



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PROTECCIÓN DE LA VITAMINA E EN LAS
ALTERACIONES MORFO-FUNCIONALES DE
LA NEFROPATÍA DIABÉTICA Y SU RELACIÓN
CON LA ANGIOTENSINA II**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGA**

P R E S E N T A

ESPERANZA ENEDINA DÍAZ SALGADO

ASESOR: DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ.



Los Reyes Iztacala, 2015



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Esperanza Salgado y Senen Díaz, que me han guiado y apoyado incondicionalmente a lo largo de este camino, por su motivación, dedicación, confianza y cariño, no tengo más que palabras de agradecimiento. Hoy les puedo decir, ¡LO LOGRAMOS!

A mis bebés July[†] y Robert, los amo por esperarme todas las noches, por hacer de cada uno de estos días los mejores aunque el cielo estuviese nublado, Gracias July por enseñarme a vivir y disfrutar de cada día, por tu fuerza, cariño, por regalarme 6 años maravillosos. Je echo de menos bonita.

A mi hermana Lupita por tratar de cuidarme y montarme la persecuidora, por los malos y buenos momentos y por hacerme enojar y reír siempre gracias.

A los Amigos de la FES-9, por hacer de la universidad la diferencia, Delia, Primavera y Karina, por su apoyo incondicional mil gracias, también a Pedro, Uriel (Dady), Alejandra (licha) Samuel (samo) y Diego (chai3) en general gracias a todos por las risas y buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS.

A mis Padres por sus enseñanzas, trabajo y esfuerzo, para brindarme la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera.

A mi asesora de tesis Dra. Beatriz Uázquez, por darme un lugar en su equipo de trabajo, por su comprensión, paciencia, sabiduría, por su tolerancia en los seminarios y por su valioso apoyo en la redacción de este trabajo.

Al M.C. David Segura por su apoyo en cada uno de los experimentos, por invertir su tiempo resolviendo mis dudas, por su paciencia y comprensión gracias.

A mis sinodales Dra. María Luz Paniagua, M.C. David Segura, Dr Martín Palomar, Dra. Leticia Verdín[†] y Dra. Rocío Serrano, por tomarse el tiempo en revisar este trabajo, por sus aportaciones, comentarios y sugerencias que contribuyeron en la culminación de esta tesis.

A la Dra. Leticia Verdín[†] por su apoyo y enseñanza en la realización del método histológico.

*Infinitos agradecimientos a la máxima casa de estudios **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por haberme cobijado en sus aulas y brindarme la formación que hoy tengo, especialmente gracias a la carrera de **BIOLÓGIA**.*

ÍNDICE

Resumen.....	1
1.Introducción.....	3
1.1 La diabetes mellitus (DM).....	3
1.2 Insulina y receptor de insulina.....	3
1.3 Clasificación e incidencia de la DM.....	6
1.4 Complicaciones crónicas de la DM.....	8
1.5 Nefropatía Diabética (ND).....	8
1.6 Patogénesis de la nefropatía diabética.....	10
1.6.1 Cambios estructurales.....	10
1.6.2 Factores metabólicos.....	11
1.6.2.1 Vía de los polioles.....	11
1.6.2.2 Productos finales de glicación avanzada (AGEs).....	13
1.6.2.3 Vía de la hexosaminas.....	15
1.6.2.4 Vía de la proteína cinasa C (PKC).....	15
1.7 Sistema Renina Angiotensina.....	16
1.8 Concepto de radical libre (RL).....	19
1.8.1 Mecanismos de formación de radicales libres.....	19
1.8.2 Tipos de radicales libres.....	19
1.8.3 Fuentes de radicales libres.....	21
1.9 Estrés oxidativo.....	22
1.10 Dianas a biomoléculas.....	23
1.10.1 Lípidos.....	23
1.10.2 Proteínas.....	23
1.10.3 DNA.....	24
1.11 Sistemas antioxidantes.....	24
2. Justificación.....	29
3. Antecedentes.....	30

4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo general.....	31
5.1 Objetivos particulares.....	31
6. Metodología.....	32
6.1 Material biológico.....	32
6.2 Reproducción del modelo de DM y tratamiento con vitamina E.....	32
6.3 Determinación de la hipertrofia renal (HR).....	33
6.3.1 Estudio histológico.....	33
6.3.2 aislamiento de DNA por el método de TRIZOL Reagent.....	34
6.4 Determinación de la función renal.....	34
6.4.1 Cuantificación de proteínas en orina.....	35
6.4.2 Cuantificación de creatinina.....	34
6.5 Determinación por inmunoblot (westernblot) de la expresión de los receptores AT1R y AT2R en médula y corteza renal	35
6.5.1 Homogeneización de corteza y medula renal.....	35
6.5.2 Separación de proteínas por electroforesis.....	36
6.5.3 Transferencia a la membrana (PVDF).....	36
6.5.4 Bloqueo de la membrana.....	37
6.5.5 Revelado.....	37
6.6 Estudio de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	37
6.6.1 Homogeneizado de corteza renal.....	37
6.6.2 Catalasa.....	38
6.6.3 Superóxido dismutasa (SOD).....	38
6.6.4 Glutación peroxidasa (GPX).....	38
6.7 Análisis estadístico.....	38
7. Resultados.....	39
7.1 Reproducción del modelo de DM.....	39
7.2 Efecto de la vitamina E sobre la DM.....	41

7.3 Hipertrofia renal.....	44
7.4 Función renal.....	47
7.5 Actividad de las enzimas antioxidantes.....	49
7.6 Expresión de los AT1R y AT2R por inmunoblot.....	51
8. Discusión.....	54
9. Conclusión.....	62
10. Bibliografía.....	63
Apéndices.....	73
Apéndice 1. Cuantificación de proteínas (Bradford).....	73
Apéndice 2. Cuantificación de proteínas (Lowry).....	74
Apéndice 3. Cuantificación de creatinina en orina.....	75
Apéndice 4. Cuantificación de creatinina en plasma.....	76
Apéndice 5. Técnica de procesamiento de inclusión en parafina.....	77
Apéndice 6. Tinción de Hematoxilina- Eosina (H-E).....	78
Apéndice 7. Geles de electroforesis de poliacridamida.....	79
Apéndice 8. Actividad de catalasa (CAT).....	80
Apéndice 9. Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	81
Apéndice 10. Actividad de glutatión peroxidada (GPx).....	82

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 Proinsulina y su conversión a insulina.....	4
Fig. 2 Receptor de insulina	5
Fig. 3 Reducción de la glucosa por la enzima aldosa reductasa.....	12
Fig. 4 Formación de los productos de glicación avanzada.....	14
Fig. 5 Sistema renina angiotensina.....	18
Fig. 6 Generación de especies reactivas de oxígeno.....	26
Fig. 7 Estructura química de los tocoferoles.....	27
Fig. 8 Reducción del radical tocoferoxil por acción del glutatión.....	28
Fig. 9 Disposición de los filtros, el gel y la membrana PVDF en la cámara de transferencia.....	36
Fig 10 Efecto de la STZ sobre la glucosa sanguínea, durante cuatro semanas.....	39
Fig. 11 Efecto de la STZ sobre la ingesta promedio de alimento durante 24 h.....	40
Fig.12 Efecto de la STZ sobre el consumo promedio de agua durante 24 h.....	40
Fig. 13 Efecto de la STZ sobre la excreción promedio de orina durante 24 h.....	41
Fig. 14 Efecto de la vitamina E sobre la hiperglucemia producida por administración de STZ durante 28 días.....	42
Fig.15 Efecto de la vitamina E sobre la ingesta promedio de alimento durante 24 h.....	42
Fig. 16 Efecto de la vitamina E sobre el consumo promedio de agua durante 24 h.....	43
Fig. 17 Efecto de la vitamina E sobre la excreción promedio de orina durante 24 h.....	43
Fig. 18 Efecto de la vitamina E sobre el peso corporal de ratas con 28 días de DM.....	44
Fig. 19 Efecto de la vitamina E sobre el peso del riñón en ratas diabéticas.....	45
Fig. 20 Efecto de la vitamina E sobre el cociente de proteínas/DNA en las ratas diabéticas.....	46
Fig. 21 Microfotografía representativa de los cortes de riñón teñido por la técnica de Hematoxilina-Eosina (40X).....	46
Fig. 22 Efecto de la vitamina E sobre el área celular de los túbulos proximales en ratas diabéticas.....	47
Fig. 23 Efecto de la vitamina E sobre la excreción de proteínas en orina de 24 h.....	48
Fig. 24 Depuración de creatinina de las ratas diabéticas, con administración de vitamina E.....	48
Fig. 25 Actividad enzimática de la catalasa en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E.....	49

Fig. 26 Actividad enzimática de la SOD en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E.....	50
Fig. 27 Actividad enzimática de la GPx en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E.....	51
Fig. 28 Efecto de la vitamina E sobre la expresión proteica del AT ₁ R en corteza renal de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con vitamina E.....	52
Fig. 29 Efecto de la vitamina E sobre la expresión proteica del AT ₁ R en médula renal de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con vitamina E.....	52
Fig. 30 Efecto de la vitamina E sobre la expresión del ATR2 en corteza renal de ratas diabéticas.....	53
Fig. 31 Efecto de la vitamina E sobre la expresión del ATR2 en médula renal de ratas diabéticas.....	54

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. La principal manifestación de la DM es la hiperglucemia, resultado de una respuesta defectuosa o deficiente de la secreción de insulina. La DM produce alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, y ocasiona numerosas complicaciones sistémicas a largo plazo, que son causa importante de morbilidad y mortalidad. La nefropatía diabética (ND) es considerada una de las más graves complicaciones de la DM, que es determinada por alteraciones morfológicas y funcionales a nivel renal, y se caracteriza por hipertrofia renal e hiperfiltración, hipertensión glomerular y sistémica que ocasionan proteinuria, la cual puede progresar hasta insuficiencia renal crónica. El desarrollo de la ND involucra numerosos factores, entre estos están la producción excesiva de radicales libres (RL), generada por el metabolismo alterado de la glucosa, a través de vías enzimáticas y no enzimáticas. Una fuente importante generadora de RL a nivel celular y vascular es la angiotensina II por activación de la NADPH oxidasa. Los RL ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena de DNA. No obstante el organismo posee enzimas antioxidantes que eliminan los RL, sin embargo en presencia de la hiperglucemia existe un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y oxidantes, que conllevan a la disminución plasmática de las enzimas antioxidantes. Los antioxidantes exógenos como la vitamina E, son de gran importancia frente a las enfermedades crónicas como la DM, estas sustancias favorecen la inactivación de los RL e impiden su propagación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antioxidante de la vitamina E en la ND. Para cumplir este propósito se estudiaron ratas macho inducidas a diabetes por administración de estreptozotocina (60 mg/kg vía ip), a las cuales se les administro por vía oral vitamina E en dosis de 250 y 500 mg/kg, y se realizó un seguimiento por 4 semanas de su peso corporal, cuantificación de glucosa, ingesta de agua y alimento, así como excreción de orina. La hipertrofia renal se determinó por la relación del peso del riñón (mg) respecto al peso corporal (g), también se determinaron el área celular de los túbulos contorneados proximales y el cociente de proteínas/DNA de corteza renal. La función renal fue estudiada por

la proteinuria y la depuración de creatinina. Se determinó la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, en corteza renal, como parámetros de los sistemas antioxidantes enzimáticos. Finalmente se evaluó la expresión de los receptores AT1 y AT2 en medula y corteza renal. La STZ (60 mg/Kg) permite reproducir un buen modelo de DM experimental, que cumple con el cuadro clínico característico de esta enfermedad (hiperglucemia, polidipsia, polifagia y poliuria). La administración de vitamina E al grupo de ratas diabéticas causó retardo y/o disminución del daño renal que fue determinado por la disminución de la hipertrofia renal, disminución de la proteinuria, aumento de la depuración de creatinina y aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes, también regula los efectos nocivos del sistema renina angiotensina, al reducir la expresión del ATR1, lo que pone de manifiesto la importancia del control del estrés oxidativo en la DM.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. La hiperglucemia es la manifestación clínica de la DM, debido a una relativa o absoluta deficiencia insulínica y/o a la resistencia a la insulina; hormona que se encarga de mantener la concentración de la glucosa en sangre en un intervalo normal entre 80-105 mg/dL, y permite el ingreso de la glucosa a los tejidos insulino-dependientes como el músculo, el hígado y el tejido adiposo.

La DM produce complicaciones sistémicas a corto y a largo plazo, que son causa importante de morbilidad y mortalidad (American Diabetes Association, 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que para el año 2030 habrá cerca de 366 millones de pacientes diabéticos en el mundo mientras que, en México, de acuerdo con los datos de la Secretaría de Salud, el 9 % de la población adulta es diabética (Wilds y col., 2004).

1.2 Insulina y receptor de insulina.

La insulina es una hormona anabólica constituida por 51 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 5.8 kDa, es sintetizada y secretada en las células beta (β) de los islotes de Langerhans del páncreas, a partir de un péptido de 110 aminoácidos llamado proinsulina. La proinsulina contiene un péptido señal N-terminal o prepéptido, de 24 aminoácidos, que se pierde para formar la proinsulina, esta molécula se pliega y se forman enlaces disulfuro (figura 1). La conversión de proinsulina a insulina comienza en el complejo de Golgi, donde se eliminan cuatro aminoácidos básicos y el conector restante o péptido C, dando lugar a las dos cadenas de péptidos A y B que forman la insulina (Oliart y col; Hardman y Limbird, 2001).

