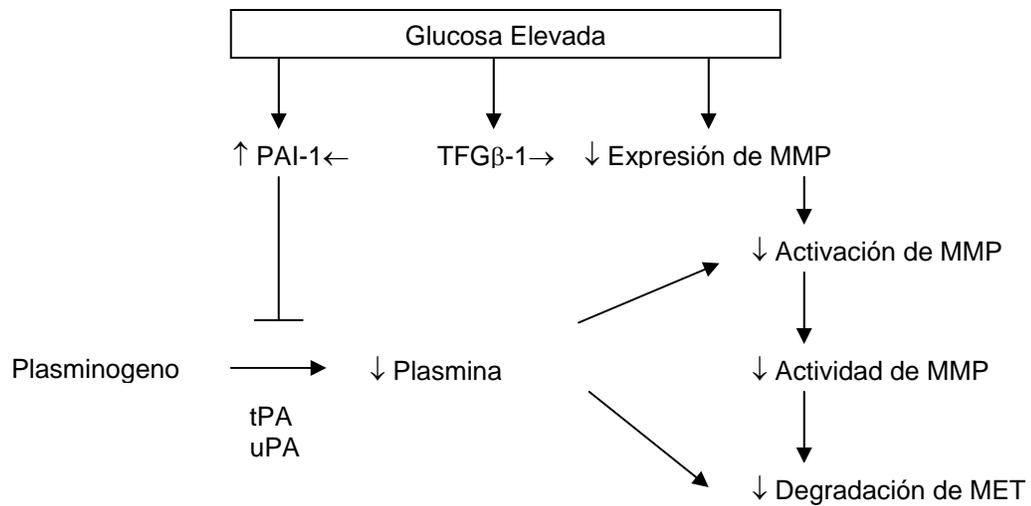
Fig 2. Activación del Plasminógeno. Abreviaciones. α_2 -AP = α_2 -antiplasmina, α_2 -M= α_2 -macroglobulina; ECM= matriz extracelular, PAI-1= inhibidor activado por plasminógeno tipo-1; PgR= receptor del plasminógeno; Pro-MMPs= pro-metaloproteinasas de matriz; Pro-uPA/tcuPA= activador de plasminógeno pro-urocinasa cadena sencilla/doble; SAK= estafilocinasa; sct-PA/tct-PA= activador plasminógeno tisular cadena sencilla /doble; STK= streptocinasa; TGF- β = factor de crecimiento transformante β ; TIMPs= inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; uPAR= receptor de urocinasa.

TFG β -1 incrementa la síntesis de PAI-1, PAI-1 inhibe en células mesangiales al activador tisular del plasminógeno (tPA), disminuyendo la síntesis de plasmina, con lo cual disminuye la degradación de la matriz extracelular (fig 3).

La plasmina no solo degrada algunas proteínas de matriz como la fibronectina, laminina, proteoglicanos y colágena tipo IV (136), sino que también activa a las pro-MMP (137,138).



a)



b)

Fig 3. a) ERO y la remodelación de matriz extracelular, b) Sistema de proteasas.

3.9 CAMBIOS MORFOLÓGICOS.

Desde las fases muy tempranas en la ND se pueden apreciar cambios en la apariencia microscópica del riñón. Estos riñones muestran un aumento de tamaño aun en ausencia de manifestaciones clínicas. Esta hipertrofia e hiperplasia conducen a un aumento en el volumen renal de 20 a 40%.

Las superficies de estos riñones permanecen lisas, aunque en casos de enfermedad terminal es común observar granularidad e irregularidad, típica de los riñones en fase terminal. Cuando existe un mal control metabólico de la DM, se pueden observar lesiones Arman-Elbstein que se detectan en las partes rectas de los túbulos (6).

En etapas tempranas de la ND las alteraciones estructurales en la matriz mesangial, la hipertrofia de elementos glomerulares, túbulo-epiteliales, el engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG) y de la membrana basal tubular (MBT) así como el aumento de matriz extracelular, primordialmente en el mesangio son las responsables de la expresión de funcional del daño de la ND, hecho que se correlaciona cuando se estudia a los riñones desde el punto de vista histomorfológico contra la expansión de la matriz extracelular con la disminución del área de filtración (6,9).

La expansión de la matriz mesangial es característica de la ND y se presenta poco tiempo antes del engrosamiento de la membrana basal. Su progresión se correlaciona con el desarrollo de la nefropatía. El mesangio aumenta de un 5% a más del 30% de su volumen, con la consecuente disminución del área de filtración. Este aumento es secundario a un exceso de componentes estructurales normales del mesangio, que incluye la colágena tipo IV, la V, la laminina y la fibronectina (6).

La fibrosis es un hallazgo común y la extensión de ésta se correlaciona con la progresiva disminución del filtrado glomerular. En la lesión, la colágena tipo III se ha detectado experimentalmente después de 6 a 9 meses de hiperglucemia persistente (6).

En la DM experimental, se ha demostrado un aumento del RNAm que codifica la cadena $\alpha 1$ de la colágena tipo IV, la laminina B-1 y B-2 y la colágena intersticial tipo I y III (6).

Los proteoglicanos son macromoléculas que constituyen la matriz extracelular compuesta de cadenas de glucosaminoglicanos unidas a proteínas. Estas mantienen la unidad e integridad de la membrana basal por su interacción con glucoproteínas tales como la laminina, la fibronectina y colágena tipo IV. Se ha propuesto que la cantidad y la calidad de alteraciones en su interacción con los demás constituyentes de la MBG determinan las alteraciones funcionales.

La hiperglucemia influye sobre factores de crecimiento renal, estimulando la biosíntesis de colágena y otras moléculas de matriz extracelular (6).

El engrosamiento de la MBG es una característica inespecífica pero constante de la enfermedad que se puede detectar después de 2 a 5 años de evolución de la DM. Dicho engrosamiento tiende a aumentar con el transcurso de la enfermedad y puede alcanzar una dimensión 10 veces superior a lo normal. El grado máximo de engrosamiento se observa ante presencia de lesiones nodulares. Los estudios de microscopia electrónica confirman que las lesiones nodulares y la esclerosis glomerular difusa representan un incremento de la matriz mesangial (6,9).

En fases tempranas las células epiteliales se observan bien conservadas, pero conforme transcurre el padecimiento presentan borramiento de podocitos, hallazgo típico de enfermedades renales que cursan con proteinuria. Además de esta fusión de podocitos, las células epiteliales pueden experimentar un proceso de degeneración y desprenderse de la MBG subyacente originando zonas desprovistas de revestimiento celular epitelial (9).

3.10 LESIONES PROVOCADAS POR LA ND.

Los tipos de lesión terminal en la ND son:

* Esclerosis intercapilar nodular. También conocida como nefropatía de Kimmelstiel- Wilson, la lesión característica es en el nódulo, que se describe como una estructura oval diferente en tamaño y cantidad. En un glomérulo se pueden encontrar 1 o varios nódulos y otros glomérulos presentarse libres de alteraciones. Estas lesiones se desarrollan en la periferia de los glomérulos, alejados del hilio. Su ubicación ultraestructural se sitúa a nivel del mesangio. Cuando se tiñen con la técnica de PAS son de aspecto homogéneo y adquieren un carácter más laminado a medida que aumentan de tamaño y que transcurre el tiempo (10).

Los capilares de los glomérulos afectados están dilatados e incluso presentan microaneurisma. El diámetro glomerular tiende a permanecer relativamente normal a pesar de la presencia de lesiones nodulares avanzadas.

Existen algunos patrones histológicos con los que debe hacerse diagnóstico diferencial: la forma lobular de la glomerulonefritis membrano-proliferativa tipo II, las lesiones secundarias a la paraproteinemia por cadenas ligeras tipo kappa de tipo nodular y las lesiones secundarias a amiloidosis que presentan patrón de tipo nodular difuso, que con apropiadas tinciones y microscopia electrónica pueden diferenciarse de las lesiones secundarias a diabetes (10).

* Esclerosis intercapilar difusa. Es más frecuente que la forma nodular. Se observa un patrón difuso que representa un rango de expansión en el área mesangial con grado mínimo o marcado, por lo que estas alteraciones per se pueden obturar la luz capilar.

Las lesiones difusa y nodular pueden presentar similar localización en el mesangio y la morfogénesis de ambas lesiones generalmente es considerada como dependiente de la excesiva acumulación de material de la matriz, el cuál únicamente difiere en lo que respecta a su distribución. Además, varias tinciones histológicas son similares para la lesión difusa y para la nodular y ambas expansiones son eosinófilas y positivas para PAS. Esta lesión puede confundirse con las lesiones observadas en el envejecimiento y la hipertensión arterial y otros padecimientos como la amiloidosis con lesión esclerótica difusa. El engrosamiento de la pared capilar puede semejar la lesión de la glomerulonefritis membranosa idiopática (10).

* Lesión capsular en gota. Esta lesión se detecta en el sitio parietal de la cápsula de Bowman y se localiza entre la MBG y las células epiteliales. Morfológicamente es una forma irregular de excrecencia de tamaño variable, que se tiñe intensamente, eosinófila con hematoxilina / eosina (10).

* Lesión con casquete de fibrina. Es algo más frecuente que la lesión de la cápsula en gota y patológicamente similar a ella en su aspecto general. Sin embargo, la lesión con casquete de fibrina tiene lugar en el interior de un capilar glomerular, en donde por lo general es relativamente regular en su contorno y se adopta a las paredes del capilar. Esta lesión dista de ser específica de la DM y ha sido observada en varias glomerulopatías como la glomerulonefritis local y segmentaria y la nefritis asociada con el lupus eritromatoso sistémico. Se ha detectado también en enfermedades vasculares renales, incluyendo la aterosclerosis y en enfermedades túbulo intersticiales crónicas (10).

* Lesión tubulointersticial. Los túbulos renales se atrofian y a menudo tienen engrosamiento de sus membranas basales, con diferentes grados de anormalidades intersticiales como células mononucleares y polimorfonucleares, además de los procesos de cicatrización del riñón diabético terminal. Esta infiltración de células inflamatorias se acompaña de un grado creciente de fibrosis intersticial que aumenta si existe enfermedad de vasos sanguíneos de mayor tamaño de manera concomitante (10).

La función renal y las anormalidades estructurales en animales con diabetes espontánea semeja en muchos aspectos a la nefropatía diabética en humanos; la expansión mesangial y el engrosamiento de la membrana basal glomerular, dos de los marcadores estructurales de la glomerulopatía diabética en humanos son las lesiones más frecuentes encontradas en animales experimentales (cuadro 6) (139,140).

Cuadro 6. Cambios estructurales y funcionales en ratas con diabetes inducida con STZ.

Alteraciones renales hemodinámicas	Cambios glomerulares estructurales	Cambios estructurales tubulares
Alteraciones glomerulares tempranas: Hiperfiltración Incremento en el flujo sanguíneo glomerular	Lesiones glomerulares tempranas: Hipertrofia glomerular	
Alteraciones glomerulares tardías: Incremento en la permeabilidad de la MBG Disminución en la filtración glomerular	Lesiones glomerulares tardías: Engrosamiento de la MBG Expansión de la matriz mesangial	Hipertrofia tubular Lesión Arman-Ebstein Engrosamiento de la MBG Fibrosis Tubulointerstitial

Además, de una forma nodular de expansión mesangial que se parece pero no es idéntica a la glomerulosclerosis nodular humana o la lesión Kimmelstiel-Wilson han sido observadas en algunos modelos animales. Otras anomalías, como las lesiones hialinas y hialinosis arteriolar, solo han sido notadas ocasionalmente en otros modelos (cuadro 7) (139).

Cuadro 7. Lesiones renales en roedores con diabetes espontánea.

TIPO DE LESIÓN	ER	EMD	LN	LH	HA	EMBG	GSF	OBSERVACIONES
Hipoinsulinemia								
Rata: BB	+	-	-	-	-	+	-	↑tasa de filtración glomerular y flujo sanguíneo renal. Albuminuria
Ratón: NOD	-	-	-	-	-	+	-	Proteinuria, depósitos de IgG e IgA en el mesangio.
Hamster chino	+	+	-	-	-	+	-	Depósitos de glucógeno en diversas áreas.
Hiperinsulinemia								
Ratas: Cohen	+	+	-	+	-	+	-	Proteinuria, atrofia tubular, dilatación cística.
Obesa SHR	+	+	-	-	-	+	-	Proteinuria, uremia, ↑celularidad, depósitos de colágena.
Wistar fatty	+	+	-	-	-	+	-	Albuminuria, ↓tasa de filtración glomerular, hipertrofia glomerular.
SRH/N-cp	+	+	+	-	+	-	+	Proteinuria, hipertrofia glomerular, ↑ de células mesangiales.
Ratón: ob/ob	-	+	-	-	-	-	-	Depósitos de material hialino en las paredes de los capilares.
db/db	+	+	-	+	-	+	-	↑ tasa de filtración glomerular, ↑ de células mesangiales, depósitos de colágena en el glomérulo y complejos inmunes en el mesangio.
KK	+	+	+	+	-	+	-	Proteinuria, γglobulina en capilares, mesangio y paredes capilares.
KKAy	-	-	-	-	-	+	-	Infrecuentes nódulos.
NZO	+	+	+	-	+	+	-	Depósitos en el mesangio, inflamación arteriolar.
Roedores desérticos								
Rata de arena	-	-	-	-	-	-	-	Vacuolación en túbulos.
Ratón espinoso	-	-	-	-	-	+	-	Depósitos de colágena en el mesangio y de glucógeno en células tubulares.
Tuco tuco	-	+	-	-	+	+	-	Engrosamiento hialino en arteriolas eferentes
Intolerancia a la glucosa								
Rata: BHE	+	-	-	-	-	-	-	Hiperplasia tubular y dilatación
Zucker	+	+	-	-	-	-	+	Albuminuria
Ratón: NON	-	-	-	-	-	+	-	Proteinuria, depósitos de material PAS-positivo en células endoteliales y capilares.

Abreviaciones: ER, ensanchamiento renal; EMD, expansión mesangial difusa; LN, lesiones nodulares; LH, lesiones hialinas; HA, hialinosis arteriolar; EMBG, engrosamiento de la membrana basal glomerular; GSF, glomerulosis segmental focal; + presente, - ausente.

4. ALTERACIONES EN EL RIÑÓN DE RATAS CON DIABETES INDUCIDA.

Estudios iniciales realizados por Hostetter y colaboradores, en ratas adultas Wistar-Munich inyectadas con una dosis i.v de 60mg/kg de STZ, fueron estudiadas por micropuntura glomerular de 2 a 15 semanas después de iniciada la diabetes. Estos estudios demuestran que la hiperglucemia moderada incrementa la tasa de filtración glomerular (TFG); las ratas que no recibieron insulina presentaron pérdida de peso y una marcada diuresis osmótica. La elevación en la TFG se reporto como un mediador del incremento en el flujo sanguíneo glomerular (Q_A) y una elevación en la presión capilar glomerular (P_{CG}).

Ellos encuentran que el volumen plasmático juega un papel muy importante en las alteraciones hemodinámicas glomerulares en ratas diabéticas; aunque, las medidas absolutas del volumen sanguíneo no fueron diferentes en los grupos de ratas estudiadas. La discrepancia hallada en los niveles de TFG en el grupo con hiperglucemia severa al compararlo con el grupo de hiperglucemia moderada puede ser considerado análogo a la situación clínica presentada en pacientes con diabetes severa, diabetes no controlada (cetoacidosis o coma hiperglucémico no cetónico). En otras palabras, la TFG esta elevada en la primera fase de la enfermedad en pacientes con diabetes tipo I con moderada hiperglucemia o tratados con insulina (141).

Warram y colaboradores, evidenciaron las relaciones existentes entre la hiperglucemia y la progresión de microalbuminuria a proteinuria en individuos con diabetes tipo 1 y microalbuminuria. A estos pacientes se les realizaron durante 4 años valoraciones repetidas en la excreción de albúmina urinaria. Encontraron que la tasa de incidencia de progresión de microalbuminuria a proteinuria fue de 4.1/100 personas cada año. Concluyendo que los pacientes con microalbuminuria tienen riesgo de progresión a proteinuria que puede ser mejorada con un control en los niveles de glucosa, sólo si la HBA_{1c} se mantiene por debajo de 8.5% (142).

El incremento en los metabolitos de oxido nítrico en la orina de ratas diabéticas ha sido descrito (143) La inhibición de oxido nítrico intrarenal con análogos de L-arginina incrementa la resistencia arteriolar y disminuye el coeficiente hidráulico de ultrafiltración capilar glomerular (144).

Sin embargo el factor más estudiado para entender las alteraciones renales hemodinámicas en ratas con diabetes inducida con STZ es la angiotensina II (All). Un estudio demostró que las enzimas convertidoras de Angitensina (ACE) aumenta en las células endoteliales glomerulares de ratas diabéticas (145), sugiriendo un incremento local en la producción de All.

Los datos obtenidos a partir de los niveles de expresión de los genes de renina angiotensina en el riñón de ratas con diabetes experimental son divergentes. En primera instancia, Correa-Rotter y colaboradores, encontraron que los niveles de expresión de la proteína renal renina y el RNAm no son diferentes entre ratas

diabéticas y ratas normales; aunque, el angiotensinogeno renal y del hígado y los niveles de RNAm fueron bajos en el grupo diabético (146).

Kalinyak y colaboradores, confirman que no hay diferencias significativas en los niveles de RNAm y renina renal detectados en ratas 2 semanas después de la inducción de diabetes comparados con los grupos controles, encontrando solo diferencias en los niveles del transcrito del angiotensinogeno renal (147).

Jaffa y colaboradores, reportaron una disminución del 50% en los niveles renales del RNAm de renina 3 semanas después en ratas con diabetes inducida comparadas con las controles (148). En contraste, Anderson y colaboradores, encontraron un pequeño incremento en el contenido renal de renina y la expresión del angiotensinogeno 6 a 8 semanas después de la inducción de la diabetes en ratas. Este grupo solo reporto sensibilidad a la administración intrarenal de All (145).

Algunos investigadores han evaluado el sistema renina angiotensina (SRA) en otros modelos animales de diabetes mellitus. Una respuesta básica fue reportada en ratas adultas BB con diabetes espontánea, con un incremento inicial en renina y el contenido de RNAm a los 2 meses de la inducción de diabetes y su disminución subsecuente después de 12 meses (149). En ratas obesas Zucker, un modelo de diabetes no dependiente de insulina (tipo II), la actividad de renina plasmática disminuye a las 10-24 semanas comparadas con las controles.

A nivel ultraestructural, es evidente una marcada reducción en el contenido de heparan sulfato polianiónico (HSPG) que puede causar un defecto en la carga-selectividad (150). En el ratón Kkay con diabetes espontánea los niveles de RNAm del HSPG no están alterados en la corteza renal (151), al aislar los glomérulos de ratas con diabetes inducida con STZ los niveles de RNAm disminuyen después de 4 semanas de diabetes y se incrementan con el tiempo excediendo los niveles de las ratas controles a las 24 semanas (152).

Pagtalunan y colaboradores, demostraron la pérdida y fusión de podocitos (células epiteliales viscerales glomerulares) en indios Pima con diabetes tipo II y nefropatía. El borramiento del proceso de los podocitos fue asociado con una reducción en el número de podocitos por glomérulo y un incremento en el área de superficie destinada a los podocitos (153).

Osterby y colaboradores, además demuestran una peculiar herida epitelial glomerular en ratas con diabetes inducida con aloxana. Un incremento en el número de estructuras lisosomales fue encontrado, particularmente en las células glomerulares epiteliales en ratas con diabetes inducida con STZ a largo plazo (154).

Las bases bioquímicas y ultraestructurales del engrosamiento de la MBG y el incremento en la permeabilidad de las macromoléculas a través de la barrera de filtración de la pared capilar glomerular están parcialmente entendidas.

Una heterogénea población de proteínas colágenas y no colágenas han sido identificadas en la MBG.

Hirose y colaboradores, demostraron el progresivo aumento de la MGB en ratas diabéticas no tratadas durante 18 meses (155). Similares resultados fueron encontrados en ratas diabéticas con hiperglucemia moderada después de 6 meses de diabetes (156).

Brees y colaboradores, no encontraron cambios en el contenido de colágena tipo IV y nidogen/entactina pero si un incremento en laminina y fibronectina en extractos de MBG en ratas después de 3 meses de la inducción de diabetes (157).

Alteraciones sitio-específicas en la composición de la MBG han sido descritas en ratas con diabetes inducida con STZ. La técnica de inmunocitoquímica acoplada a proteínas de oro ha revelado un relativo incremento en la intensidad de unión de las cadenas α_1 , α_2 , y α_3 , pero no de α_4 de la colágena tipo IV. En riñones de pacientes con diabetes, un relativo decremento en la densidad subendotelial de α_1 y α_2 , con cambios similares en α_3 y α_4 , han sido encontrados por inmunofluorescencia (158).

La histopatología tubular puede variar en los animales con diabetes inducida con STZ con diferentes antecedentes genéticos. Por ejemplo, Honjo y colaboradores demuestran que aunque el ratón DBA/2N y el ratón CD-1 manifiestan lesiones tubulares corticales dístales después de 4 y 12 semanas de diabetes, las características de estos cambios son diferentes. Mientras las células tubulares dístales del ratón DBA/2N muestra inclusiones PAS positivas, el ratón CD-1 desarrolla deformación en las células epiteliales y dilatación luminal en sus túbulos distales, las lesiones Arman-Ebstein fueron raramente encontrados (159).

En ratas con diabetes inducida con STZ, la hipertrofia renal puede ser detectada un día después de la inducción de la diabetes. El primer signo de hipertrofia renal es el incremento en el contenido total de RNA en los extractos de riñón después de un día de diabetes (160).

La hipertrofia renal es paralela al incremento en el contenido de proteínas del riñón. El riñón incrementa su peso de 15 a 20% 3 días después de la administración de la STZ y de 70 a 90% después de 6 semanas. Este alargamiento tubuloepitelial ocurre con hipertrofia o nefromegalia en las ratas con diabetes inducida con STZ (161). En un trabajo contradictorio, Mayhew y colaboradores, encontraron que las ratas con diabetes inducida con STZ no tratadas con insulina tienen un volumen tubular normal después de 16 semanas de diabetes (162).

En el estudio de Rasch, el examen histológico mediante microscopia de luz y microscopia electrónica; muestra que las células epiteliales de los túbulos proximales de ratas hembras de la cepa Wistar con diabetes inducida por STZ presentan una apariencia normal y las células con cambios patológicos sólo se presentan en los túbulos distales, especialmente en la corteza y en bandas en la medula. Estas células además muestran gránulos de glucógeno positivos a la reacción de PAS en el citoplasma y una disminución de lisosomas, vacuolas endocíticas y membrana celular basal (163).

Zador y colaboradores, en otro trabajo, demostraron un incremento significativo en el peso del riñón y abundancia de glucosilceramida y del gangliosido GM3 después de 16 días de iniciada la diabetes en ratas machos, sugiriendo un papel de acumulación de glucoesfingolípidos durante la hipertrofia renal en estos animales (164).

Las anomalías estructurales de la membrana basal tubular en la diabetes pueden ser convenientemente divididas en 2 fases. En la primera fase de la enfermedad, aparece un extremo incremento en la masa membranal, acompañado de hipertrofia renal con anomalías morfológicas; esto seguido de un conspicuo engrosamiento después de transcurridas varias semanas.

El engrosamiento de la membrana basal tubular es una característica estructural discreta de la enfermedad renal en ratas con diabetes inducida con STZ (165). Estos cambios traen consigo una alterada síntesis de componentes clave de las membranas basales.

Desjardins y colaboradores, demostraron un incremento en los niveles de las cadenas $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV) y $\alpha 3$ (IV) en la membrana basal tubular, en la en MBG y la cápsula de Bowman de ratas macho de la cepa Sprague- Dawley con diabetes inducida con STZ. En ratones con diabetes inducida con STZ, los autores reportaron un incremento en los niveles de RNAm de fibronectina y la cadena $\alpha 1$ (IV) de la colágena después de 6 a 9 días de la inducción de la diabetes (166).

Las tasas de degradación de las glucoproteínas de matriz pueden disminuir durante la enfermedad renal (167) y esta puede contribuir con el incremento en la acumulación de matriz en avanzados estadios de la enfermedad. Estudios *in vivo* de la MBG de ratas con diabetes inducida con STZ han mostrado que la tasa de degradación esta disminuida significativamente comparada con los animales controles (168). Las actividades de varias enzimas corticales comprometidas en la degradación de la colágena están además disminuidas en animales experimentales y pacientes con diabetes (169).

Otros estudios han reportado que los glomérulos aislados de ratas diabéticas presentan una disminución en la actividad de las proteasas, enfatizando en 2 clases generales de enzimas proteolíticas, las metaloproteasas y las catepsinas

(170). Los tratamientos con insulina normalizan la actividad de la catepsina pero disminuyen la actividad de las metaloproteasas (170).

Yamamoto y colaboradores, evaluaron la expresión de TGF- β en humanos y ratas con diabetes inducida con STZ y encontraron un incremento progresivo en la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), RNAm y proteínas, así como fibronectina y proteoglicanos. Los glomérulos de humanos y ratas con nefropatía diabética mostraron un aumento en las proteínas inmunoreactivas a TGF- β , así como depósitos de una forma especial de fibronectina, donde la acumulación de matriz extracelular no fue un rasgo característico. Concluyen que el TGF- β es muy importante en la patogénesis de la nefropatía diabética (171).

Yoshida y colaboradores, analizan los efectos de altas concentraciones de glucosa sobre el tejido glomerular después de la lesión aguda en células mesangiales en rata. Inyectaron el anticuerpo monoclonal anti-thy-1 y ox-7 a ratas con diabetes inducida con 65mg/kg i.v de STZ y a ratas sanas. El incremento en la proliferación de antígeno celular nuclear en las células del glomérulo el día 4 y la hiper celularidad el día 18 fue mayor en las ratas diabéticas comparadas con las sanas, en este modelo la glomeruloesclerosis fue observada el día 60 en las ratas diabéticas. Estos datos sugieren que la deficiencia de insulina puede verse reflejada en el incremento de la matriz mesangial en condiciones de hiperglucemia *in vivo* (172).