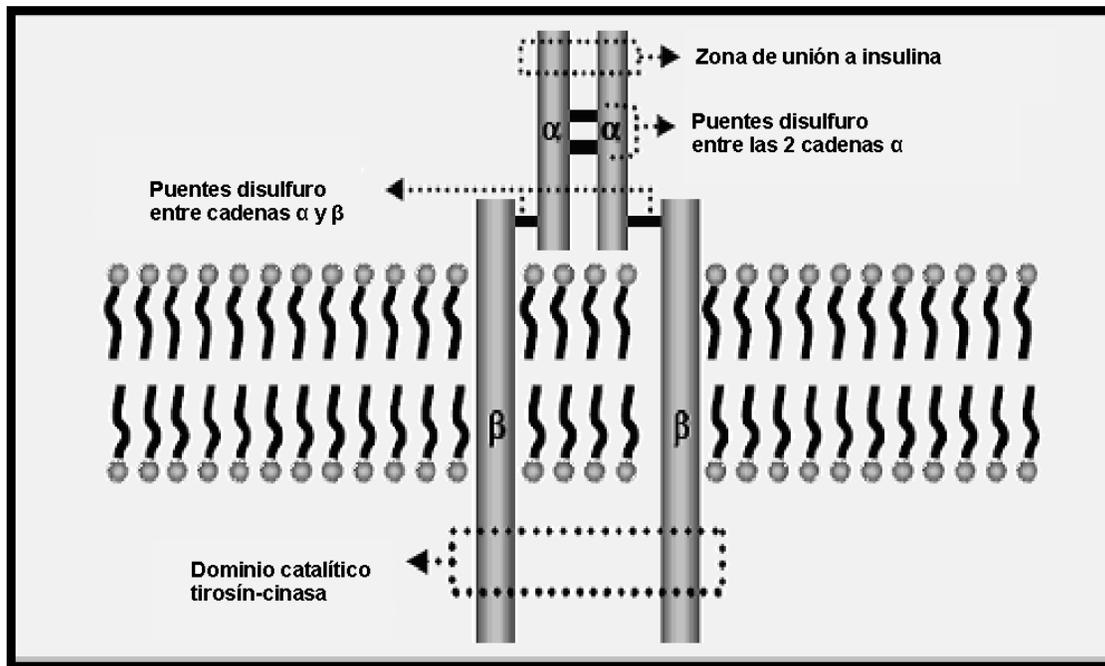


Figura 2. Receptor de insulina

Cuando la insulina es liberada por el páncreas, como respuesta al aumento en los niveles de glucosa en sangre, es transportada por la circulación hacia las células diana, donde es reconocida por la porción extracelular del IR, produce un cambio conformacional en el dominio tirocinacinas del receptor, y se promueve su auto fosforilación. Este proceso induce a la activación de una cascada de eventos moleculares que llevan a la fosforilación de la proteína IRS-1 (sustrato del receptor de la insulina 1), promoviendo la activación de dos vías de transducción. La primera es la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) que intervienen en la expresión genética de diversas proteínas entre ellas el GLUT4, proteína integral de membrana encargada de transportar a la glucosa desde la sangre hacia el citosol de las células insulino dependientes. La segunda, vía de la fosfatidil- inositol 3 cinasa (PI3 cinasa), esta implicada en diversos efectos metabólicos, principalmente en la translocación y endocitosis de los GLUT 4 que llevan a su inserción en la membrana (Hardman y Limbird 2001; Olivares y Arellano, 2008).

Cualquier alteración a nivel del receptor de insulina o de las vías mencionadas, genera un colapso en los procesos de señalización mediados por la insulina, lo que se traduce en elevados niveles de glucosa característicos de la diabetes mellitus (Medivil y Sierre, 2005)

1.3 Clasificación e incidencia de la DM

La DM se clasifica según la OMS en cuatro tipos: IDM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional y DM por otras causas (tabla 1), siendo los tipos mas frecuentes la DM1 y la DM2. La DM1 es ocasionada por la destrucción de las células β de los islotes del páncreas, y esta mediada por susceptibilidad genética y autoinmunidad, los pacientes con DM1, deben ser tratados con insulina por lo que anteriormente, a esta enfermedad se le denominaba “dependiente de insulina”.

La DM2 se desarrolla por la resistencia a la insulina del tejido muscular y adiposo y por disminución en la producción de insulina o por ambas causas. Los factores genéticos juegan un papel muy importante, así como el estilo de vida, que involucra, malos hábitos alimenticios, el sobrepeso, el tabaquismo y el alcoholismo (Conget, 2002; ADA, 2013). La mayoría de los pacientes son tratados con hipoglucemiantes orales.

La DM gestacional se caracteriza por hiperglucemia en el transcurso del embarazo, que puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.

Otros tipos específicos de DM, se determinan por defectos genéticos en la función de la célula β , en la acción de la insulina, otros están asociados a patologías pancreáticas, endocrinopatías, a agentes infecciosos y a otras enfermedades como los síndromes de Down, Klinefelter, Turner entre otros.

Tabla 1. Calificación de la diabetes mellitus, Tomada de Asociación Americana de Diabetes (1997).

-
- I. Diabetes tipo 1 (Destrucción de la Célula β , llevando usualmente a deficiencia absoluta de insulina)
 - A. Mediada inmunológicamente.
 - B. Idiopática
 - II. Diabetes tipo 2. (Puede caracterizarse desde predominante mente resistencia a la insulina con deficiencia relativa de insulina o un defecto secretor con resistencia a la insulina).
 - III. Otros tipos específicos.
 - A. Defectos genéticos de disfunción de la célula β .
 1. Cromosoma 12, NHF- 1 α (MODY 3).
 2. Cromosoma 7, Glucosa (MODY 2).
 3. Cromosoma 20, NFH -4 α
 4. DNA mitocondrial.
 5. Otros
 - B. Defectos genéticos de la acción de la insulina
 1. Resistencia a la insulina tipo a
 2. Leprecaunismo
 3. Síndrome de Rabson- Mendellhal
 4. Diabetes lipoatrófica
 5. Otros
 - C. Enfermedades del páncreas exógenas.
 1. Pancreatitis
 2. Trauma, pancreatectomía
 3. Fibrosis quística
 4. Hemocromatosis
 5. Enfermedad fibroclaustrica
 6. Otros.
 - D. Endocrinopatías
 1. Acromegalia
 2. Síndrome de Cushing
 3. Glucagonoma
 4. Feocromocitoma
 5. Hipertiroidismo
 6. Somatostatina
 7. Aldosteronoma
 8. Otros
 - E. Medicamentosa o inducida por agentes químicos
 1. Vacor (Raticida).
 2. Pentamidina
 3. Ácido nicotínico
 4. Glucocorticoides
 5. Hormonas tiroideas
 6. Diazóxido
 7. Agonistas Beta adrenérgicos
 8. Tiazidas
 9. Dilantin
 10. α - Interferón
 11. Otros
 - F. Infecciones
 1. Rubéola congénita
 2. Citomegalovirus
 3. Otros
 - G. Formas no comunes de diabetes inmunológicamente mediada.
 1. Síndrome del "hombre rígido"
 2. Anticuerpos contra el receptor de insulina
 - H. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes
 1. Síndrome de Down
 2. Síndrome de Klinefelter
 3. Síndrome de Turner
 4. Síndrome de Wolfram
 5. Ataxia de Friedreich
 6. Corea de Huntington
 7. Síndrome de Laurence-Moon Biedl
 8. Distrofia miotónica
 9. Porfiria
 10. Síndrome de Prader- Willi
 11. Otros.
 - IV. Diabetes mellitus gestacional.
-

1.4 Complicaciones crónicas de la DM

Aunque la DM1 y DM2 tienen mecanismos fisiopatológicos diferentes, las complicaciones a corto y a largo plazo son semejantes. En las complicaciones a corto plazo se presentan la hiperglucemia, la hipoglucemia, el coma hiperosmolar y la cetoacidosis diabética.

Las complicaciones a largo plazo se dividen en micro y macrovasculares. Las macrovasculares se deben principalmente a lesiones que afectan las arterias musculares de calibre grueso y mediano, provocando arterioesclerosis que aumenta el riesgo de infarto, accidente cerebrovascular y gangrena de extremidades inferiores. En las microvasculares se afecta la difusión capilar en los órganos blanco como retina, riñón y nervios periféricos, lo que causa retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética (Madrid, 2000; Triana, 2001; Robbins, 2004).

1.5 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una complicación que afecta del 15 al 25% de los pacientes con DM1 y entre el 30 y 40% de los pacientes con DM2, e implica daños micro y macrovasculares y es considerada como la principal causa de enfermedad renal terminal (Orence, 2004). El síndrome clínico de la ND consiste en hipertrofia renal, hiperfiltración, microalbuminuria, macroalbuminuria, hipertensión y disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (TFG).

La evolución clínica de la ND, hasta insuficiencia renal terminal ha sido clasificada en cinco estadios (Mogensen y col 1983), en los cuales la albuminuria es uno de los factores más importantes (Tabla 2).

Al inicio de la ND se presentan una serie de cambios de carácter reversible, caracterizados por la hipertrofia renal (incremento del tamaño de las células renales), que se produce por modificación de la hemodinámica glomerular a causa de la hiperglucemia, provocando aumento de la tasa de filtración glomerular (hiperfiltración) debido a la reducción de la resistencia vascular intrarrenal aferente comparada con la resistencia de las arteriolas eferentes, lo que produce un

incremento de la presión hidrostática transcápsular glomerular y aumento en la tasa de filtración glomerular (TFG), lo que daña al endotelio glomerular, a las células epiteliales y a las células mesangiales. Estos daños continúan hacia el desarrollo de la ND con la aparición de microalbuminuria, que conlleva a la proteinuria, y posteriormente descenso progresivo de la TFG, con daños estructurales generalizados, por la presencia de hialinosis arteriolar, expansión mesangial y glomeruloesclerosis difusa; determinando así la insuficiencia renal crónica (Heras y col. 2001; Rosas y col. 2009; Serna y col. 2009).

Tabla 2. Estadios evolutivos de la Nefropatía Diabética (Mogensen, 1983)

Estadio	Características	Estimado de filtración glomerular	Albuminuria	Presión Arterial
Estadio 1 Presente al momento del diagnóstico de DM	Hiperfiltración glomerular	Incrementada en DM 1 y 2	Puede estar presente en forma episódica y reversible con control glucémico	DM 1 normal DM 2 normal o incrementada
Estadio 2 Primeros 5 años	Engrosamiento de la membrana basal y expansión del mesangio	Normal	Puede estar presente en forma episódica y reversible con control glucémico	DM 1 normal DM 2 normal o incrementada
Estadio 3 6 a 15 años	Microalbuminuria	Normal o disminuido en relación a su basal	30 a 300 mg/día	DM 1 incrementada DM 2 normal o incrementada
Estadio 4 15 a 25 años	Microalbuminuria	Normal o disminuido en descenso progresivo	> 300 mg/día	Hipertensión
Estadio 5 25 a 30 años	Insuficiencia renal terminal	0 a 10 mL/min	Disminuyendo	Hipertensión

1.6 Patogénesis de la nefropatía diabética

Los mecanismos de la patogénesis de la ND no han sido descritos completamente. Se ha mencionado que existe una influencia genética muy importante sobre la cual se sobreponen trastornos metabólicos y hemodinámicos (Torres y Zacarías, 2002; Altamirano, y col. 2011; Cuerda, y col. 2011). La evolución de esta complicación de la DM se correlaciona en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglucemia. Con estos mecanismos se han tratado de explicar los cambios funcionales y estructurales producidos en el desarrollo de la ND.

1.6.1 Cambios estructurales

El tamaño de los riñones en la ND es variable, al inicio existe aumento de la masa renal, del tamaño glomerular y tubular así como de la superficie capilar de filtración. Posteriormente reducen su tamaño al alcanzar la etapa de riñón terminal (Iglesias, y col., 2003). Los cambios microscópicos se dividen en dos campos:

A) Lesiones glomerulares: (glomeruloesclerosis difusa y nodular).

Las primeras anormalidades demostradas en el microscópico electrónico son engrosamiento difuso de la membrana basal del glomérulo, aumento de la matriz extracelular y la proliferación de las células mesangiales. Al continuar la evolución aparecerán ramificaciones del material de la membrana basal glomerular entre las células endoteliales. Con el microscopio óptico se observan lesiones difusas, las cuales se presentan como acumulación de una sustancia amorfa en la pared del capilar glomerular y en el mesangio. Estas lesiones evolucionan agrupándose y constituyendo la forma nodular.

B) Lesiones tubulares

El depósito de glucógeno en las células tubulares, especialmente en el asa de Henle, constituye la nefrona glucogénica.

La etapa temprana de daño renal se caracteriza por la hiperfiltración e hipertrofia renal. La hipertrofia renal se caracteriza por el aumento de tamaño de las células

renales, producto de la sobreexpresión de diversas proteínas activadas por los radicales libres y éstos a su vez por la hiperglucemia. La hiperfiltración se observa por el aumento de filtrado glomerular, determinado por una depuración de creatinina alta. Los incrementos varían del 20 – 40%. Al mismo tiempo se observa aumento en la excreción de albúmina.