Chen y colaboradores, investigaron la distribución celular de la integrina $\alpha 3\beta 1$ en los podocitos de pacientes con nefropatía diabética y en ratas con diabetes inducida con 55 mg/kg de STZ. Se evaluaron los efectos de altas concentraciones de glucosa en podocitos de rata en cultivo. Para ambos grupos se realizó la detección de la subunidad $\alpha 3$ de la integrina por inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que el número de partículas de oro y la impregnación de la subunidad $\alpha 3$ en podocitos fue más débil en los pacientes con nefropatía diabética comparada con los riñones controles. La impregnación de $\alpha 3$ en podocitos en las ratas diabéticas mal controladas también era débil después de 1-3 meses de hiperglucemia. Concluyen que la expresión de la integrina $\alpha 3$ en los podocitos fue suprimida en humanos y ratas con diabetes, posiblemente debido a los efectos de hiperglucemia, y que la supresión se vuelve más severa con la duración de la diabetes (173).

Obineche y colaboradores, analizaron mediante microscopía de luz y microscopía electrónica los riñones de ratas con diabetes inducida con 60mg/kg de peso STZ; a las 4 semanas y 8 meses después de la inducción de la diabetes. Encontraron una evidente hipertrofia renal, reportada como un incremento en el peso de los riñones. Los riñones diabéticos son dos veces más grandes después de 4 semanas comparados con los controles después de 8 meses de la inducción. Además reportan cambios morfológicos en la corteza renal y túbulos renales. En la corteza reportan patologías como la tubulonecrosis, glomeruloesclerosis, así como pérdida de podocitos.

5. DIABETES EXPERIMENTAL.

Los animales diabéticos pueden desarrollar enfermedad renal que asemeja a la nefropatía diabética en humanos, sin embargo ningún modelo animal presenta cambios renales idénticos a los que se observan en humanos. Los modelos animales con diabetes espontánea pueden usarse para la investigación de los mecanismos mediante los cuales se desarrolla la nefropatía diabética y los efectos de diversos tratamientos y modalidades en la progresión de la enfermedad renal.

5.1 INDUCCIÓN DE LA DIABETES.

La diabetes puede ser producida experimentalmente por cirugía, infección viral y la administración de hormonas o de agentes químicos (175-176).

5.2 MODELOS DE DIABETES ESPONTÁNEA.

La diabetes espontánea en animales es relativamente común. Desde 1851 Leblanc documentó el caso de diabetes espontánea en un mono. Posteriormente se ha documentado la presencia ocasional de diabetes en gatos, perros, ardillas, zorros, delfines, hipopótamos, antílopes y animales de granja. La diabetes en la mayoría de estos animales está frecuentemente caracterizada por obesidad, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En el caso de animales no obesos las características son hipoinsulinemia, cetosis y dependencia a la insulina. La enfermedad puede ser inducida en muchos animales, particularmente en roedores de laboratorio, utilizando una variedad de agentes químicos y otros procedimientos experimentales (175, 176, 177,178). Los modelos genéticos que semejan a la diabetes mellitus tipo 2 son producidos por la selección de una mutación espontánea o por ingeniería genética. Son muchos los ejemplos incluyendo el ratón db/db, el ratón ob/ob, ratón kkk, ratón NZO, rata fa/fa Zucker, y rata diabética fa/fa Zucker. Muchos de estos modelos muestran varios grados de glucemia, insulinemia y obesidad.

Los modelos genéticos de Diabetes tipo 1 incluyen el ratón NOD y la rata diabética BB. En el cuadro 8 se muestran algunas características de animales con diabetes espontánea.

Cuadro 8. Modelos de diabetes espontánea.

Nombre	Constitución	Insulina plasmática	Tipo de diabetes	Cetosis	Célula β
Rata BB (Bio-Breder)	delgada	Muy baja	tipo 1	++++	Insulinitis. Necrosis de las células β
Ratón NOD (diabético no obeso) Jcl:ICR	delgado	baja	tipo 1	+++	Destrucción autoinmune mediada por células T
Hámster Chino (Cricetulus griseus)	delgado	normal o baja	tipo 1	+	Degranulación, \downarrow en el número de células β ; con cetosis: necrosis
Hámster Sudáfrica (Mysromys albicaudatus)	delgado	?	tipo 1	++	Hiperplasia e infiltración de glucógeno; con cetosis: necrosis
Perro Keeshond	delgado	baja	tipo 1	+++	Ausencia de células β ; células β solitarias.
Ratón C57BL/6J ob/ob	muy obeso	Inicio muy alta, después normal.	tipo 2	—	Inicio: degranulación; después: hiperplasia y regeneración.
Ratón C57BL/KsJ db/db	muy obeso	Inicio: alta, después normal	tipo 2	ocasionalmente	Inicio: degranulación, después: necrosis de células β
Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)	obeso	Alta	tipo 2	—	Inicio: Aumento de la insulina pancreática.
Ratón amarillo	obeso	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Ratón KK	obesidad moderada	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Ratón amarillo-KK	obesidad moderada	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Rata obesa de la cepa Zuker (fa/fa Zuker)	obesa	Alta	tipo 2	—	Inicio: alargamiento de islotes; después: \downarrow insulina pancreática, \downarrow número de células β .
Rata de arena (Psammomys obesus)	obesa	Alta	tipo 2	ocasionalmente	Alargamiento de los islotes: degranulación de células β ; depósitos de glucógeno; con cetosis: necrosis
Ratón rápido??? (Acomys cahirinus)	obeso	Alta	tipo 2	ocasionalmente	Hipertrofia e hiperplasia masiva
Ratón híbrido Wellesley (C3hf X I)	obeso	Alta	tipo 2	—	Hiperplasia, hipertrofia y degranulación de las células β .
Hámster Djungarian (Phodopus sungorus)	obeso	Alta	tipo 2	+	Hipertrofia e hiperplasia
Tuco-tuco (Ctenomys talarum)	muy obeso	?	tipo 2 ?	—	Hipertrofia
Simio negro (Macaca nigra)	delgado	Normal	?	—	Amiloide
Mono rehesus (Macaca mulatta)	obesidad central	Inicio: alta, después: baja	tipo 2	—	Alteraciones en la secreción de insulina.

5.3 MODELOS DE DIABETES INDUCIDA.

5.3.1 INDUCCIÓN QUIRÚRGICA.

Los primeros intentos de inducir la diabetes experimental se realizaron en perros a través de la pancreatectomía parcial o total. Este procedimiento también fue el primero que se utilizó para causar diabetes en ratas gestantes. Posteriormente mediante la lesión selectiva de las células del núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas, se logró que éstas desarrollaran una diabetes experimental que semeja a la tipo 2, presentando obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (175).

5.3.2 INDUCCIÓN HORMONAL.

Las llamadas hormonas “anti-insulina” como la epinefrina, el glucagón, los glucocorticoides y la hormona de crecimiento, tienen un efecto antagónico al de la insulina. Cuando la epinefrina y el glucagón se encuentran en cantidades elevadas, ya sea por la presencia de tumores o por la respuesta al estrés, se reduce la tolerancia a la glucosa y se presenta la hiperglucemia. La epinefrina y el glucagón administrados en altas dosis a animales, tienen el mismo efecto anti-insulina que el que se presenta en humanos.

Incluso se ha reportado la presencia de hiperglucemia e hiperplasia de las células beta del páncreas en animales a los que se les administró hidrocortisona o ACTH (176,177).

5.3.3 INDUCCIÓN VIRAL.

Los virus representan otro mecanismo de inducción de la diabetes, están asociados con el desarrollo de la diabetes tipo 1 en humanos y en animales. Pueden destruir directamente a las células β por efecto citolítico propio del virus o bien actuar indirectamente por una respuesta autoinmune iniciada y aumentada por el virus. La presencia de diabetes en estos casos, se correlaciona con la habilidad de las células β para mantener la duplicación viral cuadro 9 (179).

Cuadro 9. Virus que inducen el desarrollo de diabetes.

Virus	Tipo	Huésped	Factores Genéticos	Características
Encefalo-Mio-Carditis (EMC)	RNA	ratón hámster	+ +	Producen degranulación de células β y necrosis.
Coxsackie B	RNA	ratón primates no humanos humanos	+ + no determinado	Inflamación focal exócrina con lesiones necrotizantes; alteraciones finas de células β sin necrosis.
Retrovirus	RNA	ratón humanos	+ no determinado	Necrosis de islotes focal a extensa.
Virus bovino	RNA	ganado	no determinado	Necrosis de células β
Virus Kilham de la rata	DNA	rata	+	
Citomegalovirus	DNA	humanos	no determinado	
Epstein-Barr	DNA	humanos	no determinado	
Varicela zoster	DNA	humanos	no determinado	

5.3.4 INDUCCIÓN QUÍMICA.

Existen diferentes sustancias capaces de producir diabetes:

*Las sustancias que son tóxicas para las células beta del páncreas que las destruyen, produciendo un efecto citotóxico irreversible.

*Las que actúan sobre las células beta del páncreas produciendo un efecto citotóxico reversible.

*Las que aumentan los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y secundariamente producen diabetes Cuadro 10 (176, 177,178).

En general, los agentes químicos de la primera categoría producen lesiones que ocurren durante la destrucción de la célula β semejante a lo que ocurre con la diabetes tipo 1. Estos agentes permiten estudiar a los modelos animales por tiempos prolongados ya que producen lesiones prácticamente a largo plazo.

Cuadro 10. Agentes químicos inductores de diabetes.

Agentes con efectos citotóxicos irreversibles en las células beta	Agentes con efecto citotóxico reversible en las células beta	Otros agentes
Aloxana Estreptozotocina Difenilthiocarbazona Oxine-9-hidroxiquinolona Vacor	6 aminonicotinamida L-asparginasa Azida Cianida Ciproheptamina Ácido dehidroascórbico Fluorida Iodoacetato Malonato Tiazidas 2-deoxiglucosa Mannoheptulosa	Anticuerpos anti-insulina Somatostatina Catecolaboradoresaminas Glucocorticoides Glucagón

Los agentes químicos más utilizados en la inducción de diabetes por sus efectos citotóxicos irreversibles en las células β son la aloxana y la estreptozotocina. Ambos son citotoxinas β , que dependiendo de la dosis, pueden producir efectos secundarios.

Aunque la aloxana fue el primer agente en esta categoría, la estreptozotocina ha demostrado ser más efectiva y es el agente más utilizado para producir diabetes experimental. La estreptozotocina tiene una gran selectividad por la célula β (180), y produce una menor mortalidad de los animales (181).

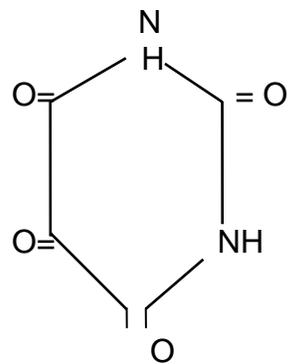
5.3.4.1 ALOXANA.

Fórmula, Vida Media y Acción.

La aloxana fue la primera sustancia química descrita con capacidad diabetogénica. Aunque su mecanismo de acción aún no se conoce con exactitud, existe evidencia de su afinidad por la membrana de las células β del páncreas (175).

La aloxana, es un derivado del ácido úrico (2, 4, 5,6 tetraoxohexahidropirimidina). Su capacidad para destruir las células β del páncreas en forma selectiva fue descrita por Dunn en 1946 durante sus estudios de nefrotoxicidad. Desde entonces se ha utilizado para la inducción de diabetes permanente en animales de laboratorio (182). (Figura 4).

Figura 4



Aloxana

La aloxana esta formada por anómeros α y β , es soluble en agua y ligeramente ácida en solución. Cuando se encuentra en solución a un pH 3 o menor, es estable a temperatura ambiente. A pH 7, debe conservarse por abajo de 4°C para prevenir que se convierta en ácido aloxánico. Tiene una vida media de entre 1 a 2.8 min, después de la administración intravenosa de 50 a 100 mg/kg (182).

El efecto diabetogénico de la aloxana es rápido, evidenciado por una hipoglucemia aguda una hora posterior a la administración seguida de una franca hiperglucemia a las 48 horas (183).

La aloxana induce diabetes destruyendo las células β de los islotes pancreáticos. Una característica importante de la aloxana es que sus efectos diabetogénicos pueden ser bloqueados tanto por azúcares metabolizables como no metabolizables (D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa). Se ha visto que este mecanismo protector de los azúcares es altamente estereo-específico siendo mayor para los anómeros α . También existe evidencia que sugiere que la aloxana actúa en un sitio de glucoreceptores responsable de la liberación de insulina, que es diferente del sitio de transporte.

El anómero α de la D-glucosa que tiene mayor efecto protector que el anómero β , es también un estímulo más potente para la liberación de insulina. Sin embargo el anómero β es transportado más rápidamente al interior de la célula (183, 184,185).

La dosis necesaria para inducir la diabetes varía dependiendo de la especie y la edad del animal. Sin embargo se ha visto que las células β pancreáticas tienden a recuperarse en número y función a través del tiempo, lo que se ve reflejado en un

aumento de los niveles sanguíneos de insulina, los cuales en ratas prácticamente se normalizan a los 20 días de inducción de la diabetes con aloxana (183,184). Okamoto al estudiar el mecanismo de acción de la aloxana propuso un modelo en el cual la fragmentación del DNA nuclear de las células β era importante para la inducción de la diabetes con acumulación de radicales hidroxilo y superóxido (186,187).

La alta toxicidad de la aloxana produce una elevada mortalidad en las ratas. Las dosis bajas de aloxana para inducir diabetes experimental, ocasionan una reducción parcial de la masa de células β y produce un moderado estado de deficiencia de insulina, sin cetosis y con resistencia a la insulina (183, 184, 185, 188, 189,190).

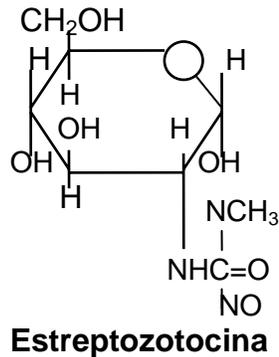
5.3.4.2 ESTREPTOZOTOCINA

Fórmula, Vida Media y Mecanismo de Acción.

La estreptozotocina (STZ) es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes* que ha sido ampliamente utilizado como agente antitumoral y diabetogénico. Presenta una citotoxicidad específica *in vivo* sobre las células β del páncreas sin afectar otros tejidos. Es análoga de la glucosa (2-deoxi-2-[3 metil-3-nitrosourea] 1-D-glucopyranosa). Presenta una cadena de metil nitrosourea unida a la posición C2 de la D-glucosa (Figura 5).

Está compuesta por isómeros α y β con respecto a la glucosa. Es inestable a temperatura ambiente, por lo que hay que mantenerla congelada. La STZ se descompone rápidamente en solución acuosa a un pH neutro y su estabilidad óptima se consigue a pH 4 (175, 182, 191,192).

Figura 5



La STZ tiene una vida media de 5 minutos y es eliminada de la circulación en un lapso de 4 a 6 horas. Se ha demostrado que su efecto es severo e irreversible. La hiperglucemia que produce se considera como una forma específica sin cetogénesis ni elevación de ácidos grasos libres (175).

La STZ produce la degeneración de los islotes de Langerhans. A dosis bajas, puede ocasionar daño en el DNA y provocar apoptosis de las células β del páncreas, mientras que en dosis mayores la forma predominante de muerte celular es la necrosis. Administrada *in vivo* a dosis de 40 mg/kg de peso por día durante 5 días consecutivos causa apoptosis, mientras que a dosis única entre 100 y 200 mg/kg de peso provoca necrosis de las células β (193, 194, 195).

Aún no se sabe con exactitud cual es el mecanismo de acción de la STZ, aunque se han propuesto varios y más bien podría ser una combinación de éstos. La STZ se une a las membranas de las células β del páncreas. El reconocimiento de la STZ se da por un receptor específico en la superficie de las células β –mayor afinidad por el anómero α de la parte glucosamina–, el transportador de glucosa 2 (GLUT2). Se ha visto que las células que expresan transportador de glucosa 1 (GLUT1) pero no GLUT2, no se afectan por esta sustancia (196).

Una vez dentro de la célula, ocurren frecuentemente 3 fenómenos responsables de la muerte de la célula β : (Figura 6).

1) Procesos de Metilación.- El efecto deletéreo de la estreptozotocina resulta de la degeneración altamente reactiva de iones carbonio (CH_3^+) formados por la descomposición de la nitrosurea. Estos iones causan ruptura del DNA por alquilación de las bases de DNA en varias posiciones (29) originando activación de enzimas nucleares poli-sintetasa (ADP-ribosa) como parte del mecanismo reparador celular. Como nucleótidos celulares particularmente el NAD^+ son utilizados como sustratos por enzimas nucleares ocurriendo así una disminución

en NAD^+ dentro de los primeros 20 minutos. El brusco e irresistible agotamiento de NAD^+ , conduce a una interrupción de la energía y metabolismo proteico dependientes de NAD^+ , llevan finalmente a la muerte celular. El CH_3^+ tiene la capacidad de alquilar las bases del DNA, lo que produce la ruptura de sus puentes en varias posiciones. Cuando el daño es lo suficientemente severo para que el DNA no pueda ser reparado, estas células inician el proceso de apoptosis (193,194).

2) Formación de Radicales libres. Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno puede ser producido por los islotes del páncreas después de la exposición a la estreptozotocina tanto *in vivo* como *in vitro* (197,198). Estos radicales tienden a fragmentar una considerable cantidad de DNA. La STZ inhibe a la superóxido-dismutasa –que es un acarreador endógeno de radicales libres– por lo que se ha concluido que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la citotoxicidad de la STZ (193,197,198).

3) Generación de óxido nítrico (ON). Se ha propuesto al óxido nítrico, dentro de las sustancias que actúan para mediar los efectos diabetogénicos de la estreptozotocina. No queda claro el mecanismo preciso de la acción que conduce a la generación de óxido nítrico, sin embargo dicha producción de óxido nítrico generada por estreptozotocina, parece estar involucrada en la citotoxicidad hacia las células β (193, 194,197).

Recientemente, se ha propuesto una hipótesis que intenta explicar el mecanismo de acción de la estreptozotocina, a través de la producción de superóxido que genera superoxinitritos. Estos a su vez, se disocian en óxido nítrico y radicales de hidroxilo que conducen a dañar el DNA de la célula β produciendo apoptosis (199). Cualquiera que sea el mecanismo, el DNA nuclear y mitocondrial son reparados utilizando la poli-sintetasa (ADP-ribosa) nuclear. La actividad de esta enzima se incrementa de manera importante dentro de los 10 minutos después de la inyección de la estreptozotocina. Esta enzima utiliza como sustrato a NAD la cuál disminuye notablemente dentro de los 20 minutos después de la inyección, con ello se producen unidades de ADP-ribosa, necesarias para reparar el DNA (200). Después de múltiples inyecciones de estreptozotocina a dosis bajas, se produce una degeneración de islotes por acción citotóxica directa, lo cual inicia la respuesta inflamatoria con migración de las células mononucleares y la transformación a macrófagos (201). Dichas células fagocitan a las células β , liberando mediadores químicos celulares e infiltración de linfocitos (202,203).

Diversos mecanismos han sido postulados para explicar porque ocurren estos efectos letales selectivos sobre las células β , que incluyen; la elevada afinidad de la estreptozotocina sobre la membrana de la célula β ; la presencia de grupos SH-con sensibilidad especial a las interacciones oxidativas; la baja capacidad de las células β para deshacerse de radicales libres y por último, una disminución en la relación NAD^+ /DNA en islotes, comparada con la de otros tejidos. Figura 6.

Célula β

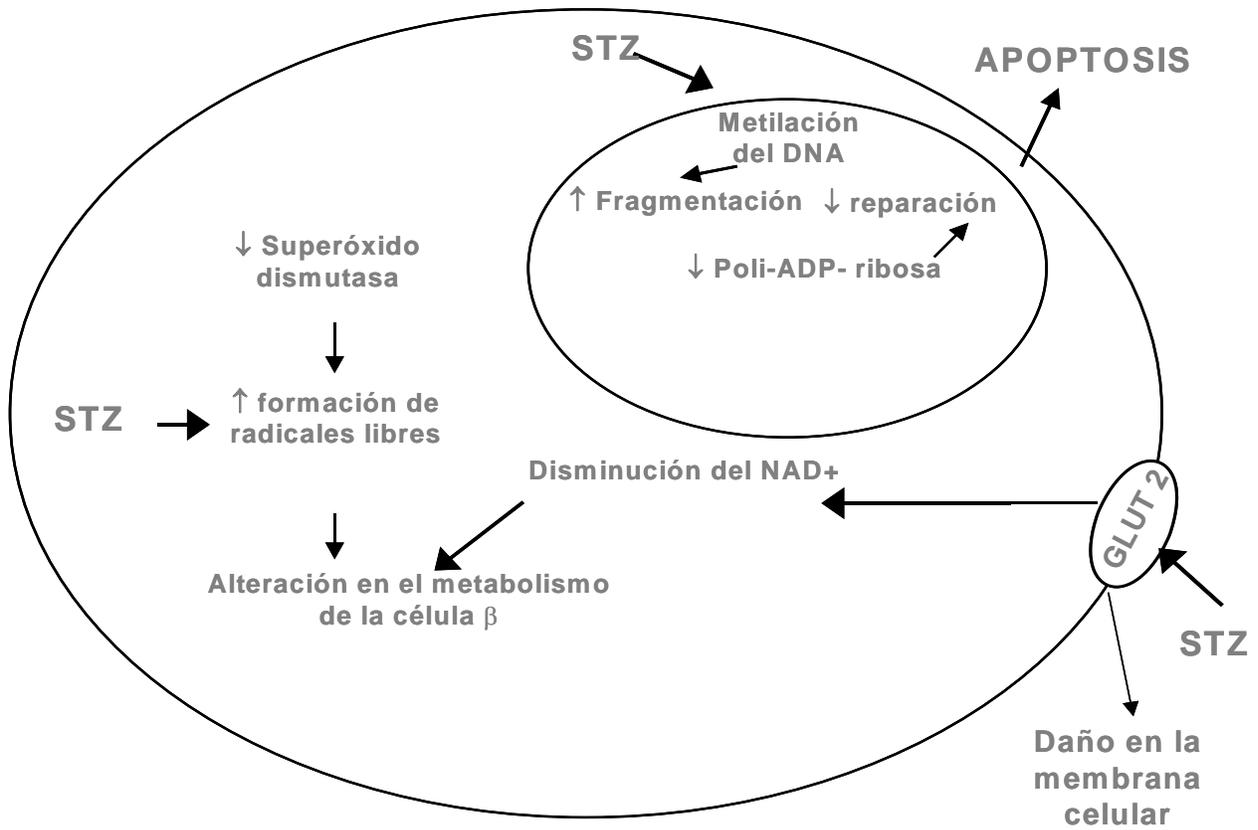


Figura 6. Posible mecanismo de acción de la estreptozotocina (STZ) en la célula β .

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La diabetes provoca alteraciones estructurales y funcionales en el riñón que modifican la superficie de filtración con un progresivo deterioro de la función renal y un aumento en la tasa de filtración (hiperfiltración), y pérdida de permeabilidad macromolecular selectiva en los capilares glomerulares. Se ha propuesto que en este proceso, las alteraciones en la expresión de moléculas de matriz extracelular como la colágena tipo IV, fibronectina y lamina juegan un papel muy importante que deberá ser analizado en relación al tiempo de evolución de la diabetes, al daño estructural del riñón y a la pérdida de la función renal.

7. HIPÓTESIS.

La diabetes alterará la estructura renal y la distribución y cantidad de moléculas de matriz extracelular provocando un incremento en la producción de colágena tipo IV, laminina AB-1 y fibronectina que contribuirá al deterioro progresivo de la función renal.

8. OBJETIVOS.

8.1 OBJETIVOS GENERALES.

- 1) Determinar el efecto de la diabetes sobre la distribución y cantidad de fibronectina, laminina AB-1 y colágena tipo IV, en el riñón de rata analizado en los días 30,60 y 90.
- 2) Correlacionar los cambios en la producción de fibronectina, laminina AB-1 y colágena tipo IV, con los cambios macroscópicos y estructurales del riñón a los 30, 60 y 90 días.

8.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar los cambios macroscópicos del riñón de las ratas diabéticas, comparando peso y tamaño con el de las controles.
- 2) Correlacionar los niveles de glucosa, HbA_{1c}, cetonuria, glucosuria, creatinina y ácido úrico con los daños estructurales en el riñón de rata diabética.
- 3) Determinar la relación entre las alteraciones de la producción de fibronectina laminina AB-1 y colágena tipo IV, con los cambios macroscópicos y estructurales del riñón de ratas diabéticas.

9. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 85 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre los 200-300g, se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio con temperatura controlada entre los 22-25 °C, y alternancia de luz oscuridad 12/12, con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en 6 grupos:

Grupo EI: Constituido por 19 ratas a las que se les administró una dosis única de 50 mg/kg de peso de STZ en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal. Se consideraron diabéticas aquellas cuyos niveles de glucosa fueron ≥ 200 mg/dl 48 horas después de la administración de STZ.

Grupo CI: Constituido por 9 ratas a las que se les administró una dosis única de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal de acuerdo a su peso corporal.

Grupo EII: Constituido por 17 ratas a las que se les administró una dosis única de 50 mg/kg de peso de STZ en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal. Se consideraron diabéticas aquellas cuyos niveles de glucosa fueron ≥ 200 mg/dl 48 horas después de la administración de STZ.

Grupo CII: Constituido por 9 ratas a las que se les administró una dosis única de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal de acuerdo a su peso corporal.

Grupo EIII: Constituido por 21 ratas a las que se les administró una dosis única de 50 mg/kg de peso de STZ en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal. Se consideraron diabéticas aquellas cuyos niveles de glucosa fueron ≥ 200 mg/dl 48 horas después de la administración de STZ.

Grupo CIII: Constituido por 10 ratas a las que se les administró una dosis única de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.3 por vía intraperitoneal de acuerdo a su peso corporal.

Entre las 8-10 a.m todas las ratas se pesaron y se les realizaron las siguientes determinaciones una vez por semana:

*Glucosa sanguínea tomada de la vena caudal (la determinación se realizó con glucómetro Elite Bayer, con tiras reactivas de Ascensia Elite, Bayer).

*Glucosuria, cetonuria, pH, hematuria y proteinuria (con tiras reactivas Multistix 10 SG Bayer).