En el mecanismo por el cual se produce la microalbuminuria ésta implicada la estructura, tamaño y carga de las macromoléculas, se filtran con mayor dificultad aquellas moléculas con carga negativa. La permeabilidad y selectividad se modifican por que disminuyen las cargas negativas de la pared capilar glomerular debido a la reducción del ácido siálico y del heparán sulfato, que son componentes principales de la barrera de filtración.

1.6.2 Factores metabólicos

Son varios los factores metabólicos que participan en el desarrollo de la ND, entre los cuales se encuentran:

1.6.2.1 Vía del Poliol

Es una de las vías alternativas en el metabolismo de la glucosa, por acción secuencial de dos enzimas. La primera es la aldosa reductasa (AR), la cual esta presente en los tejidos que no requieren de insulina para la captación de glucosa como: ojo (epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales), riñón (podocitos, células mesangiales, epitelio tubular), y nervios periféricos (axones y células de Schwann). Esta enzima se activa por concentraciones altas de glucosa, y es la responsable de la reducción irreversible de la glucosa a sorbitol, requiere como coenzima al NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). La sorbitol deshidrogenasa (SDH), es la segunda enzima que cataliza la oxidación del sorbitol en fructosa, con la formación de nicotinamida adenin dinucleótido reducido (NADH) (figura 3). Estas reacciones producen aumento de la concentración intracelular de sorbitol y fructosa, y depleción de la concentración del NADPH, lo cual lleva a la célula al estrés oxidativo, ya que el NADPH es necesario para la regeneración de glutatión (Brownle, 2005; Tebar y col., 2009).

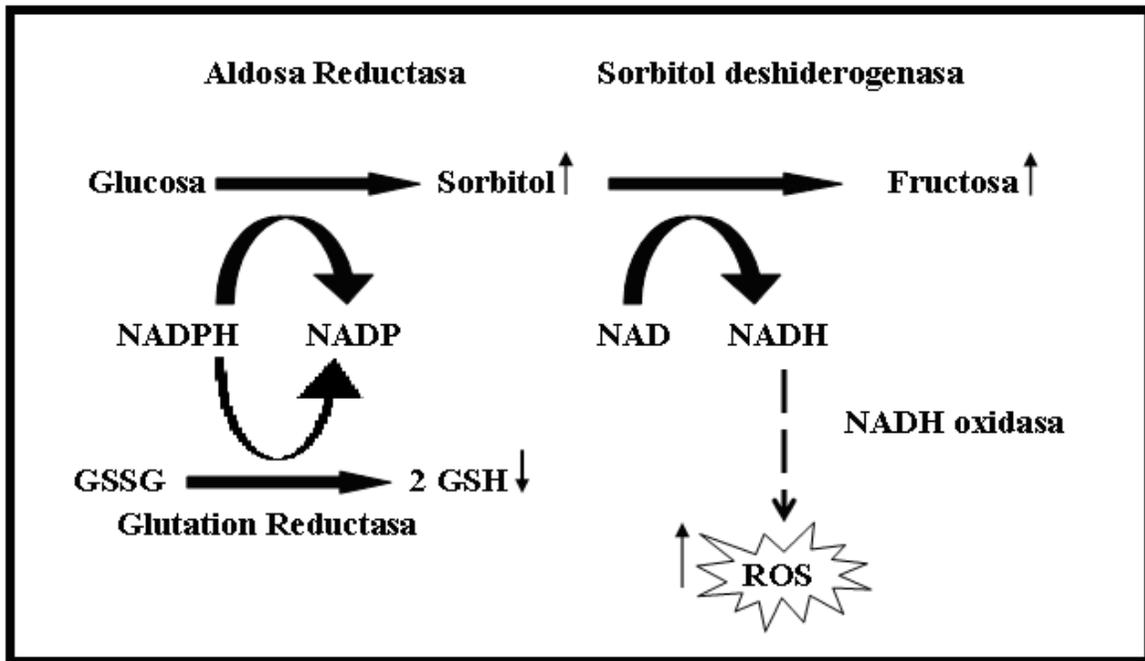


Figura 3. Reducción de la glucosa por la enzima aldosa reductasa (Tang y col. 2012).

El aumento intracelular de sorbitol incrementa la captación de agua por las células debido a su capacidad osmótica. El sorbitol también actúa como inhibidor competitivo del *mio*-inositol, por lo que se produce un bloqueo de la bomba Na/K ATPasa, que genera un aumento del Na⁺ intracelular, esto unido a la disminución de la movilización de calcio (originada por la disminución de la inositol polifosfasa) sensibiliza la pared vascular a la angiotensina II y catecolaminas, produciendo vasoconstricción especialmente a nivel de las arteriolas eferentes del glomérulo. Se ha señalado la participación de este mecanismo en la hiperfiltración que se observa en pacientes con DM tipo 1 (Al-Daller y col, 2004).

Por otro lado, la sobreproducción de fructosa, permite su entrada a la vía glucolítica ya sea como fructosa-6-fosfato o como fructosa-1-fosfato, lo que ocasiona un incremento de los intermediarios gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), que poseen alta capacidad de glicosilar proteínas, generar anión superóxido y producir estrés oxidativo (EO).

La disminución del NADPH afecta la actividad de la glutatión reductasa (GR) y la catalasa, enzimas que participan en los mecanismos antioxidantes, por lo tanto la

disminución del NADPH explicaría la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que conlleva al estrés oxidativo (Díaz y col., 2004).

1.6.2.2 Productos finales de glucosilación avanzada (AGEs)

Los productos de glucosilación no enzimática (glicación) de las proteínas son de gran importancia en el estudio de las complicaciones a largo plazo de la DM, y especialmente de la ND. Estos procesos consisten en un conjunto de reacciones que comienzan con la condensación de un hidrato de carbono y un grupo amino libre de las proteínas y especialmente con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, formando una base de Schiff, posteriormente ocurre una serie de reordenamientos de los enlaces químicos dando origen a productos más estables, conocidos como productos tempranos de glicación, también descritos como productos de Amadori. Los productos de Amadori poseen un grupo carbonilo que puede seguir reaccionando con otros grupos amino, durante este proceso se generan compuestos α -dicarbonílicos (α -oxoaldehidos) como la 3-dexosiglucosona, el metiglixal y el glioxal, que son altamente reactivos y actúan como propagadores de la reacción (figura 4).

La glucosilación de proteínas de vida media larga forma los productos finales de glucosilación avanzada (AGEs), estos tardan varios meses e incluso años en formarse y son irreversibles. Muchos de estos son fluorescentes, de color pardo amarillento y resultan del entrecruzamiento con otras proteínas o con otras regiones de la misma proteína. Los AGEs son capaces de producir agregación de proteínas intra y extra celular y pérdida en sus funciones biológicas (Martínez 2005; Aponte y col., 2009).

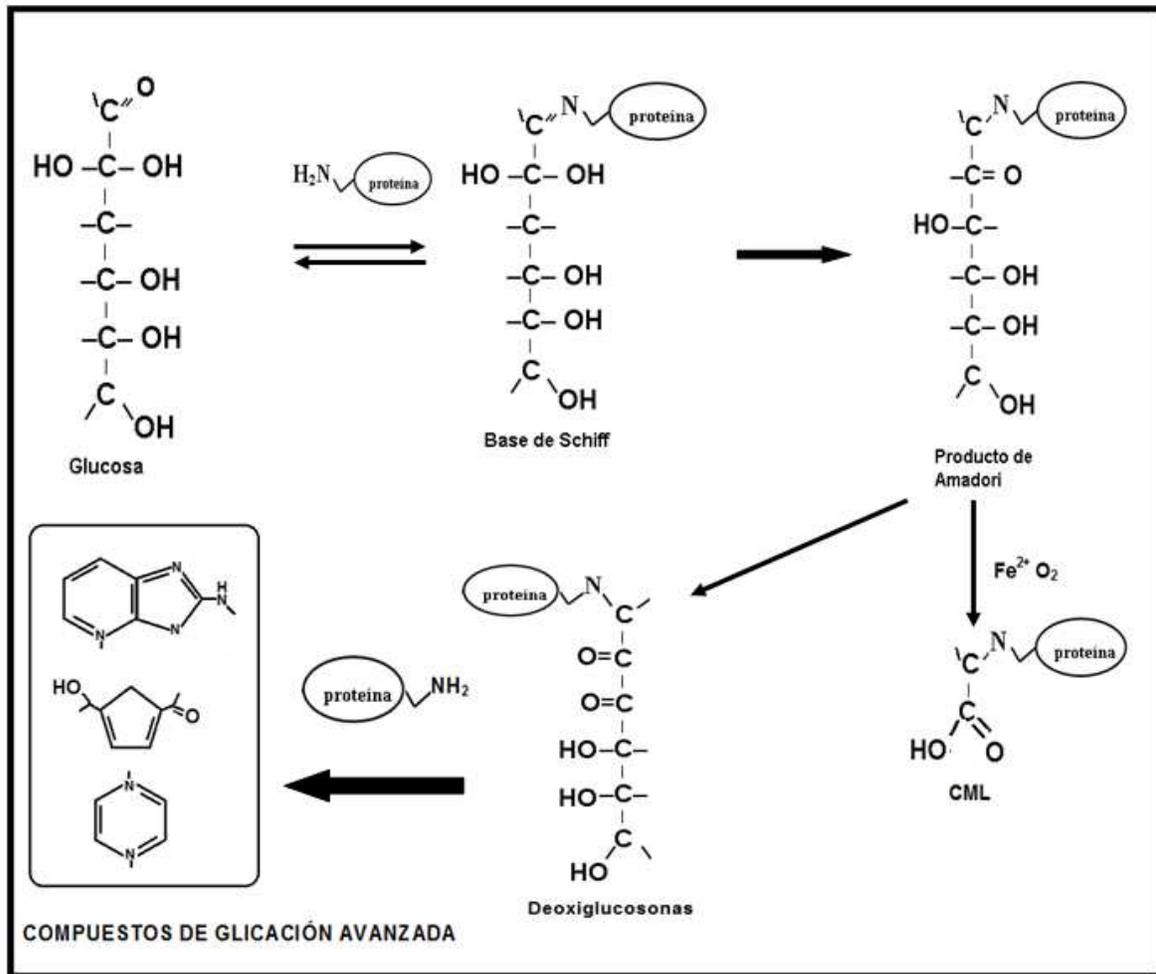


Figura 4. Formación de los productos de glicación avanzada.

Algunos de los efectos de los AGEs son debidos a su interacción con sus receptores específicos (RAGE). Los RAGE pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, se localizan en la superficie celular de monocitos, macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, células epiteliales tubulares y células del músculo liso vascular. La unión de los AGEs a sus receptores desencadena diversos eventos y la subsiguiente generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NFkB), así como la activación de diversos péptidos y proteínas incluyendo factores de crecimiento, citocinas, proteínas de matriz extracelular y el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1). En macrófagos inducen la producción de la interleucina -1 (IL-1), factor de crecimiento-1 (GF-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- alfa). En los glomérulos disminuye la actividad de la colagenasa

e inducen aumento de la síntesis del colágeno IV (Méndez, 2003, Díaz, 2004; Aponte y col., 2009). Los AGE también pueden formarse a nivel intracelular causando cambios en el DNA o alterando proteínas, también se ha descrito que los AGEs generan EO.

1.6.2.3 Vía de las hexosaminas

Esta vía se encarga de metabolizar aproximadamente del 2 al 5 % glucosa que entra a la biosíntesis de las hexosaminas, la cual inicia con la fructosa 6-fosfato derivada de la glucólisis; la fructosa 6-fosfato es transformada por la fructosa 6-fosfato aminotransferasa (GFA) en glucosamina 6-fosfato y por medio de tres reacciones subsecuentes da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina, las cuales se utilizan en la formación de glicoproteínas y de los proteoglicanos (Al-Daller, 2004; Tebar y Escobar, 2009).

Se ha observado que ante concentraciones altas de glucosa, tanto *in vivo* como *in vitro* la biosíntesis de hexosaminas incrementa en las células endoteliales, mesangiales y del músculo liso (Goldberg y col., 2006). Las hexosaminas estimulan la expresión de genes poscleróticos en las células mesangiales *in vitro*, como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) o el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), fibronectina y laminina, los que aceleran la acumulación de matriz extracelular y la expansión mesangial *in vivo* características de la ND (Satriano, 2007).

1.6.2.4 Vía de las proteínas Cinasa C (PKC)

La PKC es una enzima que pertenece a la familia de las serina-treonina cinasas, presenta más de once isoformas que tienen en común fosforilar las proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares, y cuya consecuencia es la regulación de las funciones vasculares, que incluyen la contractilidad, el flujo sanguíneo, la proliferación celular y la permeabilidad vascular del músculo liso vascular (Martínez y col., 2005).

La isoforma $\beta 2$ -Proteín Cinasa C aumenta su actividad en las células endoteliales de la retina y el riñón, cuando éstas son expuestas a concentraciones altas de glucosa. La activación de esta isoforma elevada es debida a la concentración intracelular de la glucosa que aumenta la síntesis del diacilglicerol (DAG), el cual estimula a esta enzima (Bursell y King, 1999; Cruz y col., 2011).

Como consecuencia de la elevación de la concentración del DAG, aumenta la actividad de la PKC, la cual es responsable de múltiples complicaciones de la DM que incluyen alteraciones en el flujo sanguíneo, engrosamiento de la membrana basal, expansión de la matriz extracelular, aumento de la permeabilidad vascular, angiogénesis y crecimiento celular, alteraciones características de la ND (Lee y col., 1989).

Por otro lado el aumento de la actividad de la PKC modela la expresión genética de las células mesangiales y aumenta la síntesis de proteínas de la matriz extra celular, especialmente colágeno tipo IV y fibronectina, a través de la mediación del TGF-B (Huong y Prising, 2000). La activación de la PKC aumenta la producción de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 y PGI2), que participan en la hiperfiltración e incremento de la permeabilidad a la albúmina en el glomérulo (Kamwar y col., 2008).

1.7 SISTEMA RENINA –ANGIOTENSINA

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA), a través de la angiotensina II, tiene un papel principal en la regulación de la presión arterial, el equilibrio hidroelectrolítico y la regulación del pH.

El SRA está constituido por una cascada enzimática, dichos constituyentes son el angiotensinógeno, la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La renina es sintetizada y liberada por las células yuxtglomerulares del riñón, localizadas en las arteriolas eferentes renales y es liberada a la circulación ante estímulos como la hiponatremia, la hipovolemia, la hiperkalemia y por niveles bajos de angiotensina II (AII). El sustrato de la renina es una alfa 2-globulina

plasmática, sintetizada en el hígado, el angiotensinógeno, del cual se forma un decapeptido llamado angiotensina I, que es convertida en el lecho vascular pulmonar, por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a AII.

Existen numerosos estudios que indican la participación del SRA en las complicaciones crónicas de la DM. La hiperglucemia estimula la síntesis y la secreción intrarrenal de angiotensina II (AII), la cual es un potente vasoconstrictor que a nivel renal, produce constricción de las células mesangiales y de las arteriolas eferentes, lo que conduce a la hipertensión glomerular, que aparece en los estadios tempranos de la ND (Mogensen, y col., 1983). La AII también actúa como factor de crecimiento para las células renales, induciendo la expresión y síntesis renal de factores autocrinos y citocinas, que actúan estimulando la producción de matriz extracelular por las células mesangiales, epiteliales y por los fibroblastos, lo que conduce al desarrollo de fibrosis constituyendo el daño progresivo renal (Luño, 2005).

Los efectos de la AII se producen por interacción con sus receptores AT1 (AT1R) y AT2 (AT2R), el AT1R media la mayoría de los efectos de la AII. Las principales acciones de la AII a través del AT1R, son vasoconstricción, estimulación de la actividad de la aldosterona y de la actividad de los nervios simpáticos, promueve el crecimiento celular, aumento del depósito de proteínas de matriz extracelular e inflamación, así como incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Verdano, 2009). Mientras que el AT2R antagoniza muchos de los efectos del AT1R (Pérez y col., 2006).

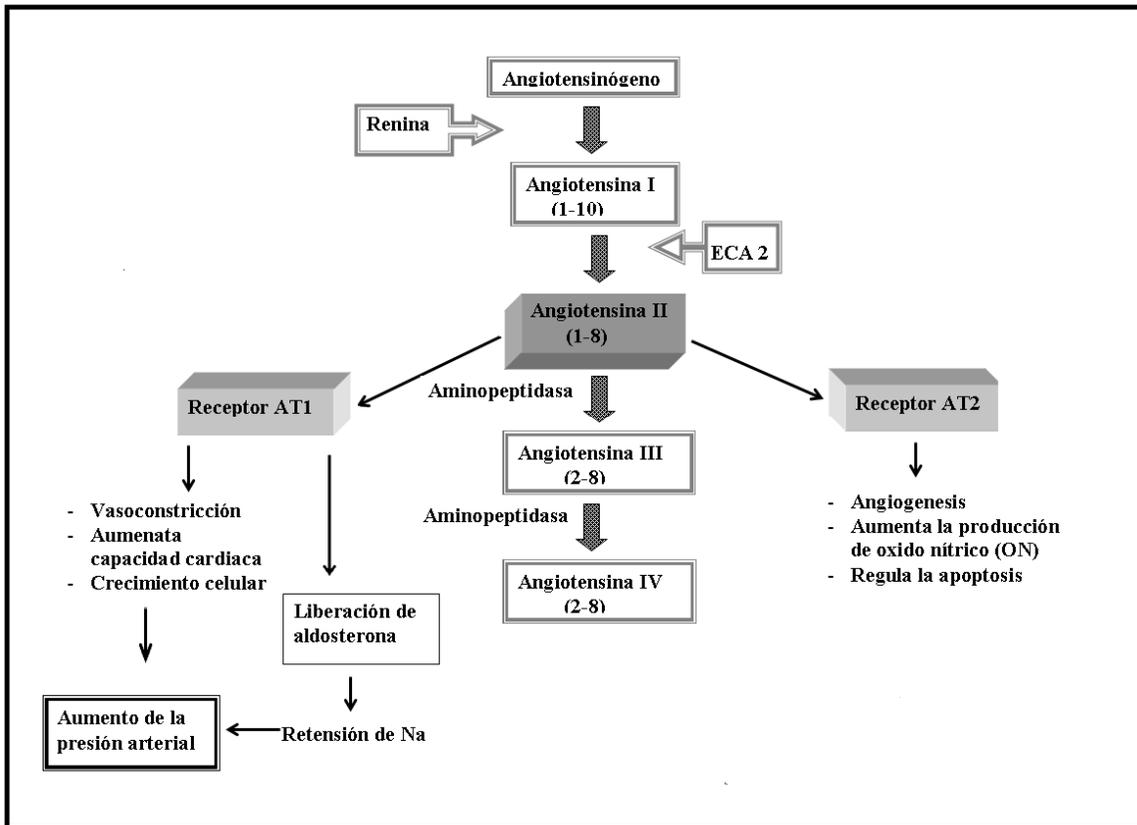


Figura 5. Sistema Renina Angiotensina.

Existe evidencia sobre la acción protectora del bloqueo del SRA tanto en pacientes diabéticos como en animales de experimentación (Herrera, 2003), los tratamientos con bloqueadores del ATR1 (losartán e irbesartán) e inhibidores de la ECA (captopril) han demostrado que no solo actúan disminuyendo la hipertensión, también mejoran el funcionamiento renal, pues disminuyen la proteinuria, la inflamación y el estrés oxidativo (Yavuz y col, 2003; Ceriello y col., 2005; Vaziri y col., 2007).

1.8 Concepto de radical libre (RL)

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que tiene un electrón desapareado en su último orbital, por lo que es muy reactivo, ya que tiende a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Barry, 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007; Maldonado y col., 2010).

1.8.1 Mecanismos de formación de radicales libres.

Los RL se forman básicamente por tres mecanismos.

1.- Ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula, con retención de un electrón, del par de electrones compartidos por cada fragmento.

2.- Pérdida de un electrón

3.- Adición de un electrón

Los RL se generan principalmente por reacciones con transferencia de electrones, mediadas por acción enzimática, o también por la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre reducidos (reacción de Fenton y Haber Weiss) (Boberis, 2005; Cárdenas y Pedraza, 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007).

1.8.2 Tipos de radicales libres

Los radicales libres pueden ser generados a partir del oxígeno, especies reactivas de oxígeno (ERO); o a partir del nitrógeno, especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO)

El término ERO involucra no solo a los RL derivados a partir del oxígeno, también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que son

altamente reactivos. Las reacciones de RL se llevan a cabo a través de un mecanismo en cadena (Korc y col., 1995).

Uno de los RL de mayor interés desde el punto de vista biológico es el radical superóxido (O_2^-), que se forma por la reducción univalente del oxígeno; es decir cuando el oxígeno acepta un electrón. Esta especie es producida por un gran número de enzimas y por reacciones de autooxidación. A partir del anión O_2^- se forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 es poco reactivo, sin embargo a altas concentraciones tiene la capacidad de interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que tiene gran lipofilidad, la cual le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición para formar el radical hidróxilo (OH \cdot). Este radical es el más reactivo dentro de los sistemas biológicos, por lo que es capaz de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas (Drost, 1996; Vicent y col., 2004).

Tabla 3. Principales ERO

Especie	Símbolo
Radical superóxido	O_2^-
Radical hidroperóxido	HO_2^\bullet
Radical hidroxilo	OH^\bullet
Oxígeno singlete	$\frac{1}{2} O_2^\bullet$
Radical alcóxilo	RO^\bullet
Radical peróxido	ROO^\bullet
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2

Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Las principales ERN son el óxido nítrico (ON^\bullet) y el peroxinitrito (ONOO^\bullet); el ON^\bullet se forma a partir del aminoácido L- arginina por acción de la enzima citosólica óxido nítrico sintasa (NOS). Cuando el ON^\bullet se combina con el anión O_2^- , se produce el anión ONOO^\bullet que es un potente oxidante e induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad (Ansberg, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Tabla 4. Principales ERN

Especie	Símbolo
Oxido Nítrico	NO^\bullet
Peroxido de Nitrógeno	ONOO^\bullet
Dióxido de Nitrógeno	NO_2

1.8.3 Fuentes de radicales libres

El principal proceso biológico que conlleva a la generación de RL es la cadena de transporte de electrones, debido a que más del 95% del O_2 es utilizado por ella para realizar la fosforilación oxidativa. En la fosforilación oxidativa el oxígeno molecular actúa como aceptor final de electrones en el complejo IV para formar agua. Así el O_2 se reduce en cuatro etapas en cada una de las cuales se transfiere un electrón, sin embargo el transporte mitocondrial es imperfecto y la reducción monoelectrónica del O_2 genera el anión O_2^- . De esta manera la dismutación enzimática del O_2^- da lugar al H_2O_2 . Este también se forma en la membrana mitocondrial externa a causa de la desaminación oxidativa de las catecolaminas por la enzima monoamino oxidasa (Fang y col., 2002; Inue y col., 2003; Hernández, 2005).

La segunda fuente más importante de producción de RL, es el llamado estallido respiratorio, que tiene lugar en las células fagocíticas que son activadas por cualquier estímulo; es decir cuando los neutrófilos entran en contacto con una

molécula extraña se activan y aumentan su consumo de O_2 , y por acción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) que se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática, se genera el anión $O_2^{\cdot-}$. Por otro lado también se generan RL a partir de los xenobióticos, pues estos requieren intermediarios reactivos como los RL, para ejercer su acción tóxica. La formación de RL, es catalizada por la NADPH – citocromo P450 reductasa, que usa NADPH como donador electrónico, y genera un ciclo redox, en el que aumenta el consumo de NADPH y O_2 , y la producción de ERO (Drost, 1996; Martínez, 1998; Castillo, 2002; Kashihara y col., 2010).

Otros mecanismos en los cuales se generan ERO son: la oxidación de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico, reacción catalizada por la xantina oxidasa, durante la cual se acopla una reducción de O_2 a $O_2^{\cdot-}$; y la síntesis de prostaglandinas; que tiene al ácido araquidónico como sustrato, este puede ser metabolizado por la ciclo-oxigenasa o las lipo-oxigenasas, y origina diversas sustancias con propiedades vasoactivas; prostaglandinas (PEG_2 y PGI_2), tromboxanos (TXA_2 y TXB_2), prostaciclina y leucotrienos. En la transformación del ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos por acción de la ciclo-oxigenasa se produce el radical OH^{\cdot} (Drost, 1996).

1.9 Estrés oxidativo.

En condiciones fisiológicas una célula presenta un equilibrio entre las moléculas prooxidantes y antioxidantes (Koc y col.1995). No obstante se ha demostrado que en ciertas patologías crónicas como la DM existe un aumento considerable en la producción de RL, que conlleva a un desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y oxidantes, conocido como estrés oxidativo (EO), lo que produce daño celular por oxidación de las diferentes biomoléculas.

1.10 Biomoléculas Blanco.

1.10.1 Lípidos

Los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas celulares son particularmente susceptibles al ataque de los RL para formar radicales lipídicos e hidroperóxidos, que en presencia de metales de transición forman otros RL e inician una reacción en cadena. Por otra parte en ausencia de iones metálicos los hidroperóxidos pueden acumularse en la membrana y alterar su función, pueden transformarse en aldehídos, como el malondialdehído, que causa entrecruzamiento y polimerización de distintos componentes de la membrana, así como alteración en la permeabilidad y pérdida de la integridad de la membrana celular (González y col., 2000; Maldonado y col., 2010).

1.10.2 Proteínas

En las proteínas el daño es inducido, por la capacidad que tienen los RL de fragmentar los aminoácidos aromáticos, la cisteína, los enlaces disulfuro y los enlaces peptídicos, ocasionando la alteración de su estructura y la pérdida de su función. Uno de los radicales más reactivos contra las proteínas es el OH^\bullet , pues puede causar modificación en casi todos los residuos de aminoácidos, pero en particular ataca la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína, forma entrecruzamientos covalentes e induce a la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, y en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas (Martínez, 1998; González, 2000).

Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas, producto de la formación de grupos carbonilo, por oxidación de aminoácidos como la prolina, la arginina y la lisina. La presencia del grupo carbonilo es útil como parámetro para evaluar el daño oxidativo de las proteínas.