Antes del sacrificio se tomó sangre de la vena caudal y se realizó la determinación de HbA_{1c}, se obtuvo la sangre total se centrifugó a 3000 r.p.m por 15 minutos (Centrífuga Beckman GS-15R), se separó el suero y se congeló a -70°C para el análisis de glucosa, colesterol, triglicéridos, VLDL, ácido úrico, creatinina (analizador Kodak Ektachem DT 60 II) e insulina (RIA).

Los grupos EI y CI se sacrificaron a los 30 días, los grupos EII y CII se sacrificaron a los 60 días y los grupos EIII y CIII se sacrificaron a los 90 días por dislocación cráneo-cervical, se les realizó una disección abdominal, se obtuvieron los riñones y se registró su peso y diámetro.

9.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

Las determinaciones de los parámetros bioquímicos se realizaron por medio de química seca en el analizador Kodak Ektachem DT 60 II.

*Glucosa: reacción en la que la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno en presencia de glucosa oxidasa.

*Triglicéridos: separación de los triglicéridos de los acarreadores lipoprotéicos, los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa y se retiran los residuos de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa.

*Colesterol: el colesterol se disocia de los acarreadores de lipoproteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan a colesterol libre que se oxida con colesterol oxidasa. La reacción final produce color a través de la cual se calcula la cantidad de colesterol presente.

La determinación de hemoglobina glucosilada se realizó en el DCA 2000 de Bayer. En este análisis se determinaron las concentraciones de HbA_{1c}, la concentración de Hb total y la relación entre ambas, que se reporta como porcentaje de HbA_{1c}. Para la determinación de Hb total, se usa ferricianuro potásico, el cual oxida la Hb de la muestra a metahemoglobina. La metahemoglobina forma un complejo con el tiocinato, formándose tiocinmetahemoglobina, que es la que se mide. Para la medida específica de la HbA_{1c} se utiliza la inhibición de la aglutinación de partículas de látex, recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón, específico para HbA.

Las determinaciones de insulina se realizaron por radioinmunoensayo (RIA). Se utilizaron kits comerciales DPC (TKIN1). Todos los análisis se realizaron de acuerdo al protocolo proporcionado por los fabricantes. Cada muestra se contó durante un minuto en un contador gamma.

9.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ.

Los riñones derechos se fijaron en formol amortiguado al 10%. Se lavaron, se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en paraplast.

Mediante la técnica histológica, se realizó la inclusión del riñón en paraplast, se realizaron cortes con micrótopo de rotación de 4 μ m, que se tiñeron con:

*H/E

*Masson

*Pas-Schiff

*Hierro coloidal

9.3 INMUNOHISTOQUIMICA E INMUNOFLUORESCENCIA.

Se utilizaron cortes de 4 μ m colectados en portaobjetos cargados con poly-L- lisina (Sigma). La inmunohistoquímica se realizó de acuerdo a los procedimientos del Kit DAKO Envision (DAKO, K1395) en el cual se empleó un polímero de anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y se reveló con el sistema nueva fucsina (DAKO, K698). Las secciones fueron contrastadas con Hematoxilina.

Para la localización de colágena tipo IV las laminillas fueron incubadas toda la noche a 4°C con anti-colágena tipo IV (H234) de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Cat sc-11360) en una dilución de 1:25.

Para la localización de laminina AB-1 las muestras fueron incubadas con anti-laminina AB-1 de conejo 1:200 (NeoMarkers, Fremont, CA, RB082) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Para la detección de fibronectina las muestras se incubaron con anti-fibronectina de conejo diluido 1:400 (DAKO, A0245) por 45 minutos a temperatura ambiente.

Para la inmunofluorescencia se utilizó como anticuerpo secundario el anti-IgG de conejo acoplado a FITC (Excitación 488 y Emisión 505-530), los núcleos fueron contrastados con yoduro de propidio (Molecular Probes, P3566), las muestras fueron observadas con un microscopio confocal invertido (Zeiss, Axiovert 100M) y analizadas mediante el programa LSM 510 (expert mode).

En ambas técnicas la especificidad de los anticuerpos se probó mediante la omisión del anticuerpo primario en una sección que se incubó con una solución de PBS-Tween 1% (controles negativos). Los controles positivos correspondieron a tejidos positivos a los anticuerpos recomendados por el fabricante.

9.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

Se utilizaron cortes teñidos con la técnica tricrómica de Masson, fueron seleccionados 15 glomérulos por cada grupo, de la zona cortical con espacio urinario definido y sin hilio. Se obtuvieron micrográficas de los glomérulos mediante un microscopio óptico de luz con el objetivo de 40X (Axioskop 40, Axiocam, Carl Zeiss).

En las micrográficas obtenidas se realizó un análisis morfométrico con el programa Axiovision 4 (Carl Zeiss). Se delimitó el área del corpúsculo renal (ACR) (espacio urinario + lobulillo glomerular), el área del lobulillo glomerular (ALG) y la zona ocupada por espacios vacíos dentro del mesangio (AEV). Se realizó el conteo de células y núcleos por corpúsculo renal (TEL) (número total de eventos en el lobulillo), para la obtención del área que ocupan dentro del corpúsculo renal, el lobulillo glomerular fue dividido en cuatro cuadrantes, tomando en cuenta para el análisis el cuadrante superior derecho (CSD) (Fig. 7 A, B, C y Fig. 8, A, B).

El área ocupada por los núcleos del lobulillo (ANL), fue determinada a partir del área total de núcleos del cuadrante derecho (ATNCD), dividido por el número total de eventos en los cuadrantes (NTEC) y multiplicado por el total de eventos del lobulillo (TEL).

$$\frac{ATNCD}{NTEC} \times TEL = ANL$$

Al área ocupada por el lobulillo (ALG) se le restó el área ocupada por espacios vacíos (AEV) y la ocupada por los núcleos y células (ANL) obteniéndose así el área aproximada de la matriz mesangial (AMM).

$$ALG - AEV - ANL = AMM$$

Finalmente se determinó la distancia promedio de las asas capilares externas (MBG), realizando un zoom de 1:2 (80X), para observar de 2-4 asas capilares por cada lobulillo renal, midiendo el centro del asa en todos los casos (Fig. 8C).

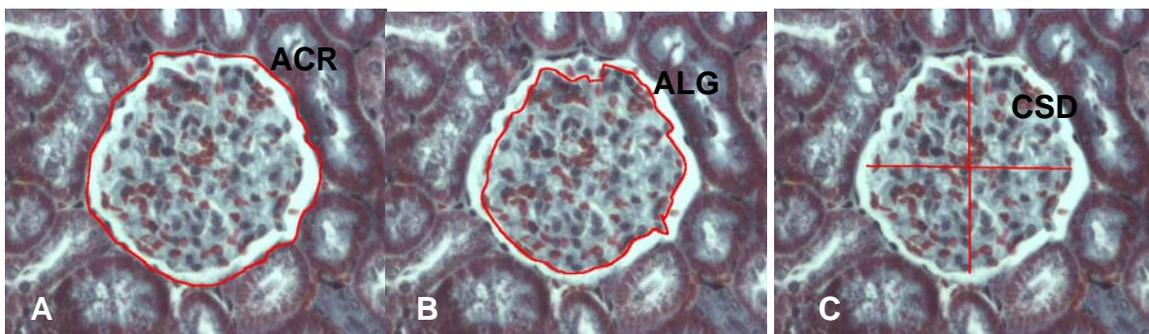


Fig 7. Micrográficas tomadas con Axioskop 4, 100X: (A) área del corpúsculo renal (ACR), (B) área del lobulillo glomerular (ALG), (C) cuadrante superior derecho (CSD).

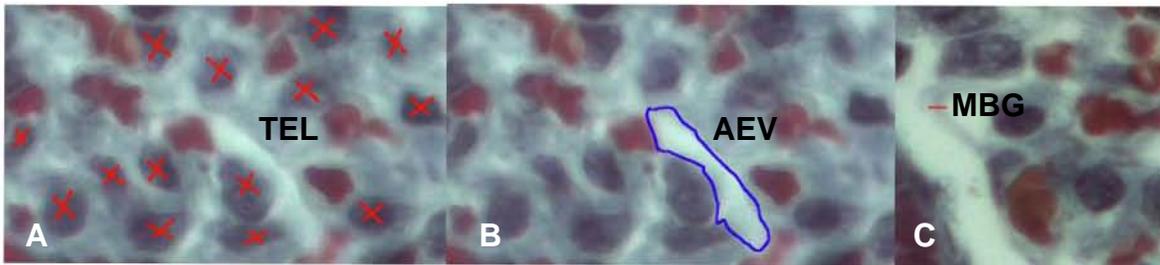


Fig 8. Micrografías tomadas con Axioscop 4, 160X: (A) total de eventos en el lobulillo (TEL), (B) área ocupada por espacios vacíos, (C) cuadrante superior derecho (CSD).

9.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INMUNOFLORESCENCIA.

Se seleccionaron 15 glomérulos (por cada grupo) de la zona cortical con espacio urinario definido y sin hilio. De ellos se obtuvieron micrográficas mediante el microscopio confocal. Se promediaron 5 mediciones, determinadas a través de la expresión de intensidad del anticuerpo en el lobulillo glomerular (Fig. 9). En el caso de los túbulos sólo se realizó la delimitación de los mismos, obteniendo así la intensidad de los anticuerpos (Fig. 9).

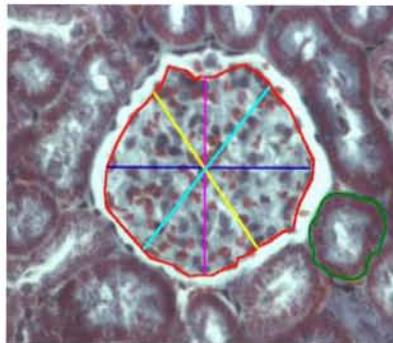


Fig. 9. Micrografía tomada con Axioscop 4,100X: las líneas en color representan las 5 medidas realizadas en el glomérulo y la delimitación de los túbulos renales utilizados para determinar la intensidad de la inmunofluorescencia.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar (EE). Se realizó la prueba de ANOVA de dos vías, se utilizó el programa SPSS versión 10. La prueba fue significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$. Para la comparación específica de los grupos, se realizó una post-prueba de Bonferroni.

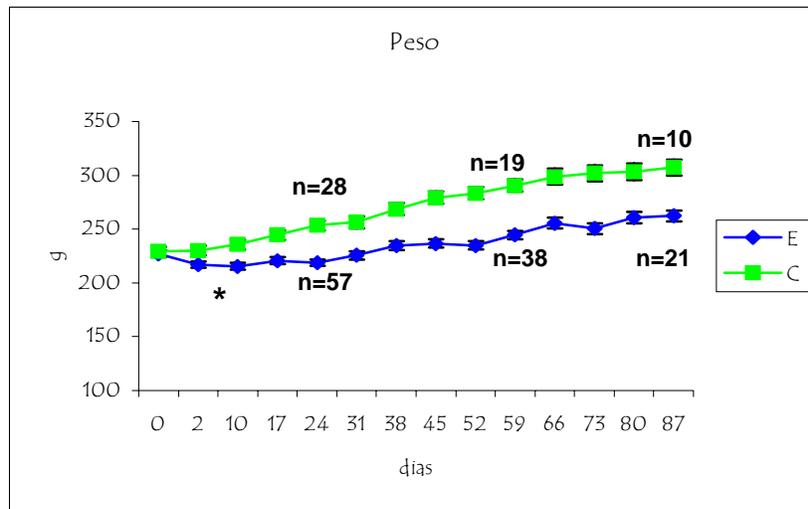
11. RESULTADOS.

11.1 PESO.

Los ratas de los grupos C aumentaron de peso en forma constante a lo largo del estudio, con un peso inicial de 229.3 ± 4.52 g y un peso final de 307.2 ± 7.47 g. Las ratas E disminuyen su peso a partir del día 2 y esta disminución persistió hasta el día 31, a partir del día 38 tuvieron una ligera recuperación que se mantuvo hasta el final del estudio. Al comparar el peso de las ratas de los grupos C y E presentaron una diferencia significativa a partir del día 2 con una $p < 0.001$ (tabla 1, gráfica 1).

PESO (gramos)		
Día	C	E
0	229.3 ± 4.52	227.2 ± 3.17
2	230.2 ± 4.52	$217.0 \pm 3.17^*$
10	235.6 ± 4.52	$215.3 \pm 3.17^*$
17	244.5 ± 4.52	$220.8 \pm 3.17^*$
24	253.5 ± 4.52	$218.7 \pm 3.17^*$
31	256.3 ± 5.49	$225.6 \pm 3.88^*$
38	268.6 ± 5.49	$234.7 \pm 3.88^*$
45	279.3 ± 5.49	$236.7 \pm 3.88^*$
52	283.3 ± 5.49	$234.8 \pm 3.88^*$
59	290.5 ± 5.49	$244.7 \pm 3.88^*$
66	298.8 ± 7.47	$255.6 \pm 5.22^*$
73	301.9 ± 7.47	$250.5 \pm 5.22^*$
80	303.2 ± 7.47	$260.8 \pm 5.22^*$
87	307.2 ± 7.47	$262.3 \pm 5.22^*$

Tabla 1. Peso de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio \pm EE. C Vs E * $p < 0.001$.



Gráfica 1. Peso de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio \pm EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E * $p < 0.001$.

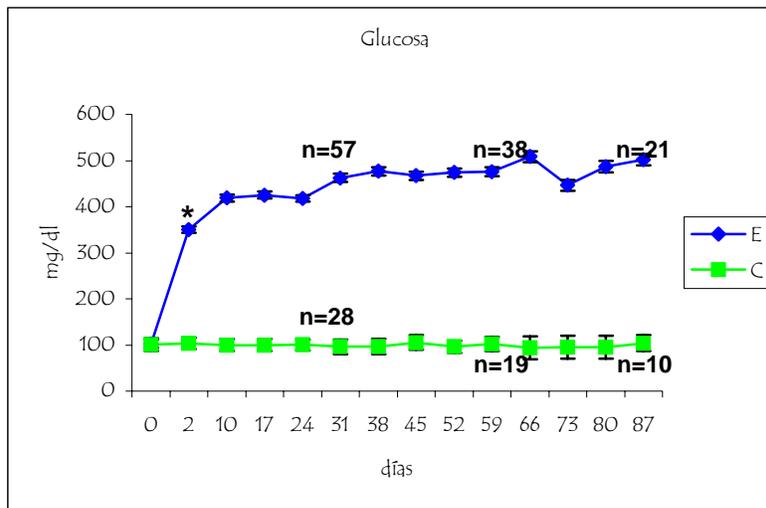
11.2 GLUCOSA.

Las ratas de los grupos C mantuvieron niveles de glucosa menores a los 120 mg/dl durante el estudio. Los niveles de glucosa en los grupos E se incrementaron a lo largo del estudio, alcanzando niveles de 501.8 ± 12.1 mg/dl el día 87.

Al comparar los niveles de glucosa de los grupos C con los E se encontraron diferencias significativas a partir del día 2 $p < 0.001$ (tabla 2, gráfica 2).

GLUCOSA (mg/dl)		
Día	C	E
0	100.3 ± 13.8	102.1 ± 8.99
2	103.7 ± 12.4	350.1 ± 7.34*
10	99.7 ± 13.07	418.9 ± 7.34*
17	99.5 ± 13.07	425.3 ± 7.34*
24	100.1 ± 11.56	418.0 ± 7.34*
31	96.2 ± 16.01	462.3 ± 8.99*
38	96.8 ± 16.72	476.6 ± 8.99*
45	105.3 ± 16.72	466.9 ± 8.99*
52	96.5 ± 13.07	474.3 ± 8.99*
59	101.9 ± 15.38	475.8 ± 8.99*
66	94 ± 24.8	508.4 ± 12.1*
73	95.6 ± 24.8	446.4 ± 12.1*
80	95.4 ± 24.8	487.0 ± 12.1*
87	103.8 ± 17.5	501.8 ± 12.1*

Tabla 2. Glucosa de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE. C Vs E *p <0.001.



Gráfica 2. Glucosa sanguínea de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E *p <0.001.

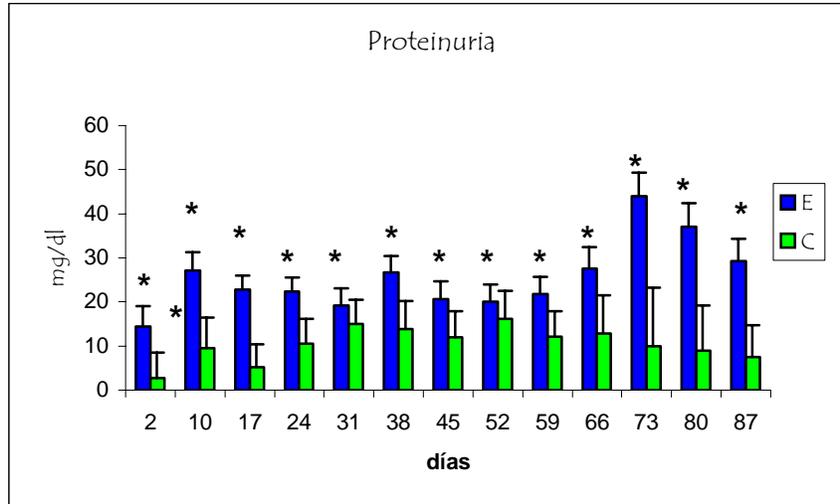
11.3 PROTEINURIA.

Los niveles de proteínas en orina (proteinuria) en los grupos C fueron menores a los presentados en los grupos E. En los grupos C se encontraron a partir del día 2 con un valor de 2.81 ± 5.74 mg/dl, y su valor máximo se presentó el día 52 con un valor de 16.1 ± 6.37 mg/dl. El grupo E presentó proteinuria a partir del día 2, determinándose su valor máximo el día 73 con un promedio de 44 ± 5.27 mg/dl, disminuyendo gradualmente hasta el final del estudio.

Al comparar los promedios de proteinuria de los grupos C con los grupos E presentaron diferencias significativas $p < 0.001$ (Tabla 3, gráfica 3).

PROTEINURIA (mg/dl)		
Día	C	E
2	2.81 ± 5.74	$14.4 \pm 4.59^*$
10	9.54 ± 6.93	$27.1 \pm 4.06^*$
17	5.25 ± 5.14	$22.7 \pm 3.21^*$
24	10.5 ± 5.57	$22.3 \pm 3.18^*$
31	15 ± 5.41	$19.1 \pm 3.83^*$
38	13.8 ± 6.37	$26.6 \pm 3.78^*$
45	12 ± 5.93	$20.5 \pm 4.06^*$
52	16.1 ± 6.37	$20.0 \pm 3.88^*$
59	12.1 ± 5.74	$21.8 \pm 3.83^*$
66	12.8 ± 8.69	$27.4 \pm 5.01^*$
73	10 ± 13.2	$44 \pm 5.27^*$
80	9 ± 10.2	$37.1 \pm 5.27^*$
87	7.5 ± 7.21	$29.2 \pm 5.01^*$

Tabla 3. Proteinuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio \pm EE. C Vs E * $p < 0.001$.



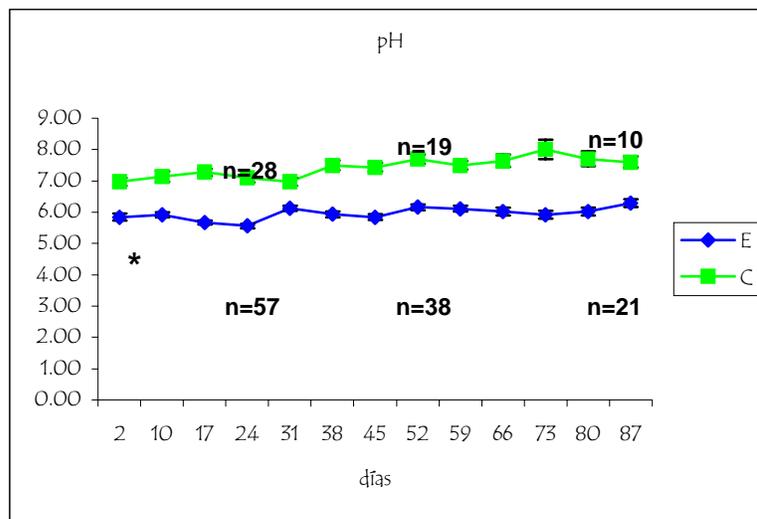
Gráfica 3. Proteinuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Las barras representan el promedio \pm EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E *p <0.001.

11.4 pH.

El promedio de pH en orina de los grupos C fue de 7.42 ± 0.30 , el de los grupos E fue de 5.95 ± 0.19 durante el estudio. Al comparar los valores promedio de los grupos C con los de los grupos E presentaron diferencias significativas con una $p < 0.001$ (Tabla 4, gráfica 4).

pH		
Día	C	E
2	6.97 ± 0.13	5.84 ± 0.11*
10	7.14 ± 0.16	5.92 ± 0.09*
17	7.28 ± 0.12	5.67 ± 0.07*
24	7.09 ± 0.13	5.56 ± 0.07*
31	6.97 ± 0.12	6.13 ± 0.09*
38	7.50 ± 0.15	5.93 ± 0.09*
45	7.43 ± 0.14	5.84 ± 0.09*
52	7.69 ± 0.15	6.16 ± 0.09*
59	7.50 ± 0.13	6.11 ± 0.09*
66	7.64 ± 0.20	6.02 ± 0.12*
73	8 ± 0.31	5.92 ± 0.12*
80	7.70 ± 0.24	6.03 ± 0.12*
87	7.60 ± 0.17	6.29 ± 0.12*

Tabla 4. Ph de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE. C Vs E *p <0.001.



Gráfica 4. pH de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E *p <0.001.

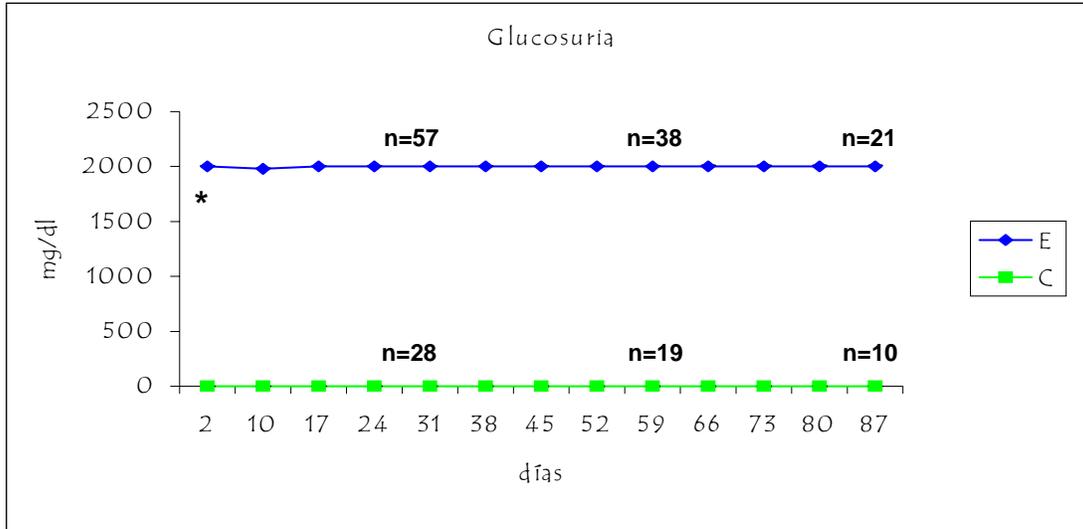
11.5 GLUCOSURIA.

Las ratas de los grupos C no presentaron glucosuria a lo largo del estudio, al comparar los valores de los grupos C con los grupos E se encontraron diferencias significativas con un valor de $p < 0.001$. (Tabla 5, gráfica 5).

Los niveles de glucosa en orina (glucosuria) en las ratas de los grupos E se presentaron a partir del día 2 con un valor promedio de 2000 ± 6.1 mg/dl; estos valores persistieron a lo largo del estudio.

GLUCOSURIA (mg/dl)		
Día	C	E
2	0 ± 0	2000 ± 6.1*
10	0 ± 0	1980 ± 5.6*
17	0 ± 0	2000 ± 5.5*
24	0 ± 0	2000 ± 5.5*
31	0 ± 0	2000 ± 6.6*
38	0 ± 0	2000 ± 6.5*
45	0 ± 0	2000 ± 7*
52	0 ± 0	2000 ± 6.7*
59	0 ± 0	2000 ± 6.6*
66	0 ± 0	2000 ± 8.7*
73	0 ± 0	2000 ± 9.1*
80	0 ± 0	2000 ± 9.1*
87	0 ± 0	2000 ± 8.7*

Tabla 5. Glucosuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE. C Vs E * $p < 0.001$.



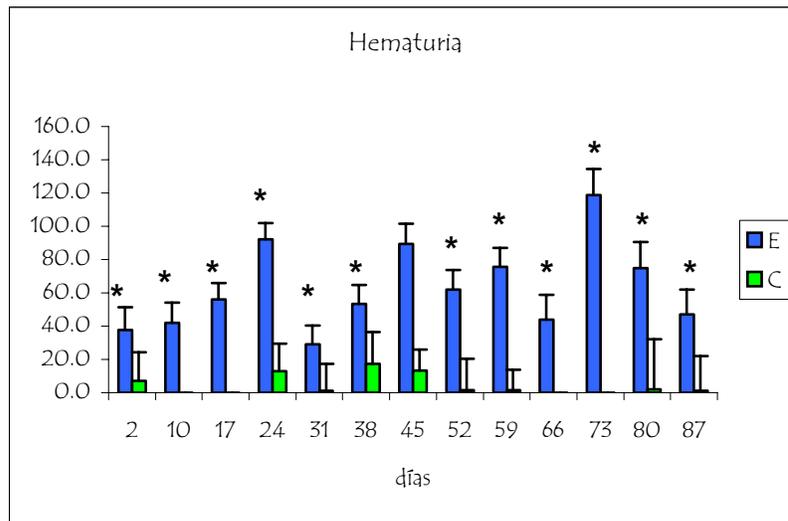
Gráfica 5. Glucosuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio \pm EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E *p <0.001.

11.6 HEMATURIA.

Los niveles promedio de sangre en orina (hematuria) en las ratas de los grupos C fue de 4.4 ± 6.1 durante el estudio, mientras que el promedio de hematuria de las ratas de los grupos E fue de 63.2 ± 25.7 , al comparar los valores de los grupos C y los de los grupos E se encontraron diferencias significativas con un valor de $p < 0.001$. (Tabla 6, gráfica 6).