Las alteraciones conformacionales inducidas a las proteínas, se relacionan con la pérdida de la actividad catalítica de enzimas como la lisozima y la ribonucleasa. La

inactivación de enzimas y la acumulación intracelular de proteínas oxidadas juegan un papel crítico en la alteración de las funciones celulares y en la muerte celular. Es conocido que a nivel de la membrana plasmática, las alteraciones a las proteínas inducidas por RL, afectan a los transportadores, los canales proteicos, los receptores o proteínas reguladoras y a las proteínas inmunorreguladoras, lo que produce consecuencias letales para las células (Díaz y Membrillo, 2006).

1.10.3 DNA

El DNA es uno de los principales blancos de los RL en la célula, pues los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO, principalmente el radical OH^\bullet . El ataque de este radical al DNA, da como resultado una serie de productos finales como: 5-formamido-4,6 diamino pirimidina (FDP-Ade); 8- hidroxiguanina (8-OH-Gua), timina glicol (5,6-OH-tim) y 5,6- dihidroxi citosina (5-OH-Cit) (Fang y col., 2002). Entre las alteraciones al DNA se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o 2 de las hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) DNA-DNA ó DNA proteína. Si el daño que se produce en el DNA es tan grande que no puede ser reparado se producen mutaciones que pueden llevar a la muerte celular, (Martínez, 1998; Konigsberg, 2008).

1.11 Sistemas antioxidantes.

Los procesos que generan RL en el organismo son muy diversos. Sin embargo, el organismo posee sus propios mecanismos que le permiten contrarrestar los efectos nocivos de los RL, los cuales son llamados mecanismos de defensa antioxidante (Figura 6). Un antioxidante se define como aquella sustancia que se encuentra en bajas concentraciones con respecto a la concentración del substrato oxidable (biomolécula), y tiene la capacidad de retardar o evitar su oxidación.

Existen diferentes tipos de antioxidantes:

Antioxidantes endógenos; Son producidos por el organismo, entre ellos se encuentran los enzimáticos y los no enzimáticos como la albúmina; y los más importantes que son de tipo enzimático (Konigsbeg, 2008; Khalid, 2007; Pham, 2008), entre los principales se encuentran:

Superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima cataliza la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 . Forma parte de una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos, y le dan sus nombres específicos; así tenemos Cu/Zn SOD; Mn SOD y Fe SOD. Su mayor actividad se localiza en la mitocondria (Mn SOD, tetrámero) y en el citoplasma (Cu/Zn SOD, dímero). La actividad de SOD presenta diferencias entre los tejidos. La mayor actividad se encuentra en hígado, glándula adrenal, riñón y bazo.

Catalasa. Cataliza la conversión de H_2O_2 en agua, se encuentra principalmente en los peroxisomas. Tejidos como hígado, riñón y glóbulos rojos poseen altas concentraciones de esta enzima.

Glutación peroxidasa (GPx). Cataliza la reducción del H_2O_2 y de los peróxidos orgánicos libres, requiere glutación reducido (GSH) como sustrato. Esta enzima se encuentra en citoplasma y mitocondria

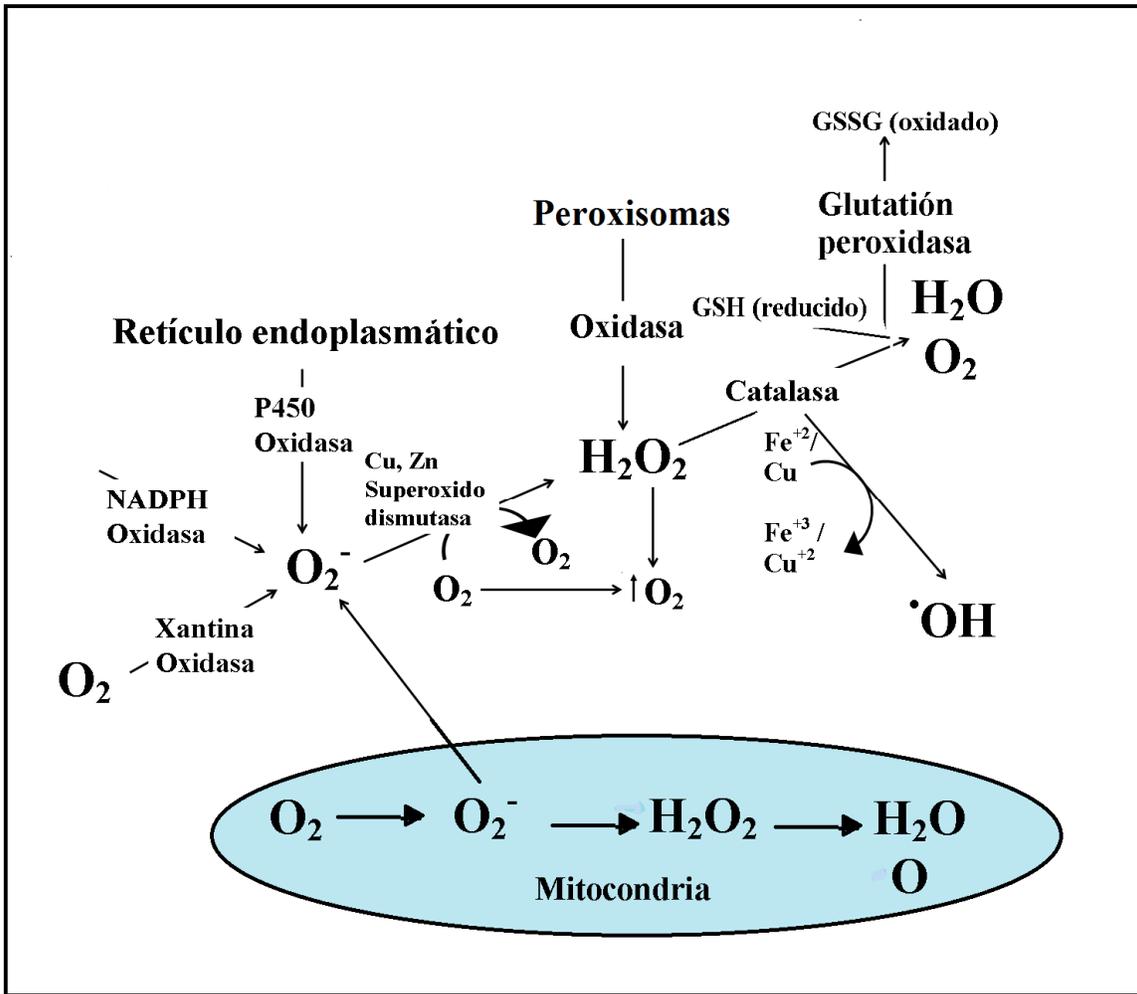


Figura 6. Generación y metabolismo de especies reactivas de oxígeno.

Antioxidantes exógenos. Se adquieren a partir de los alimentos, entre ellos se encuentran los polifenoles, los flavonoides, los carotenoides, el ácido ascórbico y los tocoferoles. Dentro de estos compuestos antioxidantes se ha considerado al α -tocoferol (vitamina E), como uno de los más importantes, por su potencial antioxidante.

Vitamina E. Los tocoferoles o vitamina E son antioxidantes lipofílicos y se definen como moléculas anfipáticas, con una cadena hidrofóbica asociada a las membranas y un grupo polar que permanece en la superficie de estas. Existen cuatro isoformas de tocoferoles (α , β , γ y δ), que difieren únicamente en la posición de los sustituyentes metilados del anillo cromanol (figura 7). Sin embargo,

el α tocoferol es la isoforma más abundante en la naturaleza, se encuentra principalmente en los aceites vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), en granos, en las partes verdes de las plantas y tejido adiposo de los animales (Febelles y col., 2002).

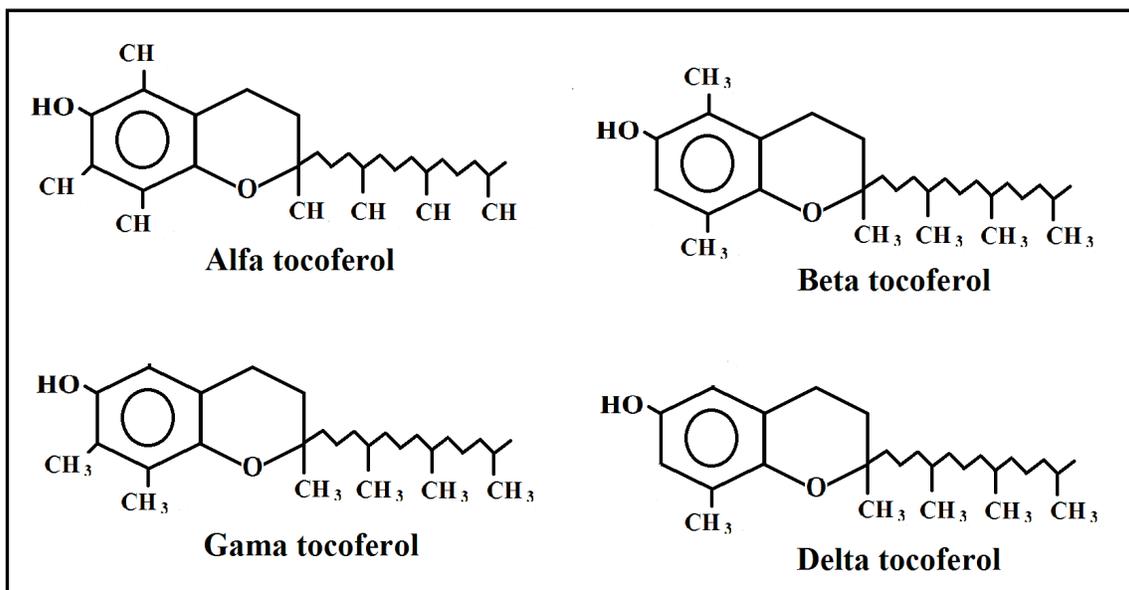


Figura 7. Estructura química de los tocoferoles.

Su actividad antioxidante radica en su capacidad de protección de las membranas celulares. El mecanismo de acción antioxidante consiste en la interrupción de las etapas de propagación y descomposición del proceso de autooxidación, pues los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de hidrógeno al radical peroxilo, dando como producto hidroperóxidos y radical tocoferoxilo estable, el cual puede donar un segundo electrón, que ocasiona la apertura del anillo cromanol y la formación de tocoferol quinona (González y col., 2008).

Así mismo los tocoferoles actúan como terminadores reciclables de las reacciones en cadena en la lipoperoxidación, pues los tocoferoles secuestran los radicales peroxilo lipídicos y el radical tocoferoxil formado, puede ser reciclado a tocoferol por ascorbato (Konigsberg, 2008), o por reacción del glutatión catalizado por la isoenzima hidroperóxido glutatión peroxidada selenio dependiente (Figura 8). Esta

propiedad de reciclaje le permite al tocoferol participar como terminador en muchas reacciones de peroxidación antes de ser degradado.

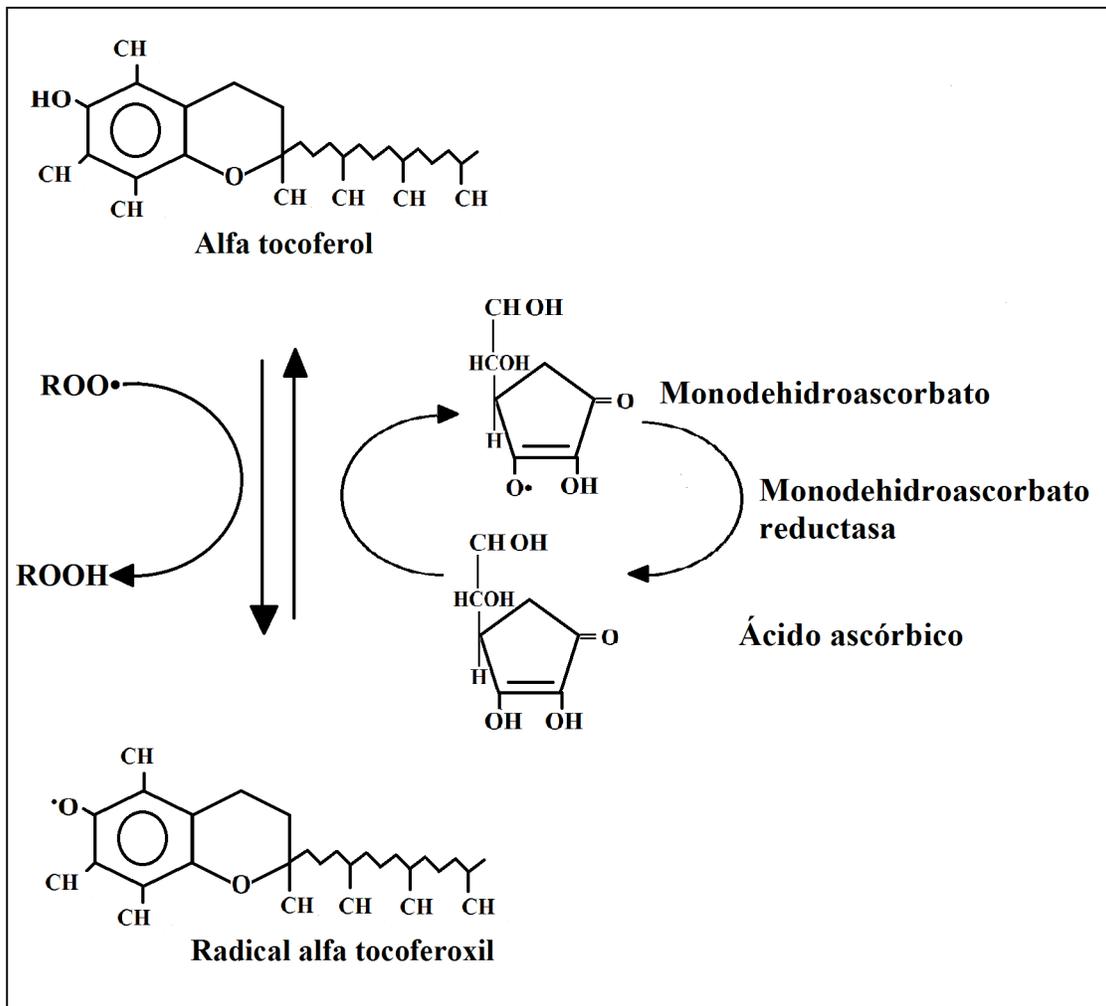


Figura 8. Reducción del radical tocoferoxil por acción del glutatión.

2. JUSTIFICACIÓN.

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más frecuentes de la DM y también la causa más frecuente de insuficiencia renal terminal (IRCT), a nivel mundial. En México la ND afecta al 40% de los pacientes con DM (Torres, 2002).

Los mecanismos que participan en el desarrollo de la ND son multifactoriales, entre estos mecanismos se encuentra el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia, a través de vías enzimáticas y no enzimáticas. Dentro de las no enzimáticas se encuentran la auto-oxidación de la glucosa, los fenómenos de glucosilación avanzada, la vía de los polioles y las alteraciones del metabolismo mitocondrial. En cuanto a las vías enzimáticas, destaca la vía de la NADPH oxidasa, una importante ruta de producción del anión superóxido a nivel celular y vascular y es activada por la angiotensina II. La angiotensina II no solo contribuye de manera directa en la progresión de la ND, por sus efectos hemodinámicos, también actúa por sus efectos no hemodinámicos ya que favorece el crecimiento celular, la inflamación y la fibrosis glomerular.

Por lo antes mencionado consideramos que es importante, que la terapéutica de los pacientes diabéticos no solo sea dirigido al control de los niveles sanguíneos de glucosa, también es importante el control del EO.

Existen antioxidantes naturales y suplementos vitamínicos, como la vitamina E que pueden ser administrados como complemento en la dieta, lo que posiblemente permitiría disminuir o retardar el daño renal. En estudios realizados en pacientes diabéticos y en modelos experimentales de DM, la administración de vitamina E disminuye la peroxidación de los lípidos en corazón e hígado y aumenta los antioxidantes totales en plasma (Wallinger y col. 2011).

3. ANTECEDENTES

Estudios recientes han mostrado la relación que existe entre la DM, el estrés oxidativo y el daño renal, a continuación se citan algunos de estos estudios:

- Cuerda y col. (2011) en una revisión bibliográfica concluyeron que los antioxidantes disminuyen la peroxidación lipídica en distintas poblaciones incluyendo pacientes diabéticas.

-Wallinger y col. (2011) observaron que la vitamina E disminuye significativamente el nivel de lipoperoxidación tanto en plasma como en homogenados de tejidos de corazón e hígado.

-Ore y col. (2000) demostraron que la vitamina E tiende a mejorar la glicemia, disminuir la hemoglobina glicosilada (HbiA1c) y la peroxidación lipídica, y aumenta los antioxidantes totales en suero, en el grupo diabético.

-Cruz y col. (2011) Determinaron que el mejor tratamiento para evitar el estrés oxidativo en los diabéticos y, en consecuencia retardar la aparición de complicaciones sería lograr un control metabólico óptimo, lo que puede lograrse mediante la inclusión en la alimentación de antioxidantes naturales.

-Johansen y col. (2005) indican que debe existir un enfoque hacia la prevención del estrés oxidativo; por lo que resulta beneficioso para los diabéticos la alimentación de antioxidantes o suplementos de estos en la dieta.

-Pazdro y Burgess (2010) sugieren que la vitamina E puede proteger contra la peroxidación lipídica, también encontraron una posible evidencia de efecto protector del páncreas, riñón, ojo y sistema nervioso. La vitamina E se obtiene en base a la ingesta de alimentos o suplementos en dosis recomendadas, y podría evitar o retardar el daño tisular renal.

4. HIPÓTESIS.

Con base los anteriores antecedentes, se presume que la hiperglucemia lleva a la sobreproducción de radicales libres, los cuales tienen una importante participación en el daño renal en los pacientes diabéticos, por lo que el suplemento alimenticio con vitamina E, retardara el daño renal.

5. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto antioxidante de la vitamina E en la morfología y función renal, y su relación con la angiotensina II.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Cuantificar la hipertrofia renal, mediante el peso renal fresco, el coeficiente de proteínas DNA y el área celular tubular en ratas diabéticas por cuatro semanas con administración oral de vitamina E.

Determinar la proteinuria y depuración de creatinina como indicadores de la función renal, en ratas diabéticas con administración oral de vitamina E.

Medir la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en la corteza renal de ratas diabéticas con administración oral de vitamina E.

Evaluar la expresión de los receptores AT1 y AT2 en médula y corteza renales de ratas diabéticas con administración oral de vitamina E.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Material Biológico.

Se utilizaron ratas *Rattus norvegicus* macho sanas, de la cepa Wistar, con un peso de 150 a 180 g, procedentes del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Las ratas se mantuvieron en jaulas colectivas, en el Laboratorio de Farmacología de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria En Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) con agua y comida *ad libitum* y un ciclo de 12 h luz/oscuridad, por un periodo de cuatro semanas.

6.2 Reproducción del modelo de DM y tratamiento con vitamina E.

Los animales fueron asignados al azar en cuatro grupos, cada uno de seis individuos. Un grupo control y tres grupos experimentales.

Para la reproducción del modelo de diabetes mellitus, los grupos de animales fueron sometidos a un ayuno de 8 h, se les midió la glucemia mediante una punción de la vena caudal, se obtuvo una gota de sangre que se colocó en una tira reactiva y ésta en el glucómetro (ACCU-CHEK Active, Roche), en seguida a los grupos experimentales se les administro por vía intraperitoneal (i.p) STZ en una sola dosis de 65 mg/Kg (Szkudelski, 2000), disuelta en amortiguador de citratos 10 mM, pH 4.5, al grupo control solo se le administro el buffer de citratos (Szkudelski, 2000).

Una vez transcurridas 48 h, los animales fueron puestos nuevamente en ayuno de 8 h para medir la glucemia; se considero a los organismos como diabéticos, si los niveles de glucemia eran igual o mayor a los 300 mg/dL. A partir del primer día en que se determino que los organismos eran diabéticos, se trataron con vitamina E, en dosis de 250 y 500 mg/Kg, el tratamiento se administró por vía oral diariamente por cuatro semanas (tiempo que duró el experimento).

Los grupos de animales se pesaron cada tercer día (lunes, miércoles y viernes) y se midió la glucemia una vez a la semana, de igual manera periódicamente las

ratas se colocaron en jaulas metabólicas por 24 h, para medir el consumo de alimento y de agua, y el volumen de orina.

La orina se utilizó para cuantificar proteinuria y creatinina. A los 28 días los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (45 mg/kg), posteriormente se colocaron en una tabla de disección y con pinzas y tijeras quirúrgicas se realizó una incisión en la región abdominal, y se obtuvieron muestras de sangre de la aorta abdominal, las cuales fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min, para la obtención del plasma y se tomaron alícuotas de 400 μ L que fueron almacenadas a -80°C, así mismo se extrajeron ambos riñones, los cuales fueron descapsulados y pesados, posteriormente se separó la médula y la corteza y se almacenaron a -80°C.

6.3 Determinación de la hipertrofia renal (HR)

La hipertrofia renal se evaluó de tres formas;

- 1) Se pesó el riñón descapsulado y se obtuvo la relación del peso del riñón sobre el peso corporal.
- 2) Se midió el área de las células del túbulo proximal.
- 3) Se determinó el coeficiente de proteínas/DNA.

6.3.1 Estudio histológico.

Para determinar el área de las células del túbulo proximal uno de los riñones obtenidos (riñón izquierdo) fue cortado sagitalmente y una de las mitades se fijó en para- formaldehído al 4% y se procedió a deshidratar el tejido renal en un tren de alcoholes de concentración ascendente (apéndice 5), después ya deshidratados los tejidos se incluyeron en parafina, posteriormente se realizaron cortes de 5 μ m con el micrótopo de rotación, se colocaron en portaobjetos los cuales se pusieron en rejillas, se pasaron por un tren de alcoholes de concentración descendente y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (apéndice 6), posteriormente se montaron con resina Entellan y se dejaron secar durante una semana, los cortes fueron observados en un microscopio óptico (40x) y se tomaron fotomicrografías para

medir el área de las células del túbulo proximal, con ayuda del software Motic imágenes plus 2.0 ML.

6.3.2 Aislamiento de DNA por el método de TRIZOL Reagent.

Se homogeneizaron 100 mg de corteza renal en 1 mL de TRIZOL Reagent C Invitrogen, después se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se agregaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó por 15 s y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C, se removió la fase acuosa y se precipitó el DNA por adición de 0.3 mL de etanol (100%), se mezcló por inversión y se incubó 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 x g por 5 min a 4°C y se removió el sobrenadante. La pastilla (DNA) fue lavada con citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10%, tres veces, durante 30 min, con agitación continua; se centrifugó durante 5 min a 2000 x g a 4°C entre cada lavado. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 1.5 mL de etanol al 75% por 15 min, se centrifugó a 2000 g x durante 5 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se agregaron 400 µL de NaOH 8 mM y se resuspendió nuevamente, finalmente se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4°C, y con un espectrofotómetro se leyó la absorbancia del sobrenadante a 260 y 280 nm.

6.4 Determinación de la función Renal.

Para determinar la función renal se cuantificaron; 1) proteínas en orina y 2) creatina en plasma y orina.

6.4.1 Cuantificación de proteínas en orina.

Con el micrométodo modificado de Bradford (1976) se determinó la proteína en orina; realizando una curva de calibración de albúmina (0-100 µg/µL) y para las muestras se agregaron 5 µL de orina, 155 µL de buffer PBS 1X, tanto a las muestras como a la curva se les agregaron 40 µL de reactivo de Bradford, se mezclaron y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placa de ELISA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) La concentración de proteínas se determinó por interpolación de las muestras en la curva estándar (apéndice 1).

6.4.2 Cuantificación de creatinina.

Se realizó la cuantificación de creatinina en plasma y orina con el método cinético colorimétrico de tiempo fijo. En la cuantificación de creatinina en orina es necesario diluir las muestras 1:10. En los pozos de una placa de ELISA se colocaron alícuotas de 15 µL de las diluciones de las muestras, se agregaron 150 µL de solución de picrato alcalino y se dejó en agitación por 10 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 490- 500 nm, posteriormente se agregaron 5 µL de ácido sulfúrico, se incubó por 10 min y se leyó la absorbancia a 490- 500 nm (apéndice 3). Para la cuantificación de creatinina en plasma se tomó una alícuota de 15 µL de muestra y se depositó en los respectivos pozos de una placa de ELISA, se agregan 100 µL de buffer de reacción, 100 µL de color reactivo (ácido picrico) y transcurrido un minuto se leyó la absorbancia a 490- 500 nm, finalmente se incubó por siete minutos a temperatura ambiente y se volvió a leer la absorbancia a 490- 500 nm. Las absorbancias de las muestras experimentales se interpolaron en las respectivas curvas.

6.5 Determinación por inmunoblot (Western blot) de la expresión de los receptores AT1 y AT2 en médula y corteza renal

6.5.1 Homogeneización de corteza y médula renal.

Se pesaron 100 mg de tejido, se colocaron en tubos Eppendorf, y se le añadió 1 mL de solución Tris HCl 0.1M, pH 7.4, con una mezcla de inhibidor de proteasas (pastillas Mini Complete, Roche), posteriormente se homogenizó el tejido con un homogeneizador (IKA® T10 basic Ultra-Turrax) a 4°C a una velocidad de 10,000 a 12,000 rpm, en tres repeticiones de 10 s cada una. Posteriormente se centrifugaron en la microcentrifuga (Eppendorf 5418), a 4°C a 5,000 rpm durante 10 min, con el sobrenadante se hicieron alícuotas de 200 µL, unas se conservaron para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (apéndice 2), y a las demás se les adicionó 20 µL de buffer Laemli (de carga) con β-mercaptoetanol al 10%, se agitaron, posteriormente se hirvieron en una placa térmica por 10 min para desnaturalizar las proteínas y se almacenaron a -80° hasta su uso.

6.5.2 Separación de proteínas por electroforesis

Se prepararon los geles de poliacrilamida al 10 %, el gel separador y el gel concentrador (apéndice 7), una vez solidificados se colocaron en la cámara de electroforesis (BioRad) y se lleno con un buffer 1X de corrida, se colocó una guía de inyección de muestras, para llenar los pozos, el primero con 5 μ L de proteínas marcadoras de peso molecular (Biorad) y el resto con las muestras hervidas anteriormente (colocando el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína), se conecto la cámara de electroforesis a una fuente de poder Power PacTM HC BioRad y se corre la electroforesis a 88 voltios por 120 min. Una vez terminada la electroforesis, se despegó el gel de los cristales, se separó el gel de concentración y se sumergió en el buffer de transferencia.