HEMATURIA		
Día	C	E
2	7.8 ± 17.1	37.8 ± 13.7*
10	0 ± 0	41.8 ± 12.3*
17	0 ± 0	56.3 ± 9.6*
24	12.9 ± 16.6	92.3 ± 9.6*
31	1.11 ± 16.1	28.9 ± 11.4*
38	17.3 ± 19	53.4 ± 11.2*
45	13.3 ± 17.7	89.4 ± 12.1*
52	1.53 ± 19	62 ± 11.6*
59	1.56 ± 17.1	75.6 ± 11.4*
66	0 ± 0	43.80 ± 14.9*
73	0 ± 0	118.8 ± 15.7*
80	2 ± 30	74.7 ± 15.7*
87	1 ± 21	46.9 ± 14.9*

Tabla 6. Hematuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Datos expresados en promedio ± EE. C Vs E *p <0.001.



Gráfica 6. Hematuria de las ratas controles (C) y experimentales (E). Las barras representan el promedio ± EE de cada grupo. Se observaron diferencias significativas a partir del día 2 y hasta el final del estudio. C Vs E *p <0.001.

12. QUÍMICA SANGUÍNEA.

12.1 HEMOGLOBINA GLUCOSILADA.

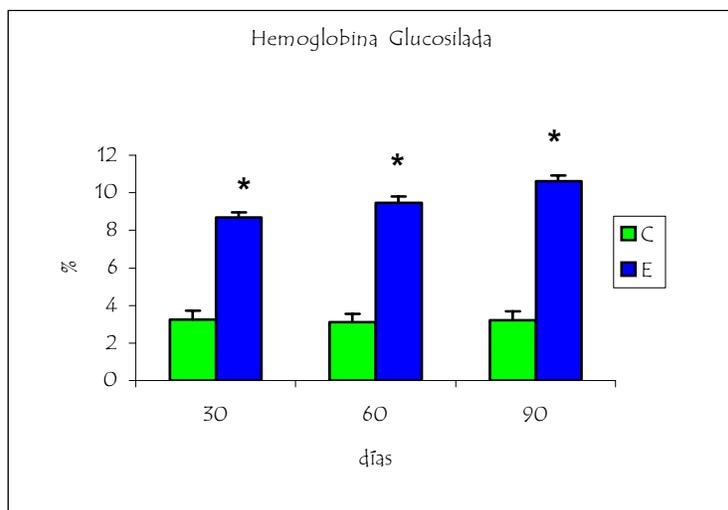
El porcentaje de HbA_{1c} del grupo CI fue de $3.23 \pm 0.498\%$, del grupo CII fue de $3.12 \pm 0.431\%$ y del grupo CIII fue de $3.2 \pm 0.498\%$, mientras que las ratas del grupo EI presentaron $8.7 \pm 0.273\%$, las del grupo EII $9.46 \pm 0.352\%$ y las del grupo EIII $10.6 \pm 0.326\%$; al comparar los promedios los grupo C y E en los tiempos analizados se observaron diferencias significativas (tabla 7, gráfica 7).

Grupo	CI n=9	EI n=19	CII n=9	EII n=17	CIII n=10	EIII n=21
HbA _{1c} (%)	3.23 ± 0.498	$8.7 \pm 0.273^*$	3.12 ± 0.431	$9.46 \pm 0.352^{* **}$	3.2 ± 0.498	$10.6 \pm 0.326^*$
Glucosa (mg/dl)	143.2 ± 23.33	$526.8 \pm 6.05^*$	134.7 ± 23.33	$548.9 \pm 16.97^*$	146.6 ± 22.13	$613.8 \pm 15.27^*$
Insulina (μ UI)	19.06 ± 2.03	$4.12 \pm 1.39^*$	6.77 ± 2.03	$5.96 \pm 1.47_{NS}$	8.94 ± 1.92	$7.70 \pm 1.33_{NS}$

Tabla 7. Parámetros bioquímicos en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Datos expresados en promedio \pm EE.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

CI vs EI * $p < 0.001$. CII vs EII, CIII vs EIII $_{NS} p > 0.05$. EII vs EIII ** $p = 0.03$

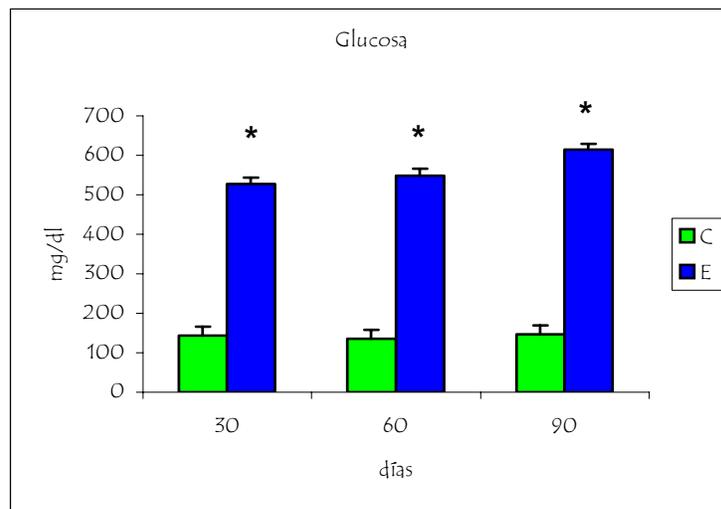


Gráfica 7. Concentración de Hemoglobina glucosilada en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

12.2 GLUCOSA SÉRICA.

El promedio de glucosa sérica que presentó el grupo CI fue de 143.2 ± 23.33 mg/dl, el grupo CII presentó un promedio de 134.7 ± 23.33 mg/dl y el grupo CIII 146.6 ± 22.13 mg/dl. El promedio de glucosa sérica del grupo EI fue de 526.8 ± 6.05 mg/dl, el del grupo EII fue de 548.10 ± 16.97 mg/dl y el grupo EIII 613.8 ± 15.27 mg/dl

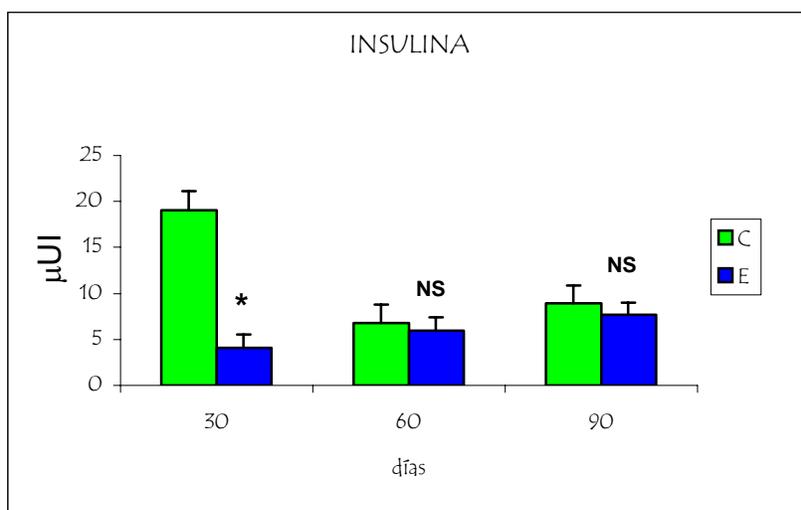
Los valores de glucosa sérica de los grupos E en todos los tiempos analizados fueron significativamente más elevados que los de los grupos C, presentando diferencias significativas con una $p < 0.001$ (tabla 7, gráfica 8)



Gráfica 8. Concentración de Glucosa sérica en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

12.2 INSULINA.

Las ratas del grupo CI presentaron un promedio de insulina de $19.06 \pm 2.023 \mu\text{UI}$, el grupo CII presentó $6.77 \pm 2.03 \mu\text{UI}$, y el grupo CIII presentó $8.94 \pm 1.92 \mu\text{UI}$. Las ratas del grupo EI presentaron un promedio de $4.12 \pm 1.39 \mu\text{UI}$, las ratas del grupo EII presentaron $5.96 \pm 1.47 \mu\text{UI}$, y las ratas del grupo EIII presentaron $7.70 \pm 2.03 \mu\text{UI}$. Al comparar los valores promedios del grupo CI vs EI se encontraron diferencias significativas; al comparar los grupo CII vs EII y CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$ (tabla 7, gráfica 9).



Gráfica 9. Concentración de Insulina sérica en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI * $p < 0.001$. CII vs EII, CIII vs EIII NS $p > 0.05$.

12.4 COLESTEROL.

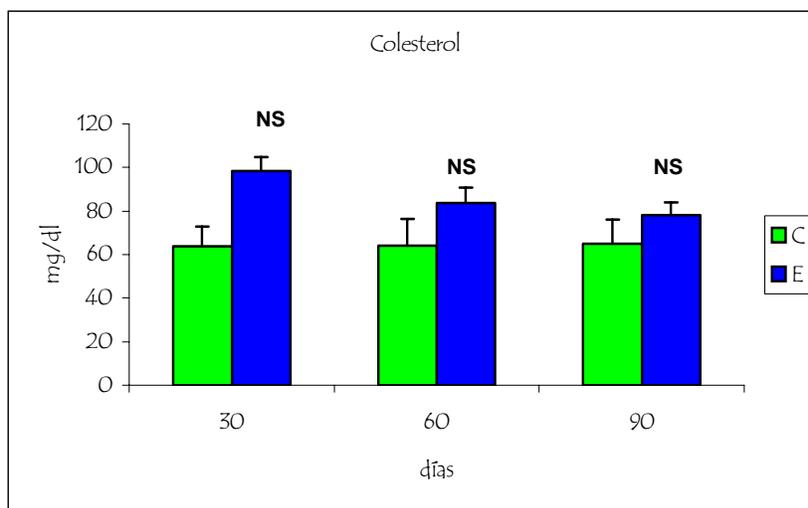
Los valores de colesterol en el grupo CI fueron de 63.77 ± 9.2 mg/dl, del CII fueron de 64 ± 12.34 mg/dl y el grupo CIII fue de 64.83 ± 11.26 mg/dl. Los valores de colesterol del grupo EI fueron de 98.31 ± 6.33 mg/dl, el grupo EII presentó 83.75 ± 6.9 mg/dl, y el grupo EIII fue de 78.04 ± 6.02 mg/dl. Las ratas del grupo EI vs CI, EII vs CII y EIII vs CIII no presentaron diferencias significativas con un valor de $p > 0.05$ (tabla 8, gráfica 10).

Grupo	CI n=9	EI n=19	CII n=9	EII n=17	CIII n=10	EIII n=21
Colesterol (mg/dl)	63.77 ± 9.2	$98.31 \pm 6.33_{NS}$	64 ± 12.34	$83.75 \pm 6.9_{NS}$	64.83 ± 11.26	$78.04 \pm 6.02_{NS}$
Triglicéridos (mg/dl)	108.66 ± 33.50	$208.42 \pm 23.06^*$	74.55 ± 33.50	$246.58 \pm 24.37^*$	84.6 ± 31.78	$318.28 \pm 21.93^*$
VLDL (mg/dl)	21.77 ± 6.69	$41.73 \pm 4.60^*$	14.77 ± 6.69	$49.29 \pm 4.86^*$	16.9 ± 6.34	$63.61 \pm 4.38^*$
Creatinina (mg/dl)	0.443 ± 0.032	$0.559 \pm 0.020_{NS}$	0.538 ± 0.030	$0.519 \pm 0.021_{NS}$	0.500 ± 0.028	$0.385 \pm 0.019_{NS}$
Ácido Úrico (mg/dl)	2.3 ± 0.795	$3.96 \pm .562_{NS}$	1.83 ± 0.795	$1.63 \pm 0.596_{NS}$	1.74 ± 0.754	$0.918 \pm 0.578_{NS}$

Tabla 8. Parámetros bioquímicos en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Datos expresados en promedio \pm EE.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $_{NS}$ $p > 0.05$.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $^*p < 0.001$.



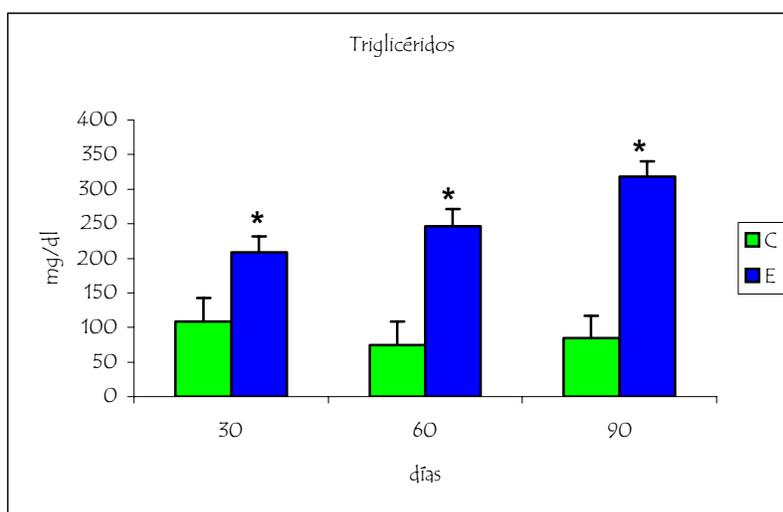
Gráfica 10. Concentración de Colesterol sérico en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $^*p < 0.001$.

12.5 TRIGLICÉRIDOS.

Los niveles de triglicéridos de las ratas del grupo CI fueron de 108.66 ± 33.5 mg/dl, el grupo CII presentó 74.55 ± 33.5 mg/dl y el grupo CIII fue de 84.6 ± 31.78 mg/dl. Los niveles de triglicéridos de las ratas del grupo EI fueron de 208.42 ± 23.06 mg/dl, los del grupo EII fueron de 246.58 ± 24.37 mg/dl, mientras que el grupo EIII presentó 318.28 ± 21.93 mg/dl.

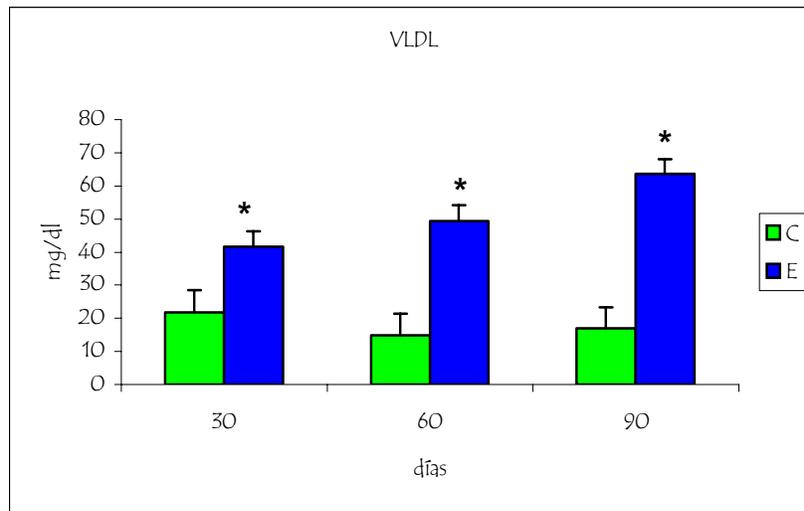
Al comparar los valores de triglicéridos de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 8, gráfica 11).



Gráfica 11. Concentración de Triglicéridos séricos en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

12.6 VLDL (LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD).

Las lipoproteínas de muy baja densidad, se calculan basándose en los niveles de triglicéridos, por que se comportan de manera similar a éstos. Los grupos CI, CII y CIII presentaron 21.77 ± 6.69 mg/dl, 14.77 ± 6.69 mg/dl y 16.9 ± 6.34 mg/dl respectivamente. Mientras que el grupo EI presentó 41.73 ± 4.60 mg/dl, el grupo EII presentó 49.29 ± 4.86 mg/dl, y el grupo EIII presentó 63.61 ± 4.38 mg/dl. Al comparar los valores de grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII presentaron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 8, gráfica 12).



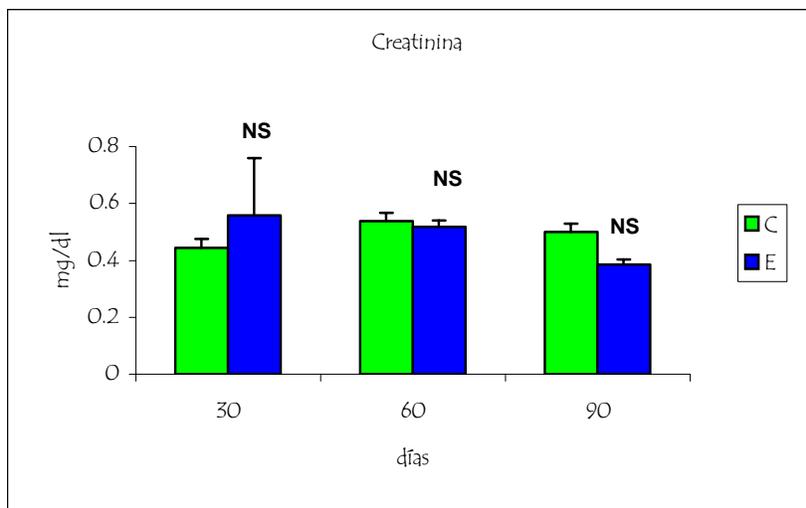
Gráfica 12. Concentración de VLDL sérica en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * p = <0.001.

12.7 CREATININA.

Los niveles de creatinina del grupo CI fueron de 0.443 ± 0.032 mg/dl, los del grupo CII presentaron niveles de 0.538 ± 0.030 mg/dl, el grupo CIII presentó niveles de 0.500 ± 0.028 mg/dl.

Los niveles de creatinina del grupo EI fueron de 0.559 ± 0.020 mg/dl, el grupo EII presentó 0.519 ± 0.021 mg/dl, mientras que el grupo EIII presentó 0.385 ± 0.019 mg/dl.

Al comparar los valores de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$ (tabla 8, gráfica 13).

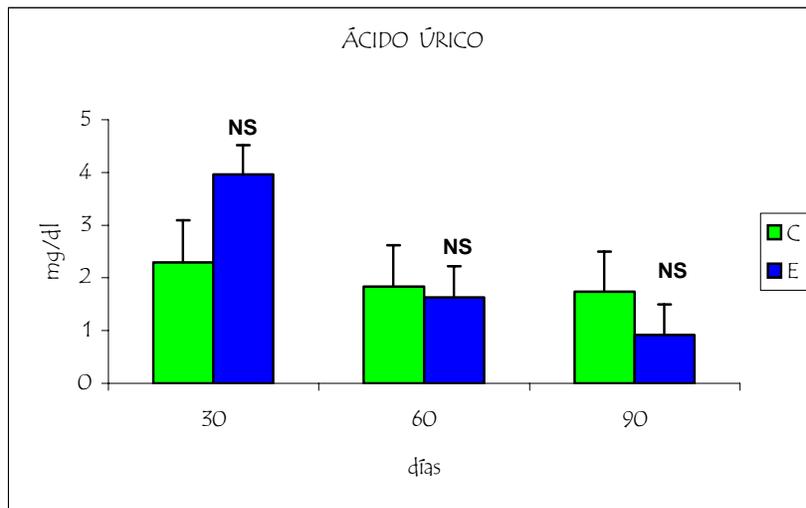


Gráfica 13. Concentración de Creatinina sérico en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $_{NS}$ $p > 0.05$.

12.8 ÁCIDO ÚRICO.

Los niveles de ácido úrico del grupo CI fueron de 2.3 ± 0.795 mg/dl, los del grupo CII fueron de 1.83 ± 0.795 mg/dl, el grupo CIII fueron de 1.74 ± 0.754 mg/dl. Los niveles de ácido úrico del grupo EI fueron de 3.96 ± 0.562 mg/dl, el grupo EII presentó 1.63 ± 0.596 mg/dl, mientras que el grupo EIII presentó 0.918 ± 0.578 mg/dl.

Al comparar los valores de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas (tabla 8, gráfica 14).



Gráfica 14. Concentración de Ácido Úrico sérico en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $_{NS}$ $p > 0.05$.

13. RIÑONES.

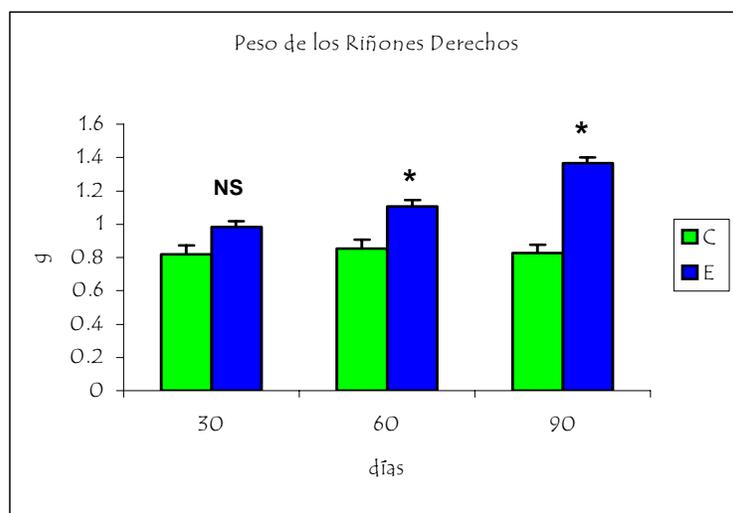
13.1 PESO.

El peso promedio de los riñones derechos e izquierdos es significativamente mayor para los grupos E comparados con los C; $p < 0.001$. El peso de los riñones derechos en el grupo EI fue de $0.983 \pm 0.146g$, el grupo EII presentó $1.108 \pm 0.178g$, el grupo EIII $1.368 \pm 0.215g$. Los grupos CI, CII y CIII presentaron $0.820 \pm 0.095g$, $0.853 \pm 0.067g$ y $0.827 \pm 0.054g$ respectivamente. Al comparar CI vs EI no se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$; al comparar CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas con un valor de $p < 0.001$ (tabla 9, gráfica 15). Los riñones izquierdos presentaron una tendencia similar (tabla 9, gráfica 16).

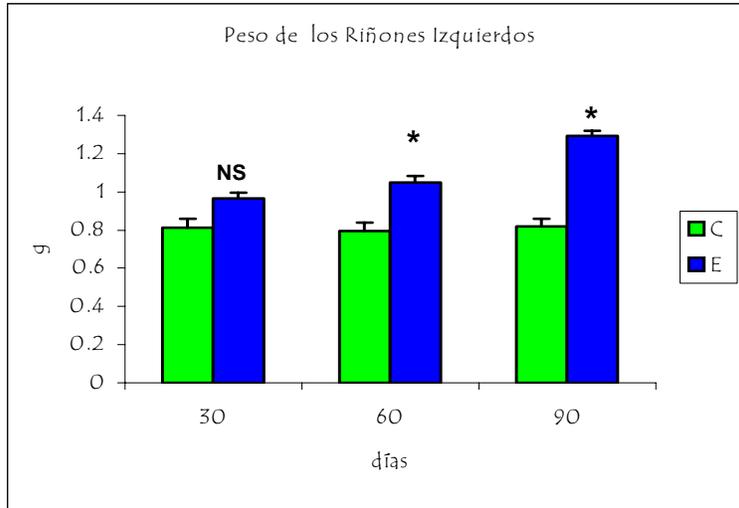
Grupo	CI n=9	EI n=19	CII n=9	EII n=17	CIII n=10	EIII n=21
Peso del Riñón Derecho (g)	0.820 ± 0.095	0.983 ± 0.146 NS	0.853 ± 0.067	1.108 ± 0.178*	0.827 ± 0.054	1.368 ± 0.215*
Largo del Riñón Derecho (mm)	184.02 ± 0.59	184.97 ± 1.06 NS	183.1 ± 2.42	185.87 ± 0.87 NS	183.49 ± 0.53	186.38 ± 1.11 NS
Ancho del Riñón Derecho (mm)	179.76 ± 2.2	179.89 ± 0.73 NS	179.25 ± 0.73	180.26 ± 0.88 NS	178.9 ± 0.29	181.02 ± 0.78 NS
Peso del Riñón Izquierdo (g)	0.813 ± 0.065	0.966 ± 0.106 NS	0.795 ± 0.063	1.05 ± 0.121*	0.817 ± 0.048	1.29 ± 0.203*
Largo del Riñón Izquierdo (mm)	183.68 ± 1.87	185.54 ± 0.595 NS	182.76 ± 2.36	186.34 ± 1.07 NS	184.57 ± 0.39	187.04 ± 1.00 NS
Ancho del Riñón Izquierdo (mm)	178.33 ± 0.694	179.48 ± 0.656 NS	178.33 ± 1.11	180.28 ± 0.598 NS	178.36 ± 0.573	179.58 ± 0.727 NS
Peso del Páncreas (g)	1.212 ± 0.234	0.897 ± 0.235*	1.297 ± 0.265	0.872 ± 0.168*	1.486 ± 0.178	1.072 ± 0.172*

Tabla 9. Datos del riñón en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Datos expresados en promedio ± EE.

CI vs EI **NS** p >0.05. CII vs EII , CIII vs EIII *p<0.001.



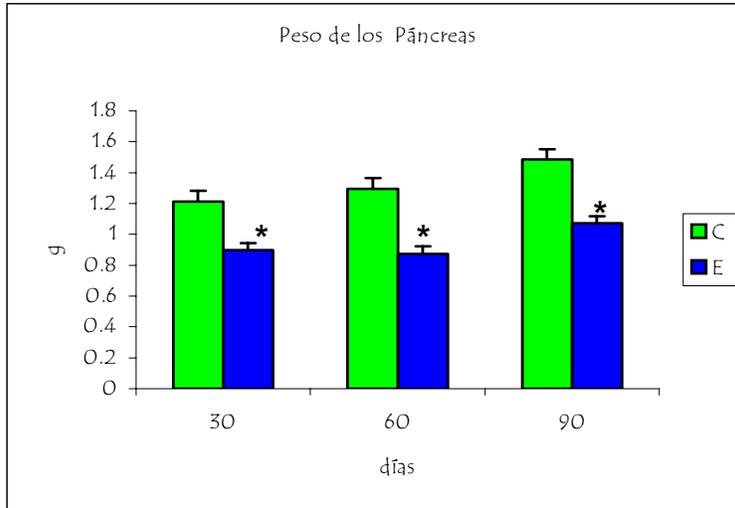
Gráfica 15. Peso de los riñones derechos en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio ± EE de cada grupo. CI vs EI **NS** p >0.05. CII vs EII, CIII vs EIII *p<0.001.



Gráfica 16. Peso de los riñones izquierdos en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI $_{NS}$ $p > 0.05$. CII vs EII, CIII vs EIII $^*p < 0.001$.

14. PÁNCREAS.

El peso promedio de los páncreas fue significativamente mayor para los grupos C comparados con los grupos E, al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII, CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas con una $p < 0.001$ (tabla 9, gráfica 17).



Gráfica 17. Peso del pâncreas en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII, CIII vs EIII * $p < 0.001$.

15 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL RIÑÓN.

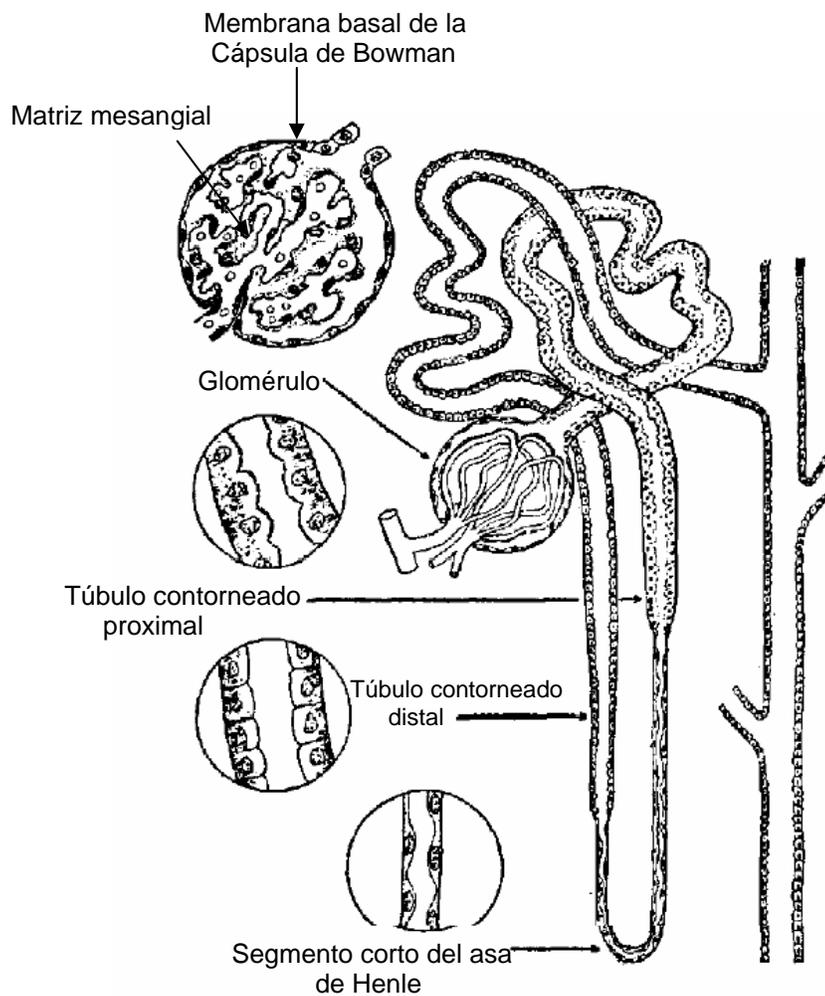


Fig. 10. Diagrama de los componentes del riñón.

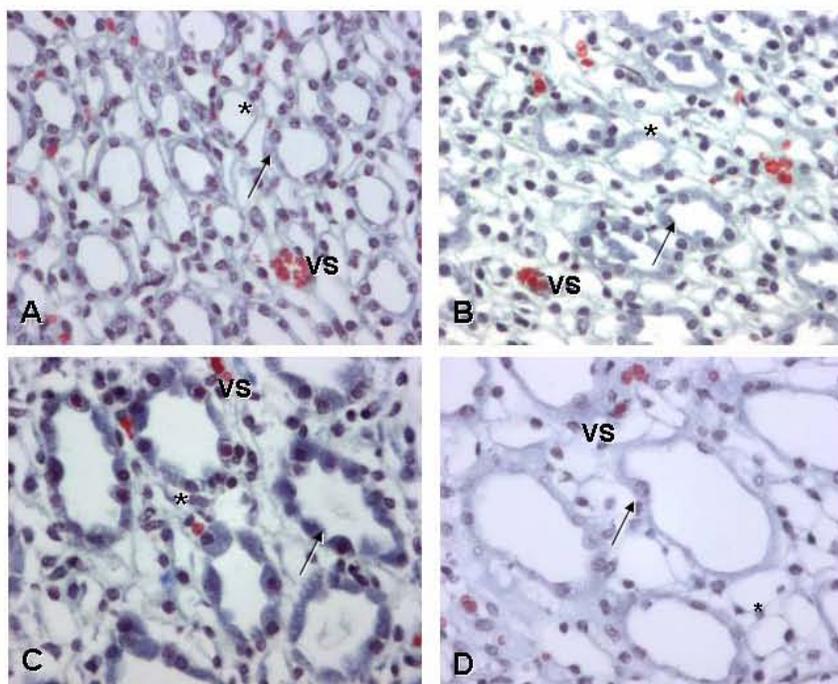
A) MÉDULA.

La médula renal está constituida por un conjunto de conductos colectores que descargan en la pelvis renal.

En los grupos controles la papila renal se encuentra formada por un conjunto de conductos colectores que descargan a la pelvis renal.

Otro componente de la médula renal son las asas de Henle, éstas presentan dos ramas; una ascendente con epitelio cúbico y una descendente con epitelio plano. Entre las asas de Henle y los túbulos colectores pueden observarse vasos sanguíneos de pequeño calibre.

En el grupo E1 la papila renal presenta una morfología normal, similar a la observada en los grupos C1, C2 y C3 (Micrografía 1, A), sin embargo en los grupos E2 y E3 se observó dilatación de los conductos colectores, presentando una mayor dilatación el grupo E3, en ninguno de los grupos E se observaron alteraciones en las asas de Henle (Micrografía 1, B, C, D)



Micrografía 1. Cortes de riñón teñidos con Masson. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo E1 (B), grupo E2 (C), grupo E3 (D). La flecha muestra los conductos colectores, en C y D estos conductos aparecen dilatados. En las asas de Henle (*) no se observaron cambios. VS. vaso sanguíneo

B) CORTEZA.

La corteza renal se encuentra formada por corpúsculos renales y túbulos renales de diversos tipos.

El corpúsculo renal tiene una forma oval está constituido por la cápsula de Bowman, la cual se encuentra formada por un epitelio plano que descansa sobre la membrana basal; el glomérulo está formado por una red de capilares anastomosados que se invaginan en la cápsula de Bowman.

Los corpúsculos renales de la zona cortical del riñón presentan un diámetro menor comparados con los corpúsculos yuxtaglomerulares que se encuentran cercanos a los rayos medulares.

En algunos cortes histológicos de corpúsculos renales se observaron hilios glomerulares, estas estructuras son semejantes a tallos de los cuales penden los corpúsculos renales.

Dentro de la cápsula, el glomérulo está revestido por células epiteliales planas llamadas podocitos y células mesangiales.

Los podocitos presentan un núcleo evidente que puede ser observado con claridad mediante la técnica de Masson, sin embargo a nivel de microscopia de luz no puede observarse su cuerpo celular ni sus procesos llamados "pies".

Las células mesangiales son células que presentan una apariencia ligeramente estrellada, en algunos casos pueden observarse prolongaciones citoplásmicas que se relacionan con las células endoteliales de los capilares sanguíneos, estas células pueden localizarse en todo el corpúsculo renal aunque también pueden observarse células mesangiales extraglomerulares; las cuales se localizan entre la mácula densa y la cápsula de Bowman formando parte de la capa visceral de la cápsula de Bowman.

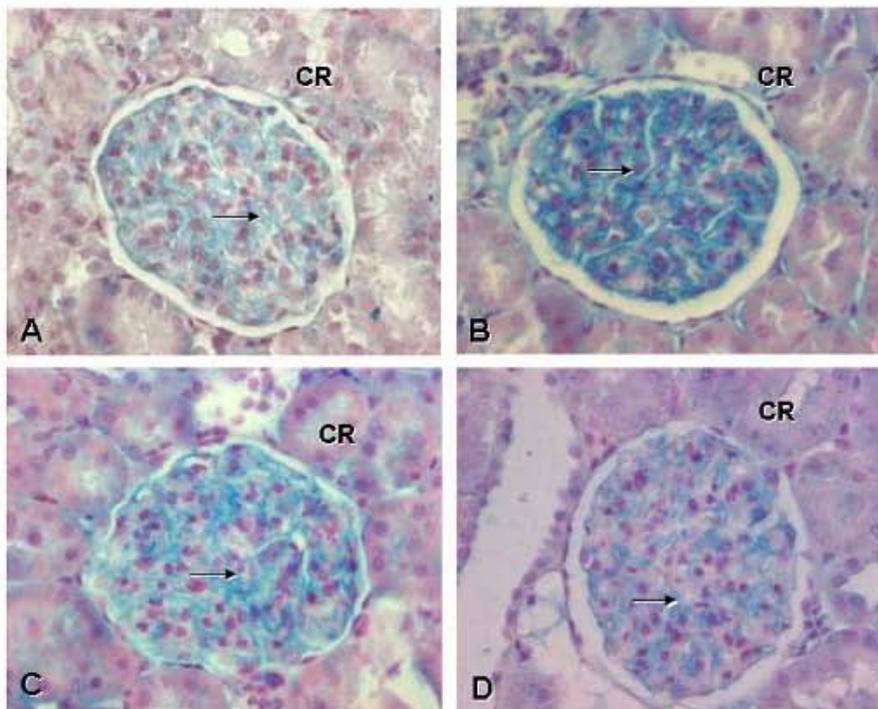
Los capilares del glomérulo se encuentran revestidos de epitelio glomerular y una membrana basal que recibe el nombre de asa capilar.

También pueden observarse células yuxtaglomerulares, células mioepiteliales que reemplazan a las células musculares lisas de un área definida de la pared de la arteriola eferente antes de que entre en la cápsula renal las cuales presentan núcleos alargados, estas células se encuentran en contacto estrecho con la mácula densa.

La mácula densa está formada por un grupo de células columnares delgadas situadas en la pared del túbulo contorneado distal, histológicamente se aprecian como un paquete de núcleos.

El mesangio se encuentra formado una matriz que aparentemente presenta la función de sostén y protección de las células inmersas en él.

En los grupos experimentales el arreglo histológico del riñón es similar al observado en los tres grupos controles en los tiempos analizados. Por medio de la observación con microscopia de luz se estableció que hay aumento en el volumen del corpúsculo renal de la zona cortical comparado con los grupos controles, presentando un mayor volumen los corpúsculos del grupo EIII, aunado a el incremento de la matriz mesangial en los grupos EI y EII (Micrografía 2, B, C) y disminución en el lote EIII (Micrografía 2D).



Micrografía 2. Cortes de riñón teñidos con Hierro Coloidal. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo EI (B), grupo EII (C), grupo EIII (D). Se nota el aumento de volumen del corpúsculo renal (CR) en los grupos experimentales (B,C,D); y el incremento de la matriz mesangial (flecha) en B,C y disminución en D.

TÚBULOS RENALES

Los túbulos renales observados en un corte histológico de la corteza renal son: túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal y túbulos colectores.

En los grupos controles los túbulos contorneados proximales; están situados en la corteza renal, son la porción más larga y tortuosa, revestidos por epitelio cúbico alto con borde en cepillo de microvellosidades apicales. El borde revela la función de reabsorción de sustancias útiles al organismo.

Tanto en los grupos controles como en los experimentales estos túbulos no presentan alteraciones en su morfología. En los grupos experimentales la tinción tricrómica de Masson reveló el engrosamiento de su lámina basal (Micrografía 3, B, C, D).

En los grupos controles y experimentales; los túbulos contorneados distales se encuentran distribuidos en la corteza renal. Presentan epitelio cúbico bajo sin borde en cepillo, por lo tanto tiene una luz mayor, las células epiteliales cúbicas bajas son más pequeñas y el número de secciones es menor porque es más corto.

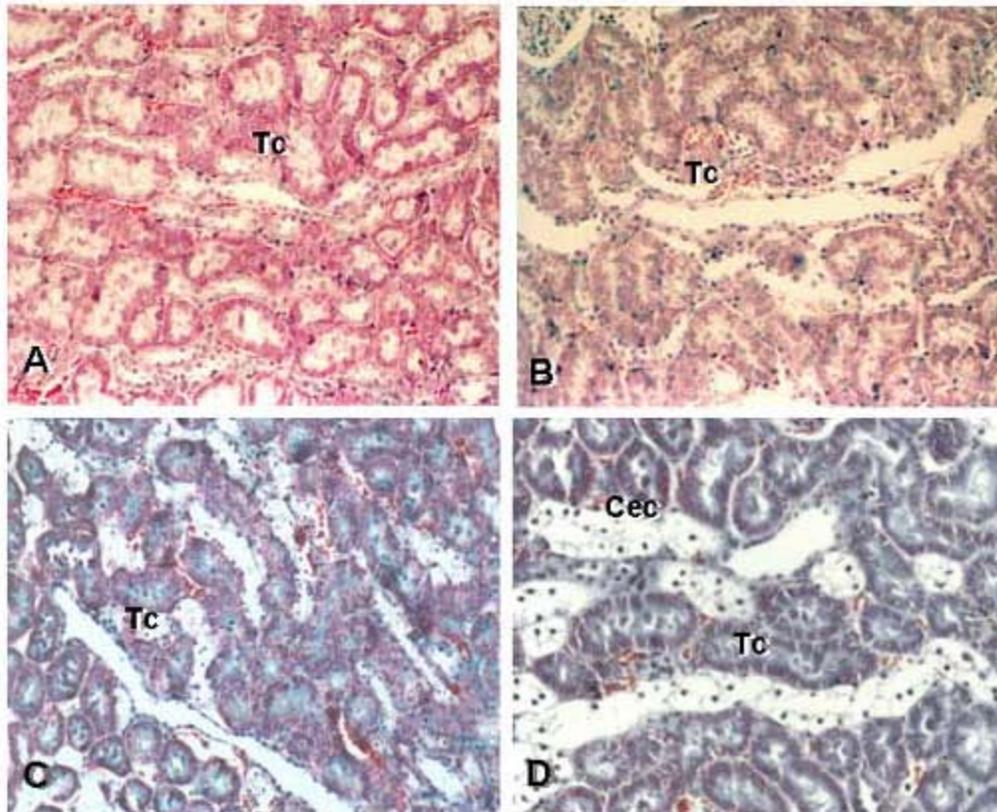
En el grupo EIII las células epiteliales cúbicas presentaron una apariencia pálida y núcleos picnóticos.

El túbulo colector corresponde a la parte terminal del túbulo contorneado distal en la corteza renal y forman los rayos medulares. Poseen un epitelio cúbico, se distinguen de las ramas ascendentes de las asas de Henle por ser más anchos y menos regulares en su diámetro.

En los tres grupos E se observó la dilatación de los túbulos colectores, en el caso del grupo EIII se evidenció el rompimiento y parcial desprendimiento de las células epiteliales.

Tanto en los grupos controles como en los experimentales se observó la presencia de vasos sanguíneos y arteriolas cortadas en diferentes planos.

En la periferia tanto de los túbulos contorneados proximales, distales y colectores se observó fibrosis peritubular en los diferentes tiempos analizados y en el caso del grupo EIII se advirtió infiltración de macrófagos.



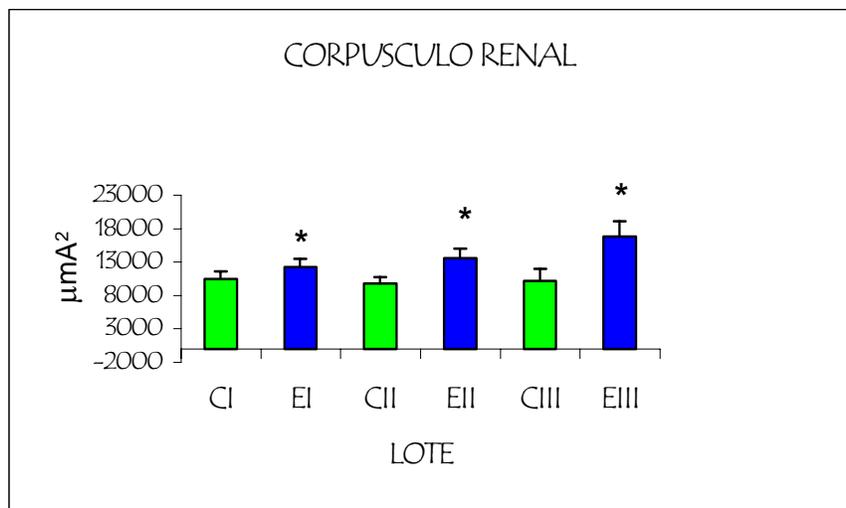
Micrografía 3. Cortes de riñón teñidos con Masson. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo EI (B), grupo EII (C), grupo EIII (D). Se aprecia que en todos los grupos experimentales (B,C,D) los túbulos colectores (Tc); están dilatados, además se observa el desprendimiento de las células epiteliales

16 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

El área del corpúsculo renal de los grupos E es mayor en los tiempos analizados; el área promedio del grupo EI fue de $12230.22 \pm 173.16 \mu\text{m}^2$, el grupo EII fue de $13546.73 \pm 174.20 \mu\text{m}^2$, y para el grupo EIII fue de $16846.91 \pm 167.29 \mu\text{m}^2$, el grupo CI presentó un área promedio de $10465.85 \pm 195.35 \mu\text{m}^2$, para el CII fue de $9801.19 \pm 192.46 \mu\text{m}^2$ y para el CIII fue de $10180.97 \pm 185.75 \mu\text{m}^2$. Al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 10, gráfica 18).

Grupo	CI	EI	CII	EII	CIII	EIII
Corpúsculo Renal (μm^2)	10465.85 ± 195.35	$12230.22 \pm 173.16^*$	9801.19 ± 192.46	$13546.73 \pm 174.20^*$	10180.97 ± 185.75	$16846.91 \pm 167.29^*$
Lobulillo (μm^2)	8052.39 ± 162.7	$9487.13 \pm 144.22^*$	7421.45 ± 160.29	$10267.06 \pm 145.08^*$	7641.12 ± 154.7	$12108.82 \pm 139.32^*$
# Núcleos	63 ± 1.92	$70 \pm 1.92^*$	66 ± 1.92	$79 \pm 1.92^*$	64 ± 1.92	$78 \pm 1.92^*$
MBG (μm^2)	0.864 ± 0.03	$1.368 \pm 0.03^*$	0.907 ± 0.03	$1.318 \pm 0.03^*$	0.836 ± 0.03	$1.212 \pm 0.03^*$
Celularidad A^2	1169.02 ± 54.25	$1366.9 \pm 54.25^*$	1256.81 ± 54.25	$1766.2 \pm 54.25^*$	1330.64 ± 54.25	$1433.8 \pm 54.25^*$
Matriz Mesangial A^2	5679.93 ± 233.22	$6310.03 \pm 233.22^*$	5196.6 ± 233.22	$7412.38 \pm 233.22^*$	5289.4 ± 233.22	$6894.58 \pm 233.22^*$

Tabla 10. Análisis morfométrico en los glomérulos de ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Datos expresados en promedio \pm EE. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

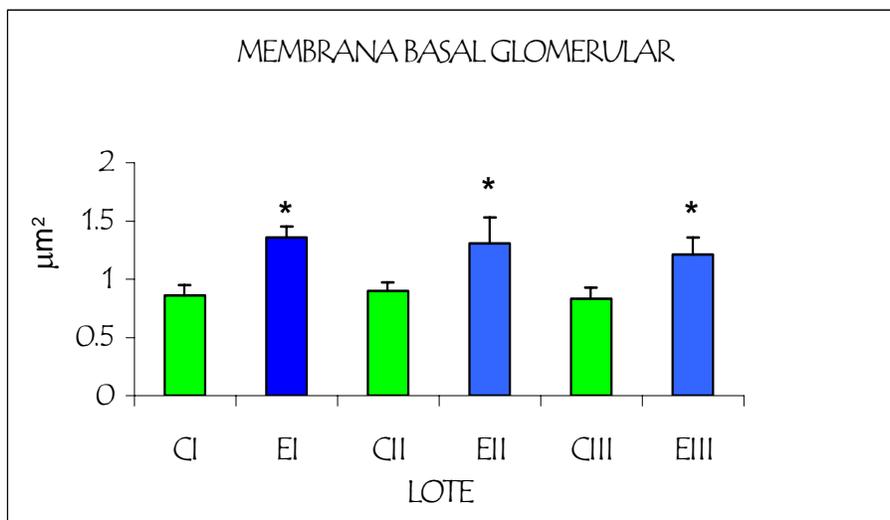


Gráfica 18. Área del corpúsculo renal en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII, CIII vs EIII * $p < 0.001$.

El área promedio del lobulillo renal de los grupos E es mayor en los tiempos analizados; mientras que los grupos C tienen un área promedio similar. Al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 10).

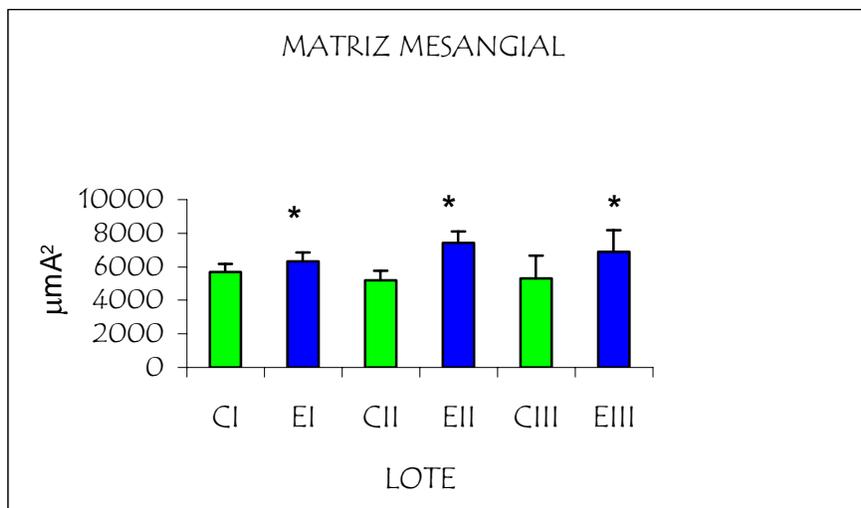
El número de núcleos en los grupos E se incrementa en los tiempos analizados; el grupo EI presentó un promedio de 70 ± 1.92 , el grupo EII 79 ± 1.92 y el grupo EIII 78 ± 1.92 . El grupo CI presentó un promedio de núcleos de 63 ± 1.92 , el CII 66 ± 1.92 y el CIII 64 ± 1.92 . Al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 10).

El grosor de la membrana basal glomerular (MBG) se incrementa en los grupos E, presentando un valor promedio de $1.368 \pm 0.03 \mu\text{m}$ en el grupo EI, en el grupo EII fue de $1.318 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y en el EIII disminuye con un valor de $1.212 \pm 0.03 \mu\text{m}$. Los grupos CI, CII y CIII presentaron un promedio de $0.864 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $0.907 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y $0.836 \pm 0.03 \mu\text{m}$ respectivamente. Al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 10, gráfica 19).



Gráfica 19. Membrana basal glomerular en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII, CIII vs EIII * $p < 0.001$.

El área ocupada por la matriz mesangial aumenta en los grupos E; el promedio del grupo EI fue de $6310.03 \pm 233.22 \mu m^2$, el grupo EII fue de $7412.38 \pm 233.22 \mu m^2$, y para el grupo EIII fue de $6894.58 \pm 233.22 \mu m^2$, los grupos CI presentaron un área promedio de $5679.93 \pm 233.22 \mu m^2$, para el CII fue de $5196.6 \pm 233.22 \mu m^2$ y para el CIII fue de $5289.4 \pm 233.22 \mu m^2$. Al comparar los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 10, gráfica 20).



Gráfica 20. Área de la matriz mesangial en ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Cada barra representa el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII, CIII vs EIII * $p < 0.001$.

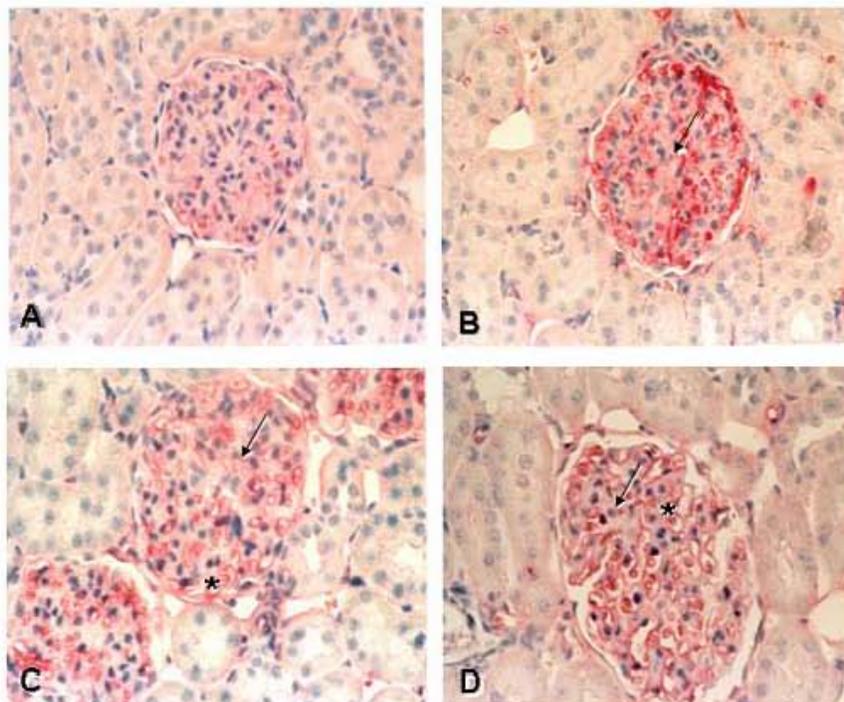
17 INMUNOHISTOQUÍMICA.