6.5.3 Transferencia a la membrana (PVDF).

Una vez terminada la electroforesis las proteínas separadas se transfirieron a las membranas (Amersham HybondTM-P GE Healthcare) de fluoruro de polivinidieno (PVDF), utilizando un sistema semiseco (Trans-blot SD BioRad) durante 60 min a 18 voltios. Para este procedimiento se lavaron las membranas con metanol absoluto por 5 min, y posteriormente con agua destilada; se sumergieron en solución de transferencia fría junto con los papeles filtro. Las membranas de PVDF, el gel y los papeles se colocaron en forma de sándwich (figura 8) en la cámara de transferencia por 60 min, a 18 voltios.

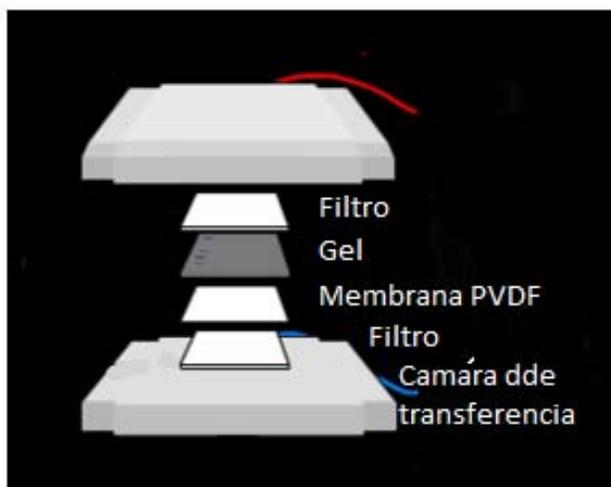


Figura 9. Disposición de los filtros, el gel y la membrana PVDF en la cámara de transferencia.

6.5.4 Bloqueo de la membrana.

Al término de la transferencia se desecharon los geles y se bloquearon las membranas con leche descremada al 5 % en TBST (amortiguador Tris salino suplementado con Tween al 20%) durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante, en seguida se incubaron con el anticuerpo primario (IgG policlonal de conejo) contra los AT₁R y AT₂R y β-actina durante 18 h a 4°C a una dilución 1:400, después las membranas se enjuagaron tres veces con TBST con intervalos de 5 min, con agitación constante (agitador Labnet Orbit LS) y se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG policlonal cabra-anticonejo) para AT₁R y AT₂R y β-actina durante 2 h a temperatura ambiente a una dilución 1:1000, transcurrido el tiempo se volvieron a enjuagar con TBST tres veces y una con TBS en periodos de 5 min, con agitación constante.

6.5.5 Revelado

El revelado se realizó en un cuarto oscuro, las membranas se colocaron en un hypercassette, se les agregó Luminol (Invitrogen) y se colocó una película encima de cada membrana, se cerró el cassette por 5 min, posteriormente se sacó la película y se sumergió en la solución reveladora Kodak durante 3 min, se enjuagó con agua desionizada y se sumergió en solución fijadora Kodak por 1 min; nuevamente se enjuagó y se dejó secar, después se comparó con el marcador de peso molecular para identificar la proteína de interés, se escaneó la película y se analizó con un densitómetro de geles (BioSens SC 645). Se realizó el cociente entre la densitometría del receptor (AT₁ y AT₂) y la de la β-actina.

6.6 Estudio de la actividad de las enzimas antioxidantes.

6.6.1 Homogeneizado de corteza renal

Se pesaron 100 mg de corteza renal, se colocaron en tubos Eppendorf, y se le añadió 1mL de amortiguador de fosfatos 66.6 mM, pH 7 con una mezcla de inhibidores de proteasas (pastillas Mini Complete, Roche), posteriormente se homogeneizó el tejido en frío con un homogeneizador (IKA® T10 basic Ultra-Turrax) a 4°C a una velocidad de 10,000 a 12,000 rpm, en tres repeticiones de 10

s cada una. Posteriormente se centrifugaron en la microcentrifuga (Eppendorf 5418), a 4°C a 5,000 rpm durante 10 min, se hicieron alícuotas de 200 µL, y se conservaron a -80°C para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes.

6.6.2 Catalasa

La actividad de la catalasa se determinó mediante una técnica cinética (apéndice 8), se basa en la desaparición de peróxido de hidrógeno, el cual absorbe luz en la región ultravioleta, con un pico a 240 nm. Se corrigió por concentración de proteínas en la muestra y se reportó como UI/mg proteína (Aebi, 1983)

6.6.3 Superóxido Dismutasa (SOD)

Se determinó la actividad enzimática de la SOD con un método colorimétrico (apéndice 9), basado en la reacción de la xantina oxidasa (XOD) que reduce el nitroazul de tetrazolio, esta reducción se inhibe por acción de la SOD (Beauchamp y Fridovich, 1971).

6.6.4 Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx se determinó mediante un método cinético (apéndice 10). La GPX consume glutación y como cofactor oxida NADPH. Esta reacción se acopla con la reacción de glutación reductasa, que regenera al cofactor (Paglia y Valentine, 1967). La reacción es estequiométrica y se registra a 340 nm.

6.7 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD), para determinar la significancia entre los grupos; se consideró una diferencia significativa si $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Reproducción del modelo de DM

La cuantificación de la glucosa sanguínea en los grupos de ratas, antes de la administración de la STZ, presentó valores de $119.4 \text{ mg/dL} \pm 7.78$ y $123 \text{ mg/dL} \pm 5.85$. A las 48 h, los organismos que fueron administrados con STZ tuvieron un incremento significativo en la concentración de glucosa ($406.5 \text{ mg/dL} \pm 35.43$), respecto al grupo control ($121.6 \text{ mg/dL} \pm 7.78$). A lo largo del experimento la concentración de glucosa en el grupo de ratas diabéticas se mantuvo en un intervalo mayor a los 450 mg/dL de glucosa mientras que el grupo control inyectado con el buffer de citratos no presentó cambios significativos en los niveles de glucosa sanguínea (figura 10).

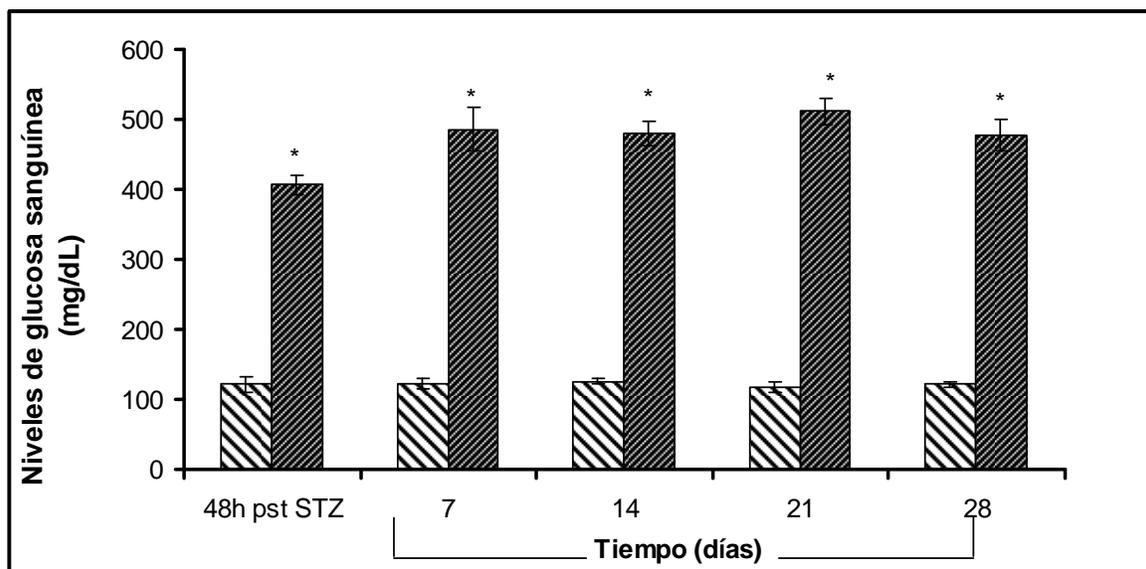


Figura 10. Efecto de la STZ sobre la concentración de glucosa sanguínea, durante cuatro semanas. ▨ Control, ▩ Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, $n=6$, $*p<0.05$ respecto al control.

La ingesta de alimento y agua durante 24 h para el grupo control fue $23.23 \text{ g} \pm 0.193$ y $81.4 \text{ mL} \pm 14.52$ respectivamente, mientras que para el grupo diabético ambos parámetros fueron mayores, ($39.92 \text{ g} \pm 0.54$ y $161.16 \text{ mL} \pm 16.54$) respectivamente (figura 11-12).

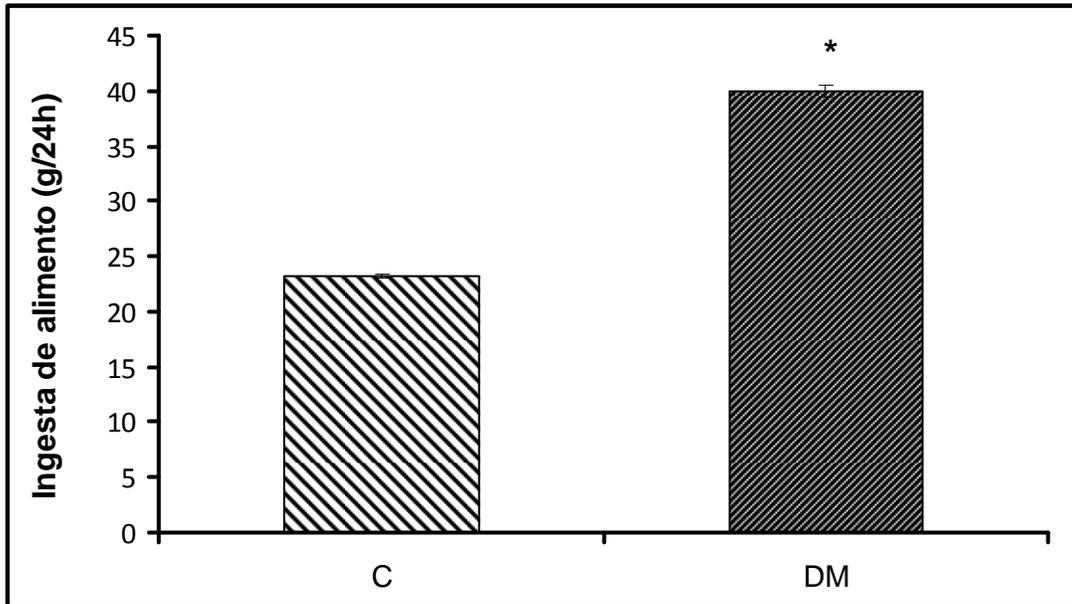


Figura 11. Efecto de la STZ sobre la ingesta promedio de alimento durante 24 h. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control.

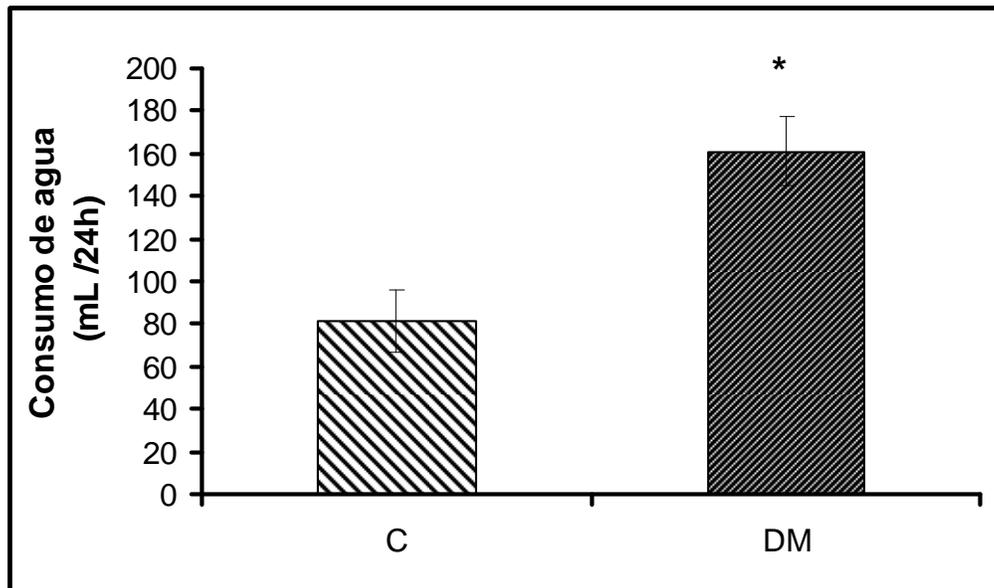


Figura 12. Efecto de la STZ sobre el consumo promedio de agua durante 24 h. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control.

El volumen de orina colectado por 24 horas fue mayor significativamente en el grupo DM (89.3 mL \pm 14.3) con respecto al grupo control (7.8 mL \pm 1.12) (figura 13).