Fibronectina (fb).

En los grupos controles la inmunotinción para fibronectina fue detectada en la médula renal, en las láminas basales de los túbulos colectores y asas de Henle, en los grupos experimentales la reacción aumenta siendo más intensa en el grupo EIII.

En la corteza renal se observó una distribución homogénea en la matriz mesangial, y lámina basal de la cápsula de Bowman; en los grupos experimentales se conservó la distribución pero aumentó la cantidad, presentando un gran aumento en los grupos EII y EIII. En los grupos EII y EIII se logra evidenciar una intensa reacción en la membrana basal de los capilares sanguíneos (Micrografía 4C, D; tabla 11).

La fibronectina se localizó en las láminas basales de los túbulos proximales, distales y colectores de los grupos C y E, en los tres grupos controles no se apreció diferencia en su distribución; en los grupos E se conserva la distribución pero aumenta la cantidad (Micrografía 4B, C, D; tabla 8).

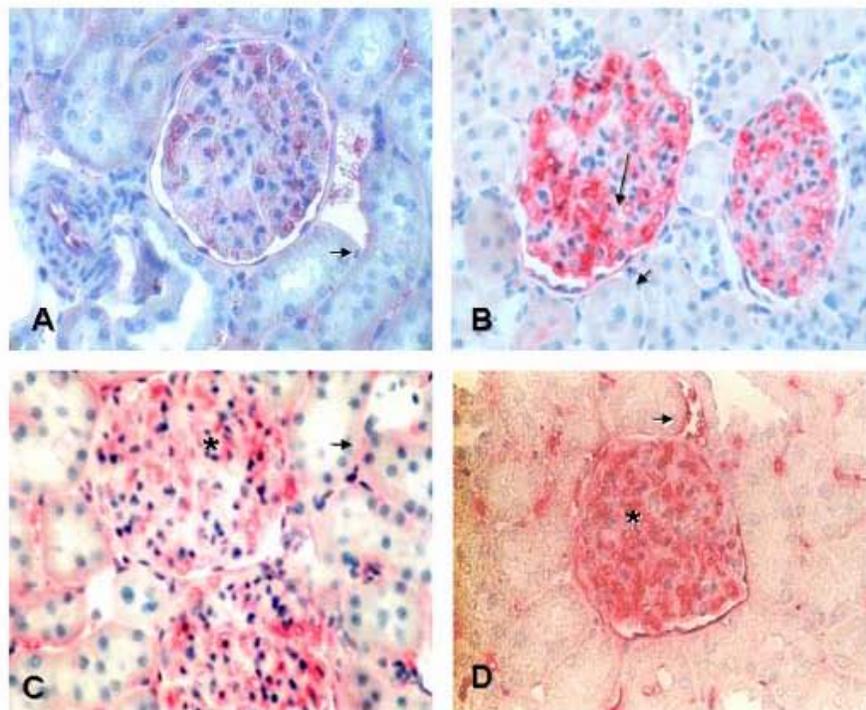


Micrografía 4. Inmunohistoquímica indirecta del anti-fibronectina revelado con fosfatasa alcalina, contrastado con hematoxilina. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo EI (B), grupo EII (C), grupo EIII (D). Se nota el incremento de la fibronectina en la matriz mesangial (flecha) en la membrana basal glomerular (*) de los grupos experimentales (B,C,D).

LAMININA (Im).

La laminina se presentó en los grupos controles en las láminas basales de los túbulos colectores y asas de Henle, mientras que en la corteza se observó una distribución homogénea en la matriz mesangial, las asas capilares y la membrana basal de la cápsula de Bowman, así como en la membrana basal glomerular. En los grupos experimentales la distribución es similar pero más intensa que en los grupos controles (Micrografía 5, tabla 11).

La laminina también se localizó en las láminas basales de los túbulos proximales, distales y colectores; con un incremento en los grupos experimentales (Micrografía 5, tabla 8).

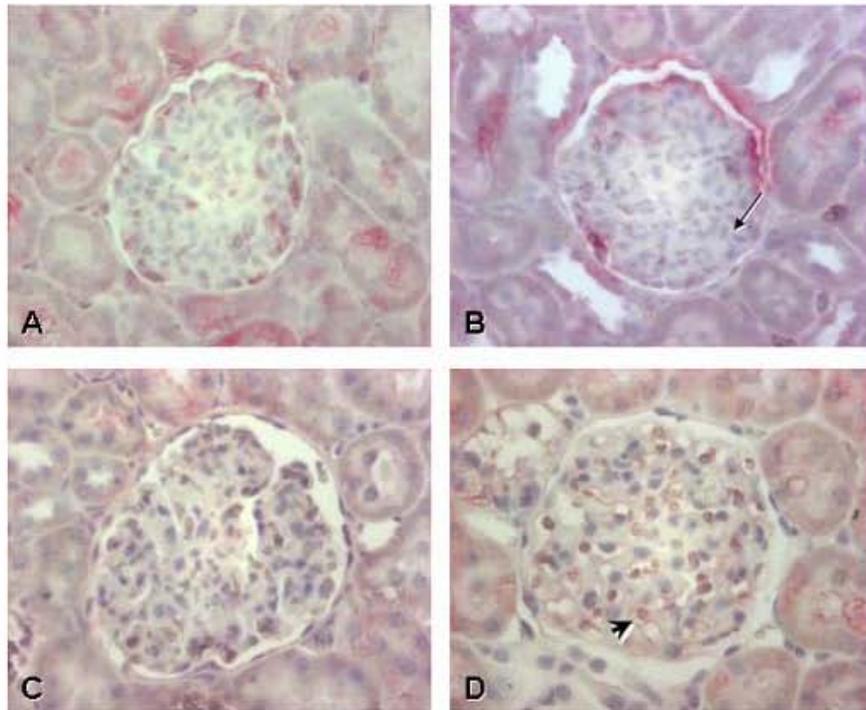


Micrografía 5. Inmunohistoquímica indirecta del anti-laminina AB-1 revelado con fosfatasa alcalina, contrastado con hematoxilina. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo EI (B), grupo EII (C), grupo EIII (D). Se observa el incremento de la anti-laminina en la matriz mesangial (*), membrana basal glomerular (flecha) y tubular (punta de flecha) de todos los grupos experimentales.

COLAGENA IV (col IV).

En la médula la inmunotinción para colágena IV es débil, en la corteza renal la colágena IV en los grupos controles, se observó en las laminas basales de los túbulos colectores y túbulos proximales, sin una presencia aparente en el mesangio. En los grupos experimentales se conservó la misma distribución pero aumentó la cantidad en el grupo E1 y disminuyó en los grupos EII y EIII (Micrografía 6, tabla 11).

El grupo E1 mostró un elevado aumento en la intensidad de la reacción en la membrana basal de la cápsula de Bowman comparado con los grupos controles y los grupos EII y EIII. La colágena IV disminuye en los grupos EII y EIII (Micrografía 6, tabla 11).



Micrografía 6. Inmunohistoquímica indirecta del anticógeno tipo IV revelado con fosfatasa alcalina, contrastado con hematoxilina. 100X. Micrografía representativa grupo control (A), grupo E1 (B), grupo EII (C), grupo EIII (D). Se observa la presencia del anticuerpo colágena tipo IV en la membrana basal de la cápsula de Bowman (flecha) del grupo E1 y su disminución en EII y EIII.

Grupo	Fibronectina		Laminina		Colágena IV	
	Glomérulo	Túbulos	Glomérulo	Túbulos	Glomérulo	Túbulos
CI	++	+	+	+	++	+/-
EI	+++	++	++	++	++	+/-
CII	++	+	+	+	++	+/-
EII	++++	++	+++	++++	+	+/-
CIII	++	+	+	++	++	+/-
EIII	++++	++	++++	++++	+/-	+/-

Tabla 11. Inmunotinción relativa de fibronectina, laminina AB-1 y colágena tipo IV en el glomérulo y túbulos renales.

Inmunotinción: +++ muy fuerte; ++ fuerte; + moderado; +/- áreas positivas y negativas presentes; - negativo.

18 MICROSCOPIA CONFOCAL.

Por medio de microscopia confocal, se observó la distribución en el glomérulo de las glucoproteínas de matriz: fibronectina, laminina AB-1 y colágena tipo IV.

Glomérulo: Los tres antígenos fueron observados en la periferia de la membrana basal glomerular y matriz mesangial, sin embargo con diferentes intensidades.

En el caso de la fibronectina, las estructuras extraglomerulares fueron menos reactivas que el glomérulo; siendo más intensa en el mesangio y en la membrana basal de los capilares (Micrografía 7).

La inmunotinción para laminina fue más intensa en la membrana basal glomerular, aunque también fue observada en las regiones periféricas de los capilares glomerulares y el mesangio, siendo menor en estos sitios (Micrografía 8).

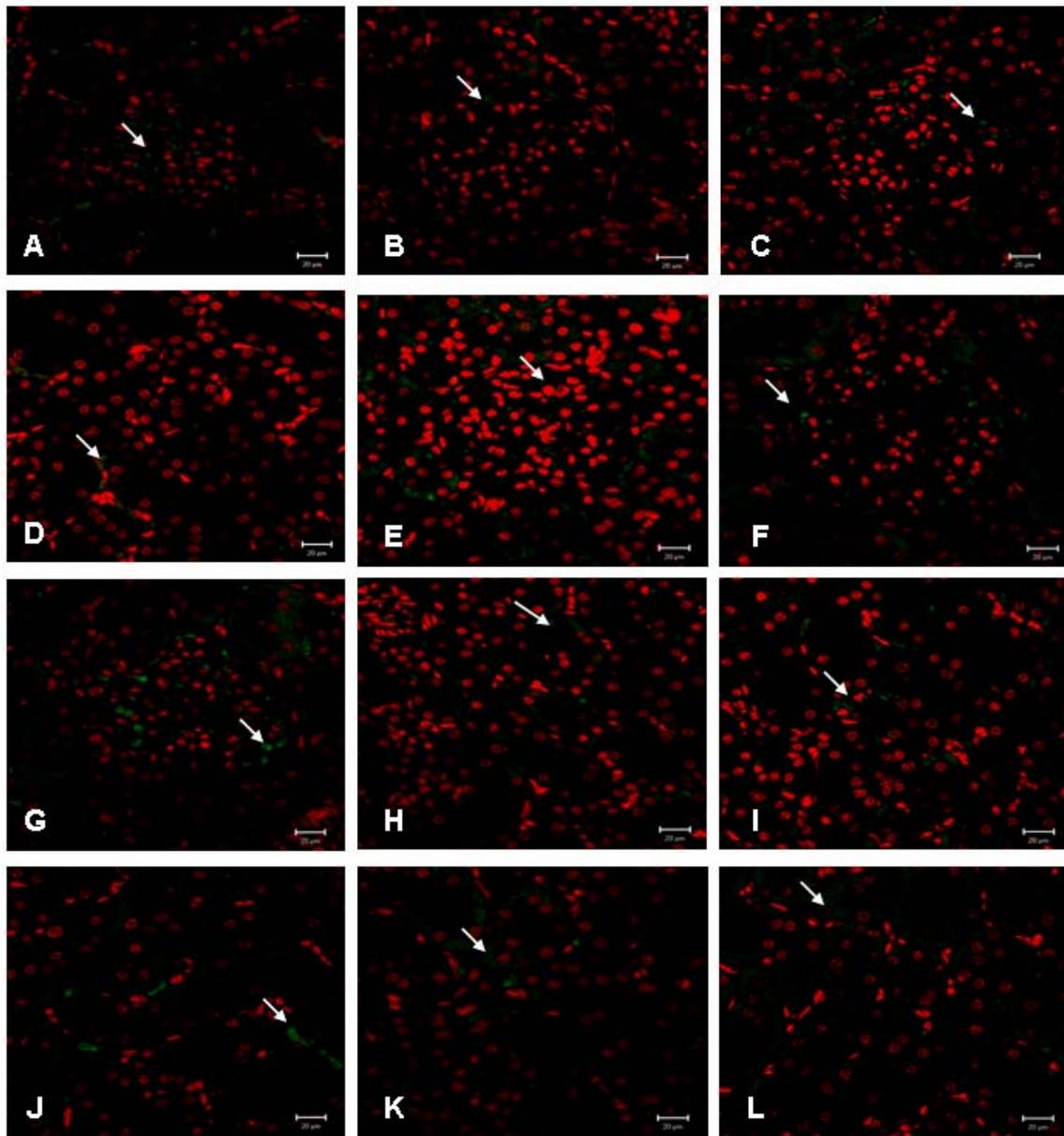
La membrana basal de la cápsula de Bowman mostró una ligera inmunotinción a laminina, incrementándose en los grupos EI, EII y EIII (Micrografía 8).

En las estructuras extraglomerulares los tres antígenos fueron detectados en la membrana basal de los túbulos y en las paredes arteriolares.

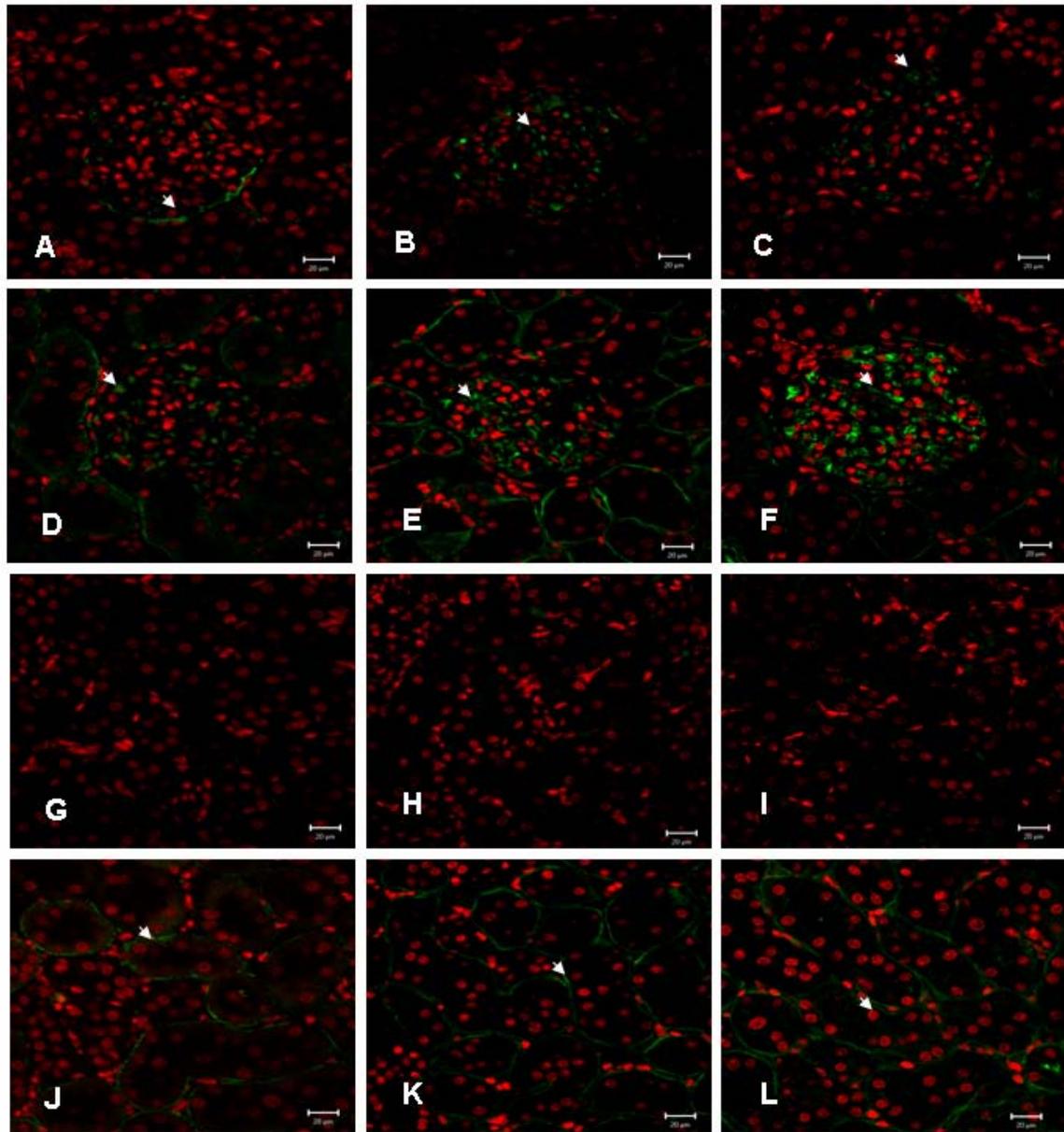
La inmunotinción para laminina fue mucho más intensa en las estructuras extraglomerulares que en el glomérulo, en donde la intensidad del antígeno incrementa en la lámina basal de los túbulos proximales en los grupos EII y EIII. En la cápsula de Bowman se observó una intensidad moderada (Micrografía 8).

En el caso de la colágena tipo IV se observó una fuerte intensidad en el mesangio y en la membrana basal glomerular de los grupos EI y EII, disminuyendo en el grupo EIII (Micrografía 9).

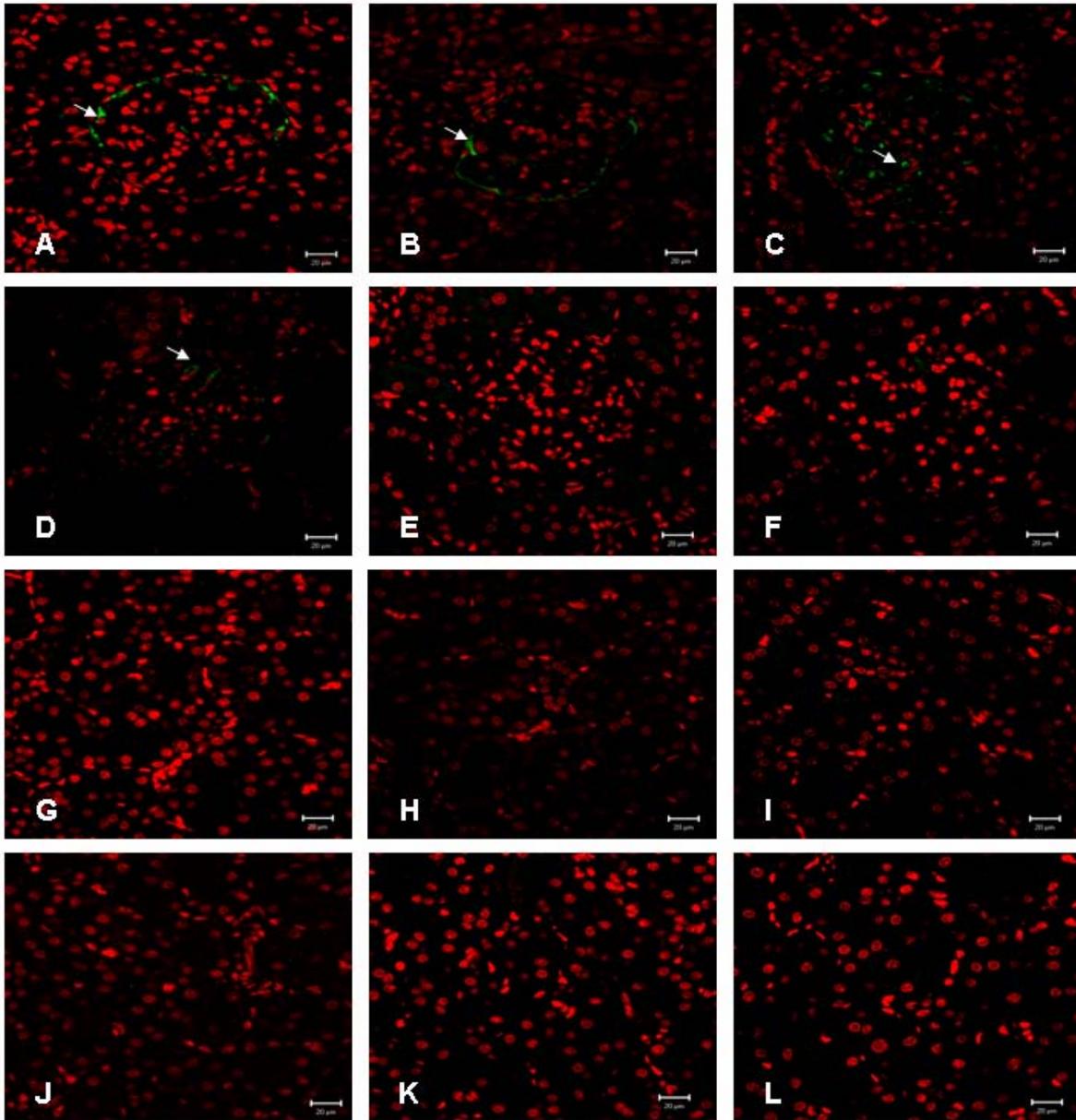
La inmunoreactividad para colágena tipo IV presentó una intensidad equivalente en el glomérulo y en las estructuras extraglomerulares. En contraste la inmunotinción de laminina fue intensa en las membranas basales tubulares (Micrografía 9).



Micrografía 7. Distribución de fibronectina detectada con inmunofluorescencia en el glomérulo de ratas de los grupos control I, II, III (figura A,B,C respectivamente) y grupos experimentales I, II, III (D,E,F). Las flechas en A,B,D,E señalan la matriz mesangial, en C,F la membrana basal de la cápsula de Bowman. En G,H,I se muestran los túbulos renales de los grupos controles (I, II, III respectivamente) y los grupos experimentales (J,K,H). Las flechas en G,H,I,J,K,L señalan una ligera inmunotinción en la membrana basal tubular.



Micrografía 8. Distribución de laminina AB-1 detectada con inmunofluorescencia en el glomérulo de ratas de los grupos control I, II, III (figura A,B,C respectivamente) y grupos experimentales I, II, III. Las flechas en A,D señalan la membrana basal de la cápsula de Bowman, en B,C,E,F la matriz mesangial. En G,H,I se muestran los túbulos renales de los grupos controles (I, II, III respectivamente) y los grupos experimentales (J,K,H). Las flechas en J,K,H señalan la membrana basal tubular.



Micrografía 9. Distribución de colágeno tipo IV detectada con inmunofluorescencia en el glomérulo de ratas de los grupos control I, II, III (figura A,B,C respectivamente) y grupos experimentales I, II, III. Las flechas en A,B señalan la membrana basal de la cápsula de Bowman, en C,D la matriz mesangial. En G,H,I se muestran los túbulos renales de los grupos controles (I, II, III respectivamente) y los grupos experimentales (J,K,H). En G,H,I,J,K,L la colágeno no fue detectada.

19 ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE LA INMUNOFLUORESCENCIA.

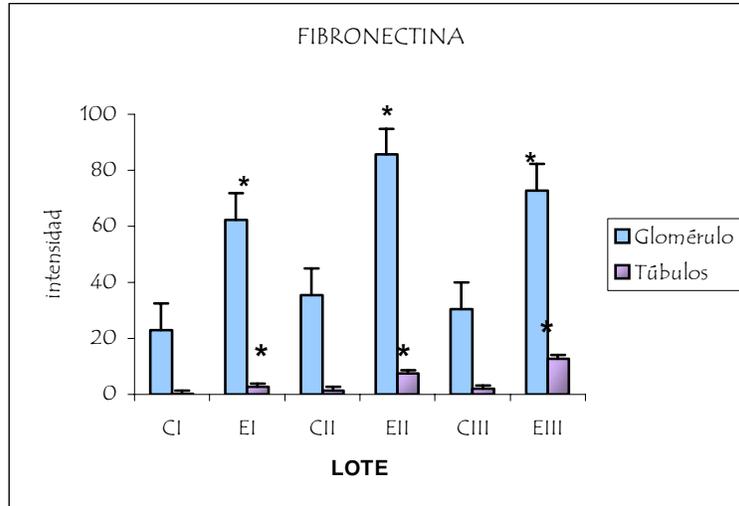
La intensidad de fibronectina (fb) en los glomérulos y los túbulos examinados aumenta durante el estudio, presentando un valor promedio de intensidad del anticuerpo en los glomérulos de 62.26 ± 9.52 en el grupo EI y la intensidad en los túbulos fue de 2.70 ± 1.23 , en el grupo EII la intensidad promedio del anticuerpo en el glomérulo fue de 85.69 ± 9.22 y en el caso de los túbulos fue de 7.47 ± 1.23 y en el grupo EIII la intensidad del anticuerpo en los glomérulos fue de 72.85 ± 9.52 y en el caso de los túbulos fue de 12.82 ± 1.23 . El grupo CI presentó un promedio de intensidad de 23 ± 9.52 en los glomérulos y en los túbulos fue de 0.21 ± 1.23 , el grupo CII presentó 35.37 ± 9.52 y en los túbulos la intensidad fue de 1.41 ± 1.23 , el CIII presentó un promedio de 30.38 ± 9.52 y el promedio de intensidad de los túbulos fue de 2.04 ± 1.23 . Al comparar los promedios de intensidad del anticuerpo en los glomérulos y túbulos en los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 12, gráfica 21).

Grupo	CI	EI	CII	EII	CIII	EIII
Glomérulo fb	$23 \pm 9.52^*$	62.26 ± 9.52	$35.37 \pm 9.52^*$	85.69 ± 9.22	$30.38 \pm 9.52^*$	72.85 ± 9.52
Túbulos fb	$0.21 \pm 1.23^*$	2.70 ± 1.23	$1.41 \pm 1.25^*$	7.47 ± 1.23	$2.04 \pm 1.23^*$	12.82 ± 1.23
Glomérulo Im	4.14 ± 1.35 NS	4.12 ± 1.51	10.88 ± 1.35 NS	11.09 ± 1.35	10 ± 1.31 NS	14.18 ± 1.35
Túbulos Im	$3.66 \pm 1.54^*$	15.7 ± 1.57	$4.77 \pm 1.57^*$	16.69 ± 1.57	$4.14 \pm 1.52^*$	14.57 ± 1.52
Glomérulo col IV	3.31 ± 0.65 NS	5.28 ± 0.65	2.91 ± 0.70 NS	1.14 ± 0.65	$.876 \pm 0.67$ NS	$.147 \pm 0.65$
Túbulos col IV	$2.32 \pm 0.38^*$	1.36 ± 0.38	$3.53 \pm 0.36^*$	$.968 \pm 0.37$	$3.36 \pm 0.38^*$	$.404 \pm 0.36$

Tabla 12. Intensidad de los anticuerpos en el glomérulo y túbulos renales de ratas controles a los 30 (CI), 60 (CII) y 90 días (CIII); y ratas diabéticas a los 30 (EI), 60 (EII) y 90 días (EIII). Datos expresados en promedio \pm EE.

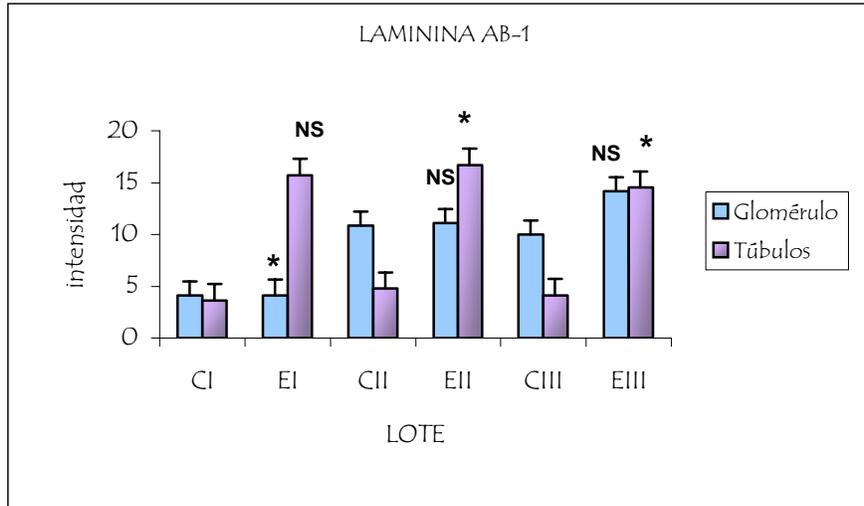
CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p = < 0.001$.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII ns $p > 0.05$



Gráfica 21. Intensidad de fibronectina de las ratas controles (C) y experimentales (E). Las barras representan el promedio \pm EE de cada grupo. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$. CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

La intensidad de la laminina AB-1 (Im) en los túbulos examinados progresa mientras avanza la ND; mientras que en el glomérulo presenta una intensidad muy semejante. El valor promedio de intensidad del anticuerpo en los glomérulos del grupo EI fue de 4.12 ± 1.51 y la intensidad en los túbulos fue de 15.7 ± 1.57 , en el grupo EII la intensidad promedio del anticuerpo fue de 11.09 ± 1.35 y en el caso de los túbulos fue de 16.69 ± 1.57 y en el grupo EIII presentó un valor de 14.18 ± 1.35 y en el caso de los túbulos fue de 14.57 ± 1.52 , en el caso del grupo CI presentó un promedio de intensidad de 4.14 ± 1.35 en los glomérulos y en los túbulos fue de 3.66 ± 1.54 , el grupo CII presentó 10.88 ± 1.35 y en los túbulos la intensidad fue de 4.77 ± 1.57 , el CIII presentó un promedio de 10 ± 1.31 y el promedio de intensidad de los túbulos fue de 4.14 ± 1.52 . Al comparar los promedios de intensidad del anticuerpo en los glomérulos de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas con una $p > 0.05$ mientras que al comparar la intensidad del anticuerpo en los túbulos de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 12, gráfica 22).

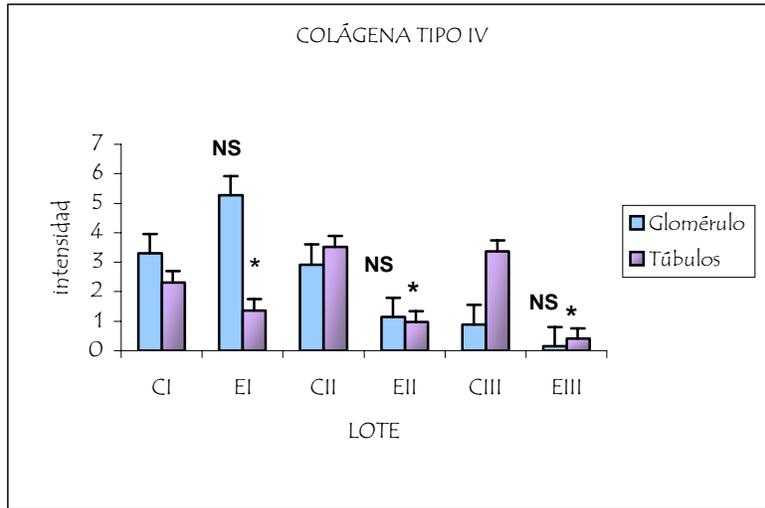


Gráfica 22. Intensidad de laminina AB-1 en los glomérulos y túbulos renales de las ratas controles (C) y experimentales (E). Las barras representan el promedio \pm EE de cada grupo.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII $_{NS}$ $p > 0.05$.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

La intensidad de colágena IV (Col IV) en los glomérulos del grupo EI fue de 5.28 ± 0.65 y la intensidad en los túbulos fue de 1.36 ± 0.38 , en el grupo EII la intensidad promedio del anticuerpo fue de 1.14 ± 0.65 y en el caso de los túbulos fue de 0.968 ± 0.37 y en el grupo EIII presentó un valor promedio de 0.147 ± 0.65 y en el caso de los túbulos fue de 0.404 ± 0.36 . El grupo CI presentó una intensidad promedio de 3.31 ± 0.65 en los glomérulos y en los túbulos fue de 2.32 ± 0.38 , el grupo CII presentó 2.91 ± 0.70 y en los túbulos la intensidad fue de 3.53 ± 0.36 , el grupo CIII presentó una intensidad promedio de 0.876 ± 0.67 y la intensidad promedio de los túbulos fue de 3.36 ± 0.38 . Al comparar los promedios de intensidad del anticuerpo en los glomérulos de los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII no se encontraron diferencias significativas con una $p > 0.05$, mientras que al comparar la intensidad del anticuerpo en los túbulos en los grupos CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII se encontraron diferencias significativas $p < 0.001$ (tabla 12, gráfica 23).



Gráfica 23. Intensidad de colágena tipo IV en los glomérulos y túbulos renales de las ratas controles (C) y experimentales (E). Las barras representan el promedio \pm EE de cada grupo.

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII NS $p > 0.05$

CI vs EI, CII vs EII y CIII vs EIII * $p < 0.001$.

20 DISCUSIÓN.

Los modelos animales que se utilizan para el estudio de la diabetes experimental nos permiten conocer y analizar la evolución de la enfermedad e investigar los mecanismos mediante los cuales se desarrollan sus complicaciones. En este estudio el uso de STZ para inducir diabetes en ratas de la cepa Sprague- Dawley nos permitió analizar diferentes aspectos de las etapas tempranas de la nefropatía diabética.

Se ha demostrado en diferentes modelos animales que la STZ es uno de los agentes más eficaces en la inducción de la diabetes (181, 183,204). Su eficacia depende del modelo animal, y la dosis empleada para lograr establecer un estado permanente de hiperglucemia (181,183).

En diferentes estudios, utilizando dosis desde los 25 hasta los 100 mg/kg de STZ se ha comprobado que existen efectos diabetogénicos que varían en intensidad y en la aparición de las complicaciones (183). Las dosis más utilizadas en rata son las de 45 a 70 mg/kg de peso. Las dosis de 30 y 40 mg/kg de peso producen una elevación de los niveles de glucosa, pero este efecto se pierde 10 días después y los niveles tienden a normalizarse (183,205).

La dosis de 50mg/kg de peso utilizada en este trabajo produjo un estado permanente de hiperglucemia que permitió realizar el análisis de las etapas tempranas de la nefropatía diabética.

Se ha planteado que el mecanismo de acción inicial de la STZ para inducir la diabetes es la destrucción de las células β del páncreas lo que promueve un descenso en la concentración de insulina que produce una hiperglucemia que puede tener como resultado un efecto letal sobre los animales durante las primeras 48 horas de la inducción. Los animales que sobreviven adquieren un estado de hiperglucemia a largo plazo, presentándose las complicaciones propias de la diabetes (181, 183, 204,205).

En nuestro estudio en los grupos experimentales los niveles de glucosa se elevaron a las 48 horas posteriores a la inyección de STZ, y se mantuvieron con valores superiores a los 400 mg/dl a lo largo de todo el estudio, lo cual confirma el efecto permanente de la inducción de la diabetes.

En pacientes diabéticos mal controlados la disminución en el peso corporal es debida a la demanda del organismo por glucosa; la cual es incapaz de metabolizar debido al mal funcionamiento de la insulina a nivel de receptores y su señalización, por lo que son utilizadas las reservas de glucosa que se encuentran en el hígado y tejido muscular con la finalidad de compensar los requerimientos de glucosa del organismo. La pérdida de peso se ha asociado con la severidad de la diabetes, existen reportes de ratas inyectadas con 55 mg/kg de peso y 65 mg/kg de peso, que describen que estas ratas son incapaces de aumentar de peso (181, 206, 207,208).

En este estudio las ratas de los grupos CI, CII y CIII aumentaron constantemente de peso a lo largo del estudio, presentando una diferencia significativa con los grupos EI, EII y EIII; los cuales no incrementaron su peso a lo largo del estudio.

En condiciones normales la glucosa se filtra libremente en el glomérulo y es absorbida activamente en el túbulo proximal. La absorción es limitada, siendo el límite máximo, el umbral de glucosa renal, que está excedido cuando la concentración de glucosa en sangre es en promedio >180 mg/100ml (10 mmol/L). La glucosuria se presenta cuando los niveles de glucosa en sangre exceden los 180 mg/100ml a partir de estos valores las concentraciones de glucosa en orina son proporcionales a la hiperglucemia (6). En nuestro estudio la glucosuria se detectó a partir del día dos y persistió hasta el final del estudio con niveles promedio de 2000 mg/dl.

Entre las complicaciones que han sido descritas en los estudios sobre diabetes experimental se encuentra la cetonuria, la que también se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo de las crías de madre diabética. La cetonuria es el reflejo de la disminución de insulina, la reducción de la disponibilidad tisular de glucosa y el consecuente aumento de la lipólisis al interior de las células, lo que provoca una sobreproducción de cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato, el ácido acetoacético y la acetona, que el hígado es incapaz de metabolizar por lo que son excretados en la orina. La consecuencia de la carencia de glucosa tisular lleva a un incremento de la glucogenólisis en el hígado, lo que se refleja en una mayor hiperglucemia (209).

En este estudio no se presentaron cetonas ni en los grupos controles ni en los experimentales.

La cetoacidosis es una complicación aguda que pueden presentar los pacientes diabéticos. Es un trastorno metabólico causado por la deficiencia de insulina que provoca hiperglucemia, hipercetonemia, acidosis metabólica y alteraciones hidroelectrolíticas, durante la cetoacidosis diabética el pH es < 7.3 , y la glucemia se sitúa por arriba de 250mg/100ml, según el estado de deshidratación y la acidosis. Los valores normales de pH en ratas de la cepa Sprague-Dawley son de 6.7 ± 0.4 . En este estudio los grupos CI, CII, CIII presentaron un pH promedio de 7.42 y en los grupos EI, EII, EIII fue de 5.95.

La hematuria es una manifestación frecuente de enfermedad nefro-urológica y se ve precedida únicamente por infección urinaria, puede tener su origen en el glomérulo, los túbulos renales, el intersticio renal o en cualquier punto de la vía urinaria desde los cálices y la pelvis renal hasta la uretra, lo cual refleja un daño en la membrana basal glomerular (MBG) conocida como hematuria glomerular, en la cual no se ha reportado infiltración de leucocitos.

No existe acuerdo sobre la definición de hematuria, ya que depende del método de laboratorio utilizado. En personas sanas la orina contiene < 5 hematíes/campo. En la práctica, se acepta que la observación de "trazas o indicios" de sangre mediante tira reactiva en una muestra urinaria aislada no debe considerarse

anormal. Como método químico su sensibilidad es muy alta permitiendo detectar concentraciones de Hb a partir de 0,02 mg/dl, equivalentes a 3-5 hematíes/campo. En nuestro estudio el promedio de hematuria para los grupos C fue de 4.4 mientras que en los grupos E se presentó una elevación considerable con un promedio de 63.2. Los valores presentados en el grupo E reflejan un daño estructural de la membrana basal glomerular, los valores de los grupos C se encuentran dentro de los valores normales.

La proteinuria es una manifestación clínica de nefropatía que demuestra la pérdida de selectividad y carga de la membrana basal glomerular, una vez determinada en humanos persiste con valores de >500 mg/día. En condiciones normales tanto en humanos como en ratas no debe existir indicios de proteínas en orina.

En el presente estudio los niveles de proteinuria fueron determinados con tiras reactivas, los niveles de proteinuria incrementaron progresivamente en las ratas diabéticas de los grupos EI, EII y EIII a partir del día 2 presentando su valor máximo el día 73 con un promedio de 44 mg/dl. Sanai y colaboradores, determinaron los niveles de proteinuria (mg/24h) a través del método de Biuret en ratas con diabetes inducida con una dosis de 60 mg/kg, y reportan proteinuria a partir del día 7 con un promedio de 52.8 ± 9.5 mg, a los 30 días presentaron 83.3 ± 21.4 mg, a los 60 días 124.4 ± 28 mg y a los 90 días 179.0 ± 22 mg (207).

La falta casi absoluta de insulina, que provoca la diabetes mellitus induce un aumento en la lipólisis y en consecuencia en los niveles de ácidos grasos libres, los cuales son oxidados en el hígado, incrementando la producción de cuerpos cetónicos, cetonuria y en el último de los casos acidosis (\downarrow pH) (209). Sin embargo en este estudio este efecto no se observó debido a que la dosis de STZ utilizada no es cetogénica. Los niveles de insulina de las ratas del grupo EI presentaron niveles significativamente menores que los presentados por el grupo CI, sin embargo los grupos CII, CIII, EII y EIII no presentaron diferencias en los niveles de insulina.

Virtualmente toda la hemoglobina en circulación está contenida en el eritrocito, el cual tienen un promedio de vida de 120 días, durante la vida del eritrocito y debido a la permeabilidad de su membrana a la glucosa, la hemoglobina se incuba con la glucosa sanguínea. Como esta sustancia es reactiva, el resultado es la glucosilación de los sitios receptivos de los aminoácidos (6). La glucosilación de la hemoglobina forma HbA_{1C}, la cual ha sido descrita como un producto Amadori, pero no como un producto final de la glucosilación avanzada (PFGA). La hemoglobina glucosilada es un indicador de la glucemia y refleja la concentración promedio de la glucosa de 6 a 12 semanas precedentes a su toma (28). En este estudio los niveles de HbA_{1C} en los grupos CI, CII y CIII fueron en promedio de 3.2% mientras que en los grupos EI, EII, EIII fueron en promedio de 9.56%, lo cual indica hiperglucemia persistente.

Las alteraciones en las concentraciones de lípidos plasmáticos en los pacientes con diabetes son de gran importancia debido al papel que juega la insulina en el metabolismo de los mismos. Dichas alteraciones se presentan más frecuentemente cuando la diabetes está descontrolada.

El colesterol es un constituyente importante de las membranas celulares, además de ser precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroides. Los triglicéridos son los principales depósitos de energía y son altamente eficientes como fuente de energía. Los fosfolípidos son similares en estructura a los triglicéridos y también son importantes componentes estructurales de las membranas celulares y de las lipoproteínas.

Existen estudios controversiales tanto en ratas como en humanos diabéticos en donde las concentraciones de colesterol plasmático se encuentran elevadas, no se presentan o se encuentran disminuidas. En nuestro estudio las ratas presentaron aumentos mínimos en la concentración plasmática de colesterol. Los niveles de colesterol que presentaron las ratas de los grupos EI, EII y EIII no fueron diferentes de los presentados por las ratas de los grupos CI, CII y CIII.

Los niveles de triglicéridos y VLDL mostraron un incremento significativo en las ratas de los grupos experimentales EI, EII y EIII, al compararlas con los grupos CI, CII y CIII se observaron diferencias significativas. Este parámetro suele estar alterado en ratas diabéticas, y la correlación de hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipoinsulinemia puede predecir el desarrollo de complicaciones.

La función renal es una de las afectadas en la diabetes mellitus; la tasa de filtración glomerular (TFG) es considerada como el mejor marcador de la función renal, y el ácido úrico y la creatinina séricos son algunos de los parámetros bioquímicos utilizados para estimarla.

La creatinina sérica puede ser detectada en individuos con daño temprano del glomérulo, mientras que el aumento en los niveles del ácido úrico puede predecir la insuficiencia renal crónica. Sin embargo trabajos recientes han documentado el uso de la Cistatina C como un mejor marcador para evaluar la TFG (210).

En este trabajo no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de ácido úrico y creatinina en los grupos E comparados con los grupos controles, lo cual concuerda con los hallazgos de Sanai y colaboradores, quienes encontraron que los niveles de creatinina S, en ratas con diabetes inducida con una dosis de 60mg/kg, no son diferentes a los presentados por el grupo control, presentando un promedio de 42.2 ± 8.9 el día 7, a los 30 días presentaron 40.6 ± 4.3 , a los 60 días 32.0 ± 2 y a los 90 días 42 ± 2 (207). Los resultados obtenidos indican que no hay alteraciones en la tasa de filtración glomerular.

La nefropatía diabética provoca hipertrofia de los riñones lo cual incrementa su peso. En este estudio el peso de los riñones se incrementó en los grupos E 19.85%, 29.95 y 64.19% a los 30, 60 días y 90 días respectivamente comparados con los grupos C los cuales no incrementaron su peso a lo largo del estudio. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Seyer-Hansen, quien reporta que el peso de los riñones de ratas con diabetes inducida por STZ se incrementa 60 horas después de la aparición de hiperglucemia o glucosuria. En su estudio reporta un incremento en el peso de los riñones del 15 a 20% tres días

después de la administración de la STZ y de 70 a 90% después de 6 semanas (161). Sin embargo, en los estudios realizados por Obiniche y colaboradores, se reporta que el incremento en el peso de los riñones de ratas con diabetes inducida con STZ; después de 8 meses fue de 30% comparado con los controles (174).

Las alteraciones estructurales en la matriz mesangial, la hipertrofia de elementos glomerulares, así como el aumento de componentes de matriz extracelular han contribuido al entendimiento de la progresión de la nefropatía diabética.

La hiperglucemia induce en el riñón la aparición de los cambios hemodinámicos, que afectan principalmente la vasodilatación de arteriolas eferentes que promueven la hiperfunción y la hiperfiltración. Después de este estadio temprano, se presentan cambios estructurales en el glomérulo, túbulos e intersticio renal (13, 93, 139, 140, 163,207).

Obiniche y colaboradores, al analizar con microscopía de luz los riñones de ratas con diabetes después de 4 semanas de la inducción, reportaron dilatación de túbulos en la corteza renal con un aumento significativo en la destrucción de los túbulos contorneados distales; la microscopía electrónica reveló un espectro de daños que incluyen a la membrana basal, pérdida de procesos de interdigitación de los podocitos, la ruptura de túbulos basales y sus mitocondrias y fibrosis en los túbulos después de 8 meses. Ellos concluyen que la hipertrofia renal persiste después de una prolongada ocurrencia de diabetes con un extenso daño y pérdida de tejido renal incluyendo la pérdida de los procesos de podocitos y que estos daños son responsables de la presentación clínica de la nefropatía diabética (174) estos datos coinciden con los encontrados en este estudio.

Los cambios en la morfología tubular glomerular han sido reportados como un factor importante en el desarrollo de la nefropatía diabética (211).

En nuestro estudio se encontraron alteraciones morfológicas en la corteza renal de los riñones de ratas diabéticas a partir de los 30 días (grupo EI) y persistieron en los grupo EII y EII (60 y 90 días respectivamente). El análisis morfológico de los riñones reveló dilatación de los túbulos colectores y túbulos proximales en los 3 grupos E, así como fibrosis peritubular. En el grupo EIII se presentó ruptura de los túbulos, con la presencia de núcleos pálidos en las células epiteliales; además en el grupo EIII se observó infiltración de macrófagos. Los túbulos distales tanto en los grupos C como en los grupo E no presentaron alteraciones en su morfología.

Mediante el análisis morfométrico se corroboró en los grupos E el aumento del volumen glomerular y de la matriz mesangial; así como el engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG).

En nuestro estudio la matriz mesangial se tiñó intensamente con Hierro Coloidal sugiriendo un incremento en la cantidad de glucosaminoglicanos en los lotes EI y EII, y disminución en el lote EIII. Estudios previos han demostrado que en la nefropatía diabética la expresión de glucosaminoglicanos de la membrana basal glomerular está reducida lo cual se correlaciona con el grado de proteinuria. En nuestro estudio los niveles mas altos de proteinuria se encontraron en el lote EIII y esto podría en parte explicar la disminución de glucosaminoglicanos a los 90 días.

La membrana basal y la matriz extracelular están formadas por diferentes macromoléculas organizadas mediante arreglos físicos, cargas iónicas, enlaces químicos y uniones biomecánicas. Estas matrices forman un gel y una estructura de soporte o andamio constituido de fibras elásticas, proteínas adhesivas y glucoproteínas estructurales, que mantienen comunicación célula-célula y matriz extracelular-tejido vascular a través de la familia de las integrinas (212).

Estudios realizados en humanos para detectar y localizar inmunohistoquímicamente componentes de matriz extracelular, principalmente de colágena del tipo I, II, IV y V, fibronectina, laminina y heparan sulfato, proveen evidencias sobre los patrones de cambios en la matriz glomerular (13).

Courtoy y colaboradores, reportaron la distribución normal de macromoléculas de matriz extracelular: laminina, colágena tipo IV y fibronectina en la MBG y el mesangio en el glomérulo de rata, mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Ellos reportan que estos tres antígenos para las moléculas se localizan preferentemente en la membrana basal glomerular. La laminina se encontró en la MBG, concentrada en la lámina rara; la colágena tipo IV en la lámina densa y en la matriz mesangial, mientras que la fibronectina se encontró en la matriz mesangial y la periferia de la MBG (213). En nuestro estudio este patrón es muy similar al observado con técnicas inmunohistoquímicas en los glomérulos de las ratas de los grupos CI, CII, CIII.

Los niveles de RNAm que codifican para la cadena $\alpha 1$ de la colágena IV, fibronectina, laminina B1 y B2 se encuentran incrementados en los glomérulos aislados de ratas diabéticas. Estos hallazgos indican que la diabetes estimula la síntesis de colágena tipo IV y otras moléculas de matriz extracelular (incluidas fibronectina y laminina) en la corteza del riñón y se encuentra vinculado a un incremento en los niveles de RNAm que codifican para estas moléculas (214).

Se ha reportado que la colágena tipo IV cadena α -1 está presente en el mesangio normal y que se incrementa durante la ND (214, 215). En la MBG normal está presente la cadena α -3, α -4 e incrementa durante la ND, mientras que las cadenas α -1 y α -2, disminuyen en la ND (216).

En este estudio se determinó la distribución de fibronectina, laminina AB-1 y colágena tipo IV en la corteza del riñón de ratas con diabetes inducida con STZ utilizando inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos indican que los tres componentes de matriz se distribuyeron de manera particular en el glomérulo renal.

La colágena tipo IV mostró una señal intensa en la membrana basal de la cápsula de Bowman del grupo EI y disminución en los grupos EI y EIII.

La laminina se encuentra presente en el mesangio normal, se ha reportado un aumento de esta proteína en lesiones de expansión mesangial difusa (217), mientras que en la MBG se sabe que es un componente normal y que incrementa en etapas tempranas de ND y finalmente disminuye (218).

En el mesangio normal se encuentran presentes la fibronectina y que durante la ND incrementa su producción (219).

En nuestro estudio la inmunotinción de laminina AB-1 fue intensa en las membranas basales: glomerular, tubular, y la cápsula de Bowman; mientras que la distribución de fibronectina fue evidente en las membranas basales de las células endoteliales, mesangiales, pericitos, la cápsula de Bowman y la matriz mesangial.

La laminina AB-1 y fibronectina comparten su distribución en la matriz mesangial, mientras que la colágena se distribuyó en la periferia de la MBG y disminuyó en la matriz mesangial. Nuestros resultados coinciden con los reportados por otros autores, quienes consideran que estas alteraciones indican alteraciones en la arquitectura macromolecular de la membrana basal y que son responsables de los defectos en la filtración y oclusión glomerular (212, 214,215).

La acumulación de matriz extracelular se considera como uno de los mecanismos centrales para explicar la falla glomerular, además, se ha establecido que la disminución en la degradación de las moléculas de matriz extracelular favorece su acumulación y por lo tanto la progresión de la falla renal.

21 CONCLUSIONES.

En este estudio se corroboró que la nefropatía diabética provoca hipertrofia renal que se ve reflejada como un aumento en el peso de los riñones en los grupos experimentales.

El análisis morfológico de los riñones reveló dilatación de los túbulos colectores (tc) y túbulos proximales (tp) en los 3 lotes E, así como fibrosis peritubular en los lotes EII y EIII. Los túbulos distales en los lotes C y E presentaron una morfología normal. Mediante el análisis morfométrico se evidencio en los lotes E aumento del volumen glomerular y de la matriz mesangial; así como engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG).

La laminina AB-1 y fibronectina conservaron su distribución normal en la matriz mesangial y lámina basal de la membrana basal glomerular, con un aumento en los grupos E.

La colágena IV conservó su distribución en la membrana de la cápsula de Bowman, aumentó a los 30 días y disminuyó a los 60 y 90 días en ratas diabéticas.

Estos cambios estructurales en la morfología renal y la alteración en la cantidad de componentes de matriz extracelular contribuyen al deterioro progresivo de la función renal en la nefropatía diabética.

22 BIBLIOGRAFÍA.

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care*.1998; 21 (9):1414-1431.
2. Informe de la OMS, 1999 (http://www.who.int/ncd/dia/nl_no3.htm).
3. Landeros OEA. El panorama epidemiológico de la diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica*. 2000; 8 (1-4): 56-59
4. Boletín semanal de vigilancia epidemiológica. IMSS. Octubre 2002.Vol. II, semana 42.
5. Islas AS, Revilla MC. Diabetes Mellitus: Concepto y nueva clasificación. En *Diabetes Mellitus*. Tercera edición Mc Graw-Hill Interamericana. 2005: 3-20.
6. Revilla MC, Islas AS. Diabetes Mellitus: El laboratorio clínico y su utilidad en el paciente con diabetes mellitus. En *Diabetes Mellitus*. Tercera edición Mc Graw-Hill Interamericana. 2005: 223-245.
7. Fernández MC. Biología molecular de la diabetes mellitus. *Revista de Endocrinología y Nutrición*.1996; 4 (3) julio-septiembre: 15-21.
8. Castro M, Liceaga C. Complicaciones agudas de la diabetes mellitus. En *DIABETES MELLITUS*. Tercera edición. McGraw- Hill Interamericana. 2005 : 255-272.
9. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem*. 1981; 50: 385-427.
10. Cullen MT, Reece EA, Homko CJ, Sivan E. The changing presentations of diabetic ketoacidosis during pregnancy. *Am Journal Perinatol* .1996; 13 (7): 449-451.
11. Islas AS. Complicaciones crónicas. Introducción. En *diabetes mellitus*. Tercera edición. McGraw- Hill Interamericana. 2005: 287-289.
12. Arenas R, Arce M, Campos P. Alteraciones cutáneas en la diabetes mellitus. En *diabetes mellitus*. Tercera edición. McGraw- Hill Interamericana. 2005: 290-308.
13. Vázquez VB, Meza M. Nefropatía Diabética. En *Diabetes Mellitus*. Tercera edición Mc Graw-Hill Interamericana. 2005: 330-347.
14. Correa RR, Cortés PM. Nefropatía diabética: ¿es posible prevenirla o retrasar su progresión? . *Rev Inv Clin*. 2001; 53 (6): 502-504.
15. Barceló A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull World Health Organ*. 2003; 81 (1):19-27.
16. Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS. Mechanism of proteinuria in diabetic nephropathy: a study of glomerular barrier function. *Kidney Int*. 1982; 21 (4) : 633-641.
17. Viberti G, Keen H. The patterns of proteinuria in diabetes mellitus. Relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1984; 33 (7): 686-692.

18. Partasarathy N, Spiro RG. Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane. *Diabetes*. 1982; 31 (8 Pt 1): 738-741.
19. Lorenzi M. Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diab Metab Rev*. 1992; 8: 85-103.
20. Ayo SH, Radnik RA, Glass IJWF, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol*. 1990; 260: F185-191
21. Olgemoller B, Schwaabe S, Gerbitz KD, Schleicher ED. Elevated glucose decreases the content of a basement membrane associated proteoglycan in proliferating mesangial cells. *Diabetologia*. 1992. 35 (2): 183-186
22. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Erickson M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int*. 1992; 42: 647-656.
23. Tarsio JF, Reger LA, Furcht LT. Decreased interaction of fibronectin, type IV collagen, and heparin due to non enzymatic glycosylation. Implications for diabetes mellitus. *Biochemistry*. 1987; 26 (4): 1014-20.
24. Tsilibary EC, Charonis AS, Reger LA, Wohlhueter RM, Furcht LT. The effect of non-enzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *J Biol Chem*. 1988; 263 (suppl 9): 4302-8
25. Lee AT, Cerami A. Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:8311-14
26. Vlassara H. Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med*. 1994; 124: 19-29.
27. Vlassara H. Advanced glycation in diabetic renal and vascular disease. *Kidney Int*. 1995; 48 (suppl 51): S43-44.
28. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001; 44 (2): 129-146
29. Baynes JW, Torpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
30. Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AKM, Myint KM, KIM C, Yamamoto H. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14 (8 suppl 3): S259-S263.
31. Vlassara H, Brownlee M, Monogue K. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*. 1988; 240:1546-1548
32. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptor. *J Exp Med*. 1986; 164:1301-1309.
33. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end products-modified proteins. *J Clin Invest*. 1992; 90 (2): 439-446.
34. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*. 1994; 43:836-841.
35. Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89 (7): 2873-2877.

36. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest.*1991; 87 (2): 432-438.
37. Bierhaus A, Hoffmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res.* 1998; 37: 586-600.
38. Munch G, Thome J. Advanced glycation end-products in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 23 (1-2): 134-143.
39. Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyse the formation of a pentose-derived cross-link from aging human collagen. *J Clin Invest.* 1990; 85 (2): 380-384.
40. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-DG in the glycation of proteins. *Biochem J.* 1999; 344:109-116.
41. Ulrich P, Zhang X. Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia.*1997; 40 (suppl 2): S157-S159.
42. Soulis-Liporota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.*1991; 40 (10): 1328-1334.
43. Edelstein D, Brownlee M. Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. *Diabetologia.*1992; 35: 96-97.
44. Vader DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. *J Biol Chem.* 1992; 267:4364-9
45. Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1987; 316 (10): 599-606
46. Winegrad AI. Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes?. *Diabetes.* 1987; 36: 396-406.
47. Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, Santarelli E, Eades DM, Province MA, Kilo C, Sherman WR, Williamson JR. Modulation of hemodynamic and vascular filtration changes in diabetic rats by dietary myo-inositol. *Diabetes.*1990; 39 (3): 312-322.
48. Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, Province MA, Sherman WR, Kilo C, Williamson JR. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes.*1989; 38 (10): 1258-1270.
49. Frey J, Zager P, Jackson J. Aldose reductase activity mediates renal prostaglandin production in streptozotocin diabetic rats. *Kidney Int.*1989; 35:292.
50. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications: neuropathy, pathogenic considerations. *Diabetes Care.*1992; 15 (12): 1902-1925.
51. Nishizuka Y. The role of protein Kinase C in the cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature.*1984; 308 (5961): 693-698.
52. Nishizuka U, Kishimoto A, Nishizuka Y. The Protein Kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem.*1989; 58:31-44.

53. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86 (13): 5141-5145.
54. Craven PA, DeRubertis FR. Protein Kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest.* 1989; 83 (5): 1667-1675.
55. Haneda M, Koya D, Isono M, Kikkawa R. Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14 (5): 1374-1382.
56. Lin S, Sahai A, Chugh SC, Pan X, Wallner EI, Danesh FR, Lomasney JW, Kanwar YS. High glucose stimulates synthesis of fibronectin via a novel protein kinase C, Rap1b, and B-Raf signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277 (44): 41725-41735.
57. Fumo P, Kuncio GS, Ziyadeh FN. PKC and high glucose stimulate collagen alpha1 (IV) transcriptional activity in a reporter mesangial cell line. *Am J Physiol.* 1994; 267: F632-F638,
58. Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high glucose medium. *Diabetes.* 1993; 42: 118-126.
59. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension.* 1988; 12 (6): 530-548.
60. Pieper GM, Gross GJ. Endothelial dysfunction in diabetes. In *Cardiovascular Significance of Endothelium-derived Vasoactive Factors.* New York: Futura. 1991; 223-249.
61. Jensen T. Increased plasma concentration of von Willebrand factor in insulin dependent diabetics with incipient nephropathy. *BMJ.* 1989; 298 (6665): 27-28.
62. Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD, Small M. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes.* 1992; 41(8): 909-913.
63. Elliot TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci.* 1993; 85 (6): 687-693.
64. Feldt-Rasmussen B. Increased transcapillary escape rate of albumin in type I (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia.* 1986; 29 (5): 282-286.
65. Decker T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia.* 1989; 32 (9): 219-226.
66. Stehouwer CD, Zellenrath P, Polak BC, Baarsma GS, Nauta JJ, Donker AJ, den Ottolander GJ. von Willebrand factor and early diabetic retinopathy: no evidence for a relationship in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and normal urinary albumin excretion. *Diabetologia.* 1992; 35(6): 555-559.
67. Stehouwer CD, Nauta JJ, Zeldenrust GC, Hackeng WH, Donker AJ, den Ottolander GJ. Albuminuria, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 1992; 340 (8815): 319-323.

68. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Kitamura M, Lee HB. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappa B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13 (4): 894-902.
69. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta-II in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278 (4): F676-F683
70. Yamagishi SI, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M. Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2003; 63 (2): 464-473.
71. Jaimes EA, Galceran JM, Raij L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int.* 1998; 54 (3): 775-784.
72. Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(3): 667-75.
73. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000; 49 (11): 1939-1945.
74. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res.* 2002; 90 (9): 1012-1019.
75. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; 86 (5): 494-501.
76. Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (22): 19952-19960.
77. Nishikawa T, Edelstein D Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes H-P, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three different pathways of hyperglycemic damage. *Nature.* 2000; 404 (6779): 787-790.
78. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Lee HB. Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38(4 Suppl 1): S204-S207.
79. Dunlop ME, Muggli EE. Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney Int.* 2000; 57: 464-475.
80. Wang X, Shaw S, Amiri F, Eaton DC, Marrero MB. Inhibition of the JAK/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in TGF-beta and fibronectin synthesis in mesangial cells. *Diabetes.* 2002; 51 (12): 3505-3509.
81. Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 1998; 275: C1640-C1652.
- 82 Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279 (6): L1005-L1028.

83. Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int.* 2000; 58 (Suppl 77): S19-S25.
84. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003; 63: 209-216.
85. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Takeda SI, Takasawa K, Yoshimura M, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Naito T, Matsushima K, Yokoyama H. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000; 58: 1492-1499.
86. Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, Pfliffer A, Haering HU, Schleicher ED. AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF- β 1 promoter in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 2007-2016.
87. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Iglesias-De La Cruz MC, Han DC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan T, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97 (14): 8015-8020.
88. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Pateerson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest.* 2001; 108 (12): 1853-1863.
89. Baricos WH, Cortez SL, Deboisblanc M, Xin S. Transforming growth factor- β is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 790-795.
90. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol.* 2001;159: 1465-1475.
91. Li JH, Zhu HJ, Huang XR. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking smad-2 activation. *J Am Soc Nephrol.*2002; 13 (6): 1464-1472.
92. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension.* 2000; 36(3): 330-6.
93. Mason RM, Wahab NA. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14 (5): 1358-1373.
94. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1127-1133.
95. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1993; 329 (20): 1456- 142.
96. Remuzzi A, Perico N, Amuchastegui CS, Malanchini B, Mazer-ska M, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G. Short- and long-term effect of angiotensin II receptor blockade in rats with experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 1993; 4 (1): 40-49.

97. Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes*.1999; 48 (10): 2066-2073.
98. Zhang SL, Chen X, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. Insulin inhibits angiotensinogen gene expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*. 1999; 140(11):5285-92.
99. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. High glucose stimulates angiotensin gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*. 2002; 143 (8): 2975-2985.
100. Ushio-Fukai-M, Zarari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996; 271(38): 23317-23321.
101. Zhou MS, Hernandez Schulman I, Pagano PJ, Jaimes EA, Raij L. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure. *Hypertension*. 2006; 47(1): 81-6.
102. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem*. 2000; 212 (1-2): 155-196.
103. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. Hypertension and diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11 (2): 221-228.
104. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest*. 1986; 77 (6): 1925-1930.
105. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2001; 44: 1957-1972.
106. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal anti-transforming growth factor- β antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (14): 8015-8020.
107. Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis*. 1997; 29 (1): 153-163.
108. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1994; 93: 2431-2437.
109. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor- β isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int*. 1996; 49: 461-469.
110. Kolm V, Sauer U, Olgemouller B, Schleicher ED. High glucose-induced TGF-beta 1 regulates mesangial production of heparan sulfate proteoglycan. *Am J Physiol*. 1996; 270 (5 Pt 2): F812-F821.

111. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1994; 46 (2): 430-442.
112. Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-De La Cruz MC, Han DC, Ziyadeh FN. Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-beta1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am J Pathol.* 2001; 158 (5): 1653-1663.
113. Wahab NA, Harper K, Mason RM. Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. *Biochem J.* 1996; 316 (Pt 3): 985-992.
114. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992; 41 (3): 557-559.
115. Marti HP, Lee L, Kashgarian M, Lovett DH. Transforming growth factor-beta1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am J Pathol.* 1994; 144: 82-94.
116. Holmes DI, Abdel Wahab NA, Mason RM. Identification of glucose-regulated genes in human mesangial cells by mRNA differential display. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238 (1): 179-184.
117. Tada H, Tsukamoto M, Nakayama K, Isogai S. The changes of glomerular thrombospondin in STZ-diabetic rats and the effect of high glucose on the synthesis of it in cultured mesangial cells. *Diabetes.* 1992; 41: 122.
118. McGregor B, Colon S, Mutin M, Chignier E, Zech P, McGregor J. Thrombospondin in human glomerulosclerosis. A marker for inflammation and early fibrosis. *Am J Pathol.* 1994; 144: 1281-1287.
119. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11(1-2): 59-69.
120. Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, Schonherr E, Macakova K, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H. Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J.* 2001; 15 (3): 559-561.
121. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 1984; 223: 587-597.
122. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 25-38.
123. Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RM. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J.* 2001; 359: 77-87.
124. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8 (3): 171-179.
125. Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, Nagae T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: A potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38 (4 Suppl 1): S134-S138.

126. Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, Grotendorst G, Trojanowska M. TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283 (4): F707-F716.
127. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME. Aminoguanidine ameliorates overexpression of pro-sclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 2098-2107.
128. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rosmussen H, Kash-garian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int*. 1995; 48 (1): 111-117.
129. Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 2873-2877.
130. Flyvbjerg A. Potential use of growth hormone receptor antagonist in the treatment of diabetic kidney disease. *Growth Horm IGF Res*. 2001; 11(Suppl A): S115-119.
131. Chen NY, Chen WY, Bellush L, Yang CW, Striker LJ, Striker GE, Kopchick JJ. Effects of streptozotocin treatment in growth hormone (GH) and GH antagonist transgenic mice. *Endocrinology*. 1995; 136: 660-667.
132. Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Pugliese F, Mene P, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Vlassara H, Di Mario U. Up-regulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes*. 1997; 46: 1881-1887.
133. Jiménez LF, Merchant H. *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Prentice Hall. México. 2003: 515-540.
134. Mignatti P. Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int*. 1995; 47(Suppl 49): S12-S14.
135. Parry MA, Zhang XC, Bode W. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25 (2): 53-59.
136. Mackay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP. Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res*. 1990; 50: 5997-6001.
137. He C, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 2632-2636.
138. Nagase H, Engild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry*. 1990; 29 (24): 5783-5789.
139. Velázquez MT, Kimmel PL, Michaelis OE. Animal Models of spontaneous diabetic kidney disease. *FASEB J*. 1990; 4: 2850-2859.
140. Janssen U, O Phillips A, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol*. 1999; 12: 159-172.

141. Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.*1981; 19 (3): 410-415.
142. Warram JH, Scott LJ, Hanna LS, Wantman M, Cohen SE, Laffel LM, Ryan L, Krolewski SA. Progression of microalbuminuria to proteinuria in type 1 diabetes : nonlinear relationship with hyperglycemia. *Diabetes.* 2000; 49 (1): 94-100.
143. Deng A, Baylis C. Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration. *Am J Physiol.*1993; 264 (2 Pt 2): F212-F215.
144. Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.*1993; 43 (6): 1306-1312.
145. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and biological correlations. *Am J Physiol.*1993; 265 (4 Pt 2): F477-F486.
146. Correa-Rotter R, Hostetter T, Rosenberg M. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1992; 41 (4): 796-804.
147. Kalinyak J, Sechi L, Griffin C, Don B, Tavangar K, Kraemer F, Hoffman A, Schambelan M. The renin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 1993; 4 (6): 1337-1345.
148. Jaffa AA, Chai KX, Chao J, Chao L, Mayfield RK. Effects of diabetes and insulin on expression of kallikrein and renin genes in the kidney. *Kidney Int.*1992; 41 (4): 789-795.
149. Everett A, Scott J, Wilfong N, Marion B, Rosenkranz R, Inagami T, Gomez R. Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension*, 1992; 19:70-78.
150. McCarthy KJ, Abrahamson DR, Bynum KR, St. John PL, Couchman JR. Basement membrane-specific chondroitin sulfate proteoglycan is abnormally associated with glomerular capillary basement membrane of diabetic rats. *J Histochem Cytochem.*1994; 42: 473-484.
151. Ledbetter S, Copeland E, Noonan D, Vogeli G, Hasell J. Altered steady-state mRNA levels of basement membrane protein in diabetic mouse kidneys and thromboxane synthase inhibition. *Diabetes.* 1990; 39: 196-203.
152. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H. ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes.*1992; 41: 1520-1527.
153. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive renal injury in type II diabetes. *J Clin Invest.*1997; 99:342-348.
154. Osterby R, Lundbaek K, Olsen TS, Orskov H. Kidney lesions in rats with severe long term alloxan diabetes. *Lab Invest.*1967; 17:675-692.
155. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HG. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int.*1982; 21: 689-695.
156. Rasch R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Kidney size and glomerular volume. *Diabetologia.*1979; 16: 125-128.
157. Bress DK, Hutchison FN, Cole GJ, Williams JC. Differential effects of diabetes and glomerulonephritis on glomerular basement membrane composition. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 212 (1): 69-77.

158. Kim Y, Kleppel MM, Butkowski R, Mauer SM, Wieslander J, Michael AF. Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. *Am J Pathol.*1991; 138 (2): 413-420.
159. Honjo K, Doi C, Mitsuoka T. Histopathology of streptozotocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice. *Lab Anim.* 1986; 20 (4): 298-301.
160. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976; 51 (6): 551-555.
161. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1983; 23 (4): 643-646.
162. Mayhew T, Sharma A, McMallum K. Effects of continuous subcutaneous insulin infusion on renal morphology in experimental diabetes I. Blood glucose levels, body size, kidney weight and glomerulotubular morphology. *J Pathol.*1987; 151:147-155.
163. Rasch R. Tubular lesions in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia.*1984;27: 32-37.
164. Zador IZ, Deshmukh GD, Kunkel R, Johnson K, Radin NS, Shayman JA. A role for glycosphingolipid accumulation in the renal hypertrophy of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91 (3): 797-803.
165. Weil R 3rd, Nozawa M, Koss M, Reemtsma K, McIntosh R. The kidney in streptozotocin diabetic rats. Morphologic, ultrastructural, and function studies. *Arch Pathol Lab Med.* 1976; 100 (1): 37-49.
166. Desjardins M, Gros F, Wieslander J, Gubler MC, Bendayan M. Immunogold studies of monomeric elements from the glomerular domain (NC1) of type IV collagen in renal basement membranes during experimental diabetes in the rat. *Diabetologia.* 1990; 33:661-670.
167. Mohanam S, Bose SM. Influence of streptozotocin-and alloxan-induced diabetes in the rat on collagenase and certain lysosomal enzymes in relation to the degradation of connective tissue proteins. *Diabetologia.*1983;25 (1):66-70.
168. Cohen MP, Surma ML, Wu VY. In vivo biosynthesis and turnover of glomerular basement membrane in diabetic rats. *Am J Physiol.*1982; 242:F385-389.
169. Lubec G, Pollak A. Reduced susceptibility of nonenzymatically glucosylated glomerular basement membrane to proteases. *Renal Physiol.* 1980; 3: 4-8.
170. Reckelhoff JF, Tyar TVL, Mitias MM, Walcott JL. STZ-induced diabetes results in decreased activity of glomerular cathepsin and metalloproteinase in rats. *Diabetes.*1993;42:1425-1432.
171. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90 (5): 1814-1818.
172. Yoshida F, Isobe K and Matsuo S. In vivo effects of hyperglycemia on the outcome of acute mesangial injury in rats. *J Lab Clin Med.* 1995; 125 (1): 46-55.
173. Chen HC, Chen CA, Guh YJ, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci.* 2000; 67 (19): 2345-2353.
174. Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Ahmed I, Naseer O, Adem A. Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch Physiol Biochem.* 2001; 109 (3): 241-245.

175. Méndez DJ, Ramos GH. Modelos Experimentales. En Diabetes Mellitus, 1993; Cap 28, Mc Graw- Hill Interamericana, primera edición: 303-333.
176. Mordes J, Rossini AA. Animal models of diabetes. Am J Med. 1981; 70 (2): 353-360.
177. Kalter H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. Reproduc Toxicol. 1996; 10(6): 417-438.
178. Buschard K. Diabetic animal models. APMIS. 1996; 104(9): 609-14.
179. Pickup J, Goseth WS. Environmental factors in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. In textbook of Diabetes. Second edition. Volume I. Blackwell Science.1997: 14.2-14.3.
180. Johansson EB, Tjalve H. Studies on the tissue-disposition and fate of [14C]streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. Acta Endocrinol. 1978; 89(2): 339-51.
181. Rodrigues B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: Induction, mechanism(s), and dose dependency. In Experimental Models in Diabetes; McNeill JH Ed CRC Press LLC.1999.Chapter 1, pp 3-17.
182. Bell RH Jr, Hye RJ. Animal Models of Diabetes Mellitus: physiology and pathology. J Surg Res. 1983; 35 (5): 433-460.
183. Islas AS, Revilla MC, Escobedo J, Polanco A, Palomino MA, Feria A. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. Acta histochem Cytochem. 2000. 33(3): 201-208.
184. Jacobs HR. Hyperglycemic action of alloxan. Proc Soc Exp Biol Med. 1937.37:407-409.
185. Watkins D, Cooperstein SJ, Lazarow A. Effect of alloxan on permeability of pancreatic islets tissue in vitro. A J Physiol. 1964; 207:436-440.
186. Tomita T, Watanabe I. The effect of alloxan on the permeability of isolated pancreatic islets to horseradish peroxidase. Virchows Arch B Cell Pathol. 1976; 22(3): 217-232.
187. Okamoto H. Molecular mechanism of degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic beta-cells of islets of Langerhans. Nippon Naika Gakkai Zasshi. 1988; 77 (8): 1147-1156.
188. Strauch M, Gretz N. Animal models to induce renal failure: a historical survey. Contrib Nephrol. 1988; 60:1-8.
189. Rudge MV, Calderon IM, Ramos MD, Rodrigues MA. Diabetes and experimental pregnancy in rats: course of maternal blood glucose levels and its repercussions on the blood glucose levels and pancreas of newborn pups. Braz J Med Biol Res.1995; 28 (2): 219-225.
190. Ader M, Richey JM, Bergman RN. Evidence for direct action of alloxan to include insulin resistance at the celular level. Diabetologia.1998; 41 (11): 1327-1336.
191. Herr RR, Eble TE, Bergy ME, Jahnke HK. Isolation and characterization of streptozotocin. Antibiot Annu. 1959-1960; 7: 236-40.
192. Herr RR, Jahnke JK, Argoudelis AD. The structure of streptozotocin. J Am Chem Soc. 1967; 89(18): 4808-4809.
193. Batell LM, Yuen VG, Verma S, McNeill JH. Other models of type I diabetes. In Experimental Models of Diabetes. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. USA; 1999: 219-229.

194. Sybulsky S, Maughan GB. Use of streptozotocin as diabetic agent in pregnant rats. *Endocrinology*.1971; 89 (6): 1537-1540.
195. Gandy SE, Buse MG, Crouch RK. Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest*. 1982; 70 (3): 650-658.
196. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994; 43 (11): 1326-1333.
197. McIntosh CH, Pederson RA. Non-insulin-dependent animal models of diabetes mellitus. In *Experimental Models of Diabetes*. Jhon H McNeill. CRC Press LLC. New York USA; 1999: 337-398.
198. Papaccio G, Pisanti FA, Frascatore S. Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes*.1986; 35 (4): 470-474.
199. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*.1996; 52 (4): 344-346.
200. Schein PS, Cooney DA, McMennamin MG, Anderson T. Streptozotocin diabetes-further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem Pharmacol*.1973; 22 (20): 2625-2631.
201. Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A. A major loss in islets mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes*.1981; 30 (5): 424-429.
202. Papaccio G, Esposito V. Ultrastructural observations on cytotoxic effector cells infiltrating pancreatic islets of low-dose streptozotocin treated mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*.1992; 420 (1):5-10.
203. Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron D. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int*. 1996; 39(6): 1229-36.
204. Bar-On H, Roheimps PS, Eder HA. Hyperlipoproteinemia in streptozotocin-treated rats. *Diabetes*.1976; 25 (6): 509-515.
205. Hassan AA, Hassouna MM, Taketo T, Gagnon C and Elhilali MM. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *J Urol*.1993; 149 (1): 148-154.
206. Jyothirmayi GN, Modak R, Reddi AS. L-lysine reduces nonenzymatic glycation of glomerular basement membrane collagen and albuminuria in diabetic rats. *Nephron*. 2000; 87 (2): 148-154.
207. Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, el Oldroyd S, Nahas AM. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2000; 43 (1): 91-100.
208. Loichot C, Anjuere J, Nisato D, De Jong W, Imbs JL, Barthelmebs M. Renal vascular reactivity to vasopressin in rats with diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*. 2001; 431 (3): 321-329.
209. Hagay ZJ. Diabetic ketoacidosis in pregnancy: etiology, pathophysiology, and management. *Clin Obstet Gynecol*. 1994; 37 (1): 39-49.

210. Villa P, Jimenez M, Soriano MC, Manzanares J, Casasnovas P. Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care*. 2005; 9(2): R139-143.
211. Fioretto P, Steffes MW, Brown DM, Mauer SM. An overview of renal pathology in insulin-dependent diabetes mellitus in relationship to altered glomerular hemodynamics. *Am J Kidney Dis*. 1992; 20 (6): 549-558.
212. Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol*. 2005; 4(1): 9.
213. Courtoy PJ, Timpl R, Gist Farquhar M. Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem*. 1982; 30 (9): 874-886.
214. Poulsom R, Kurkinen M, Prockop DJ, Boot-Hanford RP. Increased steady-state levels of laminin B1 mRNA in kidneys on long-term streptozotocin-diabetic rats. *J Biol Chem*. 1988; 263 (21): 1072-1076.
215. Zhu D, Kim Y, Steffes MW, Groppoli TJ, Butkowski RJ, Mauer SM. Application of electron microscopic immunocytochemistry to the human kidney: distribution of type IV and type VI collagen in normal human kidney. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42 (5): 577-584.
216. Zeisberg M, Ericksen MB, Hamano Y, Neilson EG, Ziyadeh F, Kalluri R. Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 12; 295(2): 401-7.
217. Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol*. 1991;139 (4): 889-899.
218. Shimomura H, Spiro RG. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes*. 1987; 36 (3): 374-381.
219. Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ, de Heer E, Bruijn JA. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol*. 2001; 193 (2): 256-262.