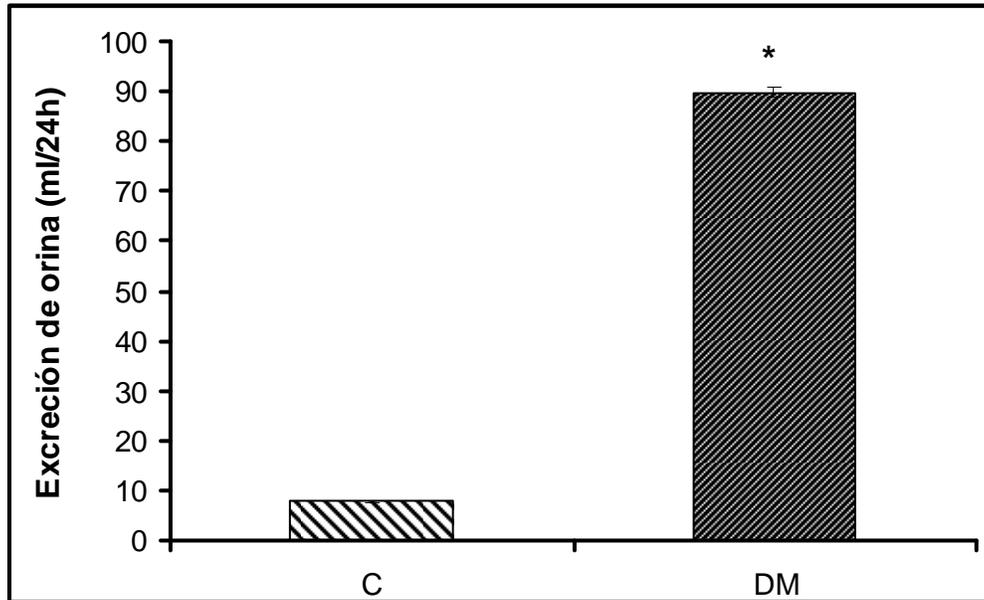


Figura 13. Efecto de la STZ sobre la excreción promedio de orina durante 24 h. en ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control.

7.2 Efecto de la vitamina E sobre la DM

La glucemia cuantificada a las 48 h después de la administración de STZ, fue de 406.5 mg/dL \pm 35.43 en el grupo diabético, 405.8 mg/dL \pm 18.24 en el grupo con 250 mg/Kg de vitamina E y 405.4 mg/dL \pm 23.78 con 500 mg/Kg de vitamina E; respecto al grupo control (121.6 mg/dL \pm 7.78), dichos valores se mantuvieron a lo largo del experimento (figura 14). La ingesta de alimento y agua medida a las 24 h en el grupo control fue 23.23 g \pm 0.193 y 81.4 mL \pm 14.52, y ambos parámetros aumentaron significativamente en el grupo DM (39.92 g \pm 0.54 y 161.16 mL \pm 16.54). En los grupos DM tratados con vitamina E en dosis de 250 y 500 mg/kg ambos parámetros aumentaron (38.04 g \pm 2.48 y 169.8 mL \pm 10.36; 36.61 g \pm 2.30 y 167.6 mL \pm 10.72 respectivamente), respecto al grupo control, pues dichos valores son semejantes a las diabéticas (figura 15-16).

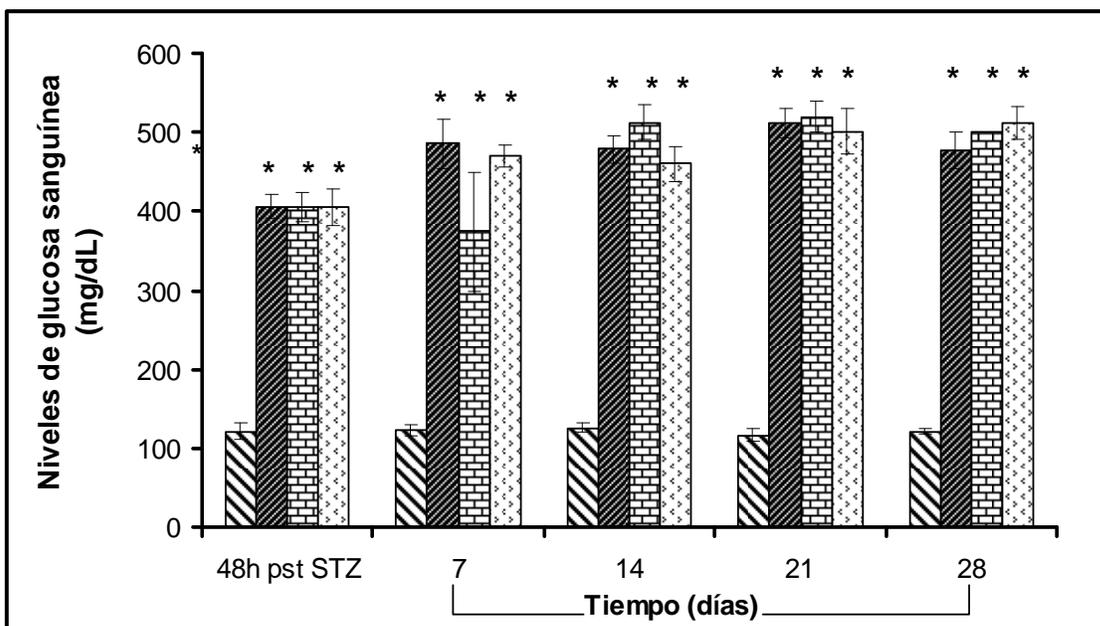


Figura 14. Efecto de la vitamina E sobre la hiperglucemia producida por la administración de STZ durante 28 días, en ratas diabéticas. ▨ Control, ▩ Diabéticas ▧ DM+ Vit. E (250 mg/kg), ▦ (DM+ Vit. E 500 mg/kg). Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control.

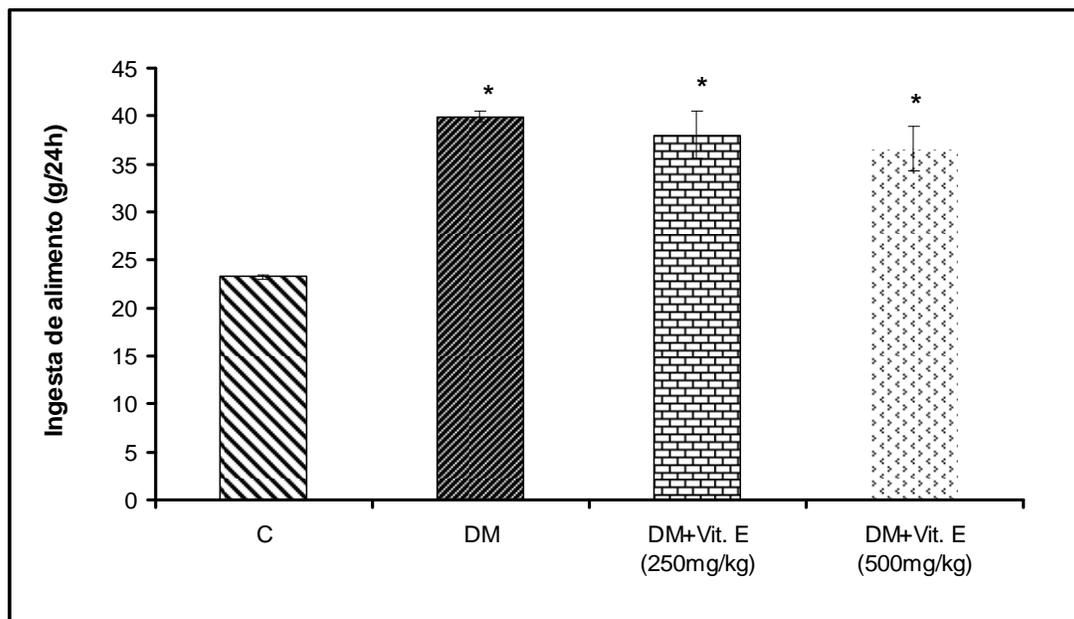


Figura 15. Efecto de la vitamina E sobre la ingesta promedio de alimento durante 24 h. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p=0.05 con respecto al control.

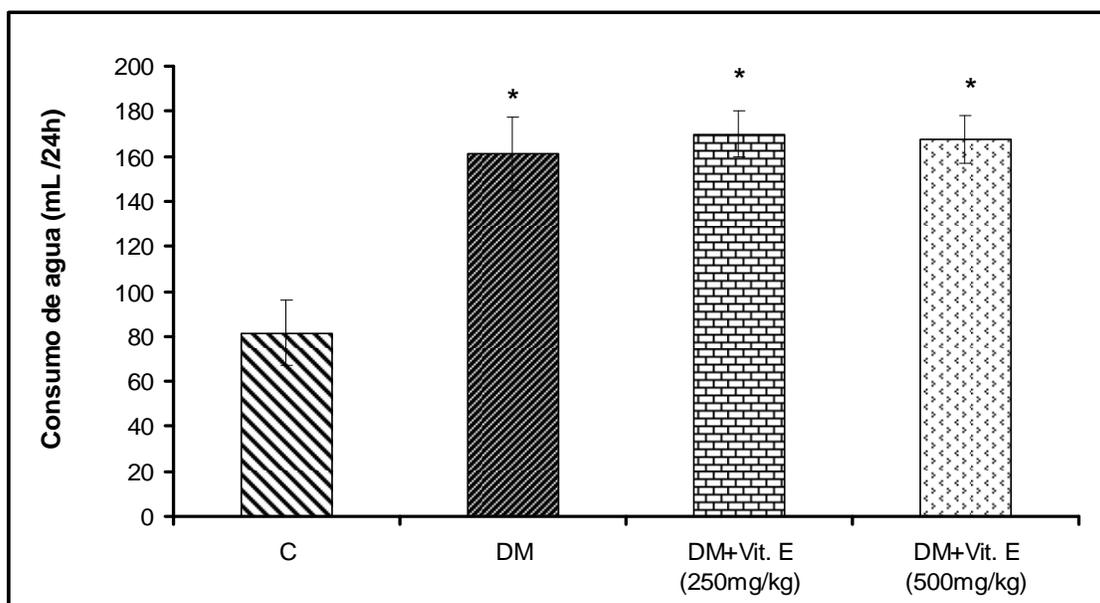


Figura 16. Efecto de la vitamina E sobre el consumo promedio de agua durante 24 h. C=Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control

El volumen de orina excretado en 24 horas fue mayor en el grupo DM (89.83 mL \pm 14.3), respecto al grupo control (7.8 mL \pm 1.12); los grupos tratados con vitamina E en ambas dosis (250 y 500 mg/kg) presentaron un aumento significativo en el volumen de orina (124 mL \pm 8.1 y 120 mL \pm 10.95 respectivamente), en comparación al grupo MD y control (figura 17).

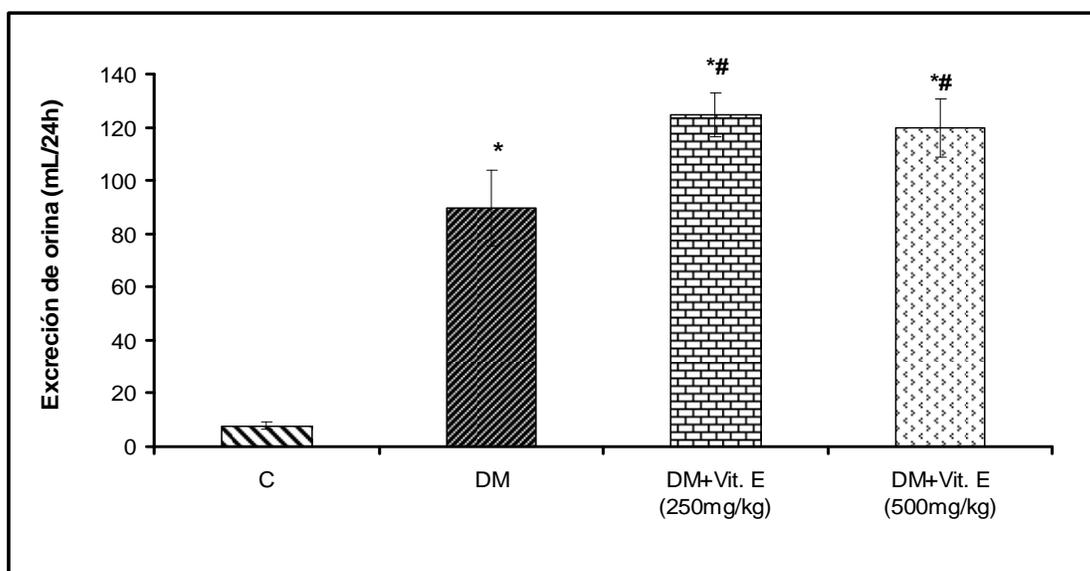


Figura 17. Efecto de la vitamina E sobre la excreción promedio de orina durante 24 h. en ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control, # p<0.05 respecto del DM.

Con estos datos se puede concluir que la vitamina E no modificó los signos característicos de la DM; pues persistieron la hiperglucemia, la polidipsia, la polifagia y la poliuria, como en el grupo diabético sin tratamiento con vitamina E. El peso de las ratas diabéticas disminuyó significativamente hasta finalizar el experimento ($213.8 \text{ g} \pm 24.96$), en comparación con el grupo control ($341 \text{ g} \pm 10.55$), que mantuvo un aumento de peso constante. Los grupos tratados con vitamina E, aumentaron de peso en relación al grupo DM, el cual fue mayor en la dosis de 500 mg/kg ($263.8 \text{ g} \pm 8.81$), respecto al grupo de vitamina E en dosis de 250 mg/kg ($246 \text{ g} \pm 14.63$) (figura 18).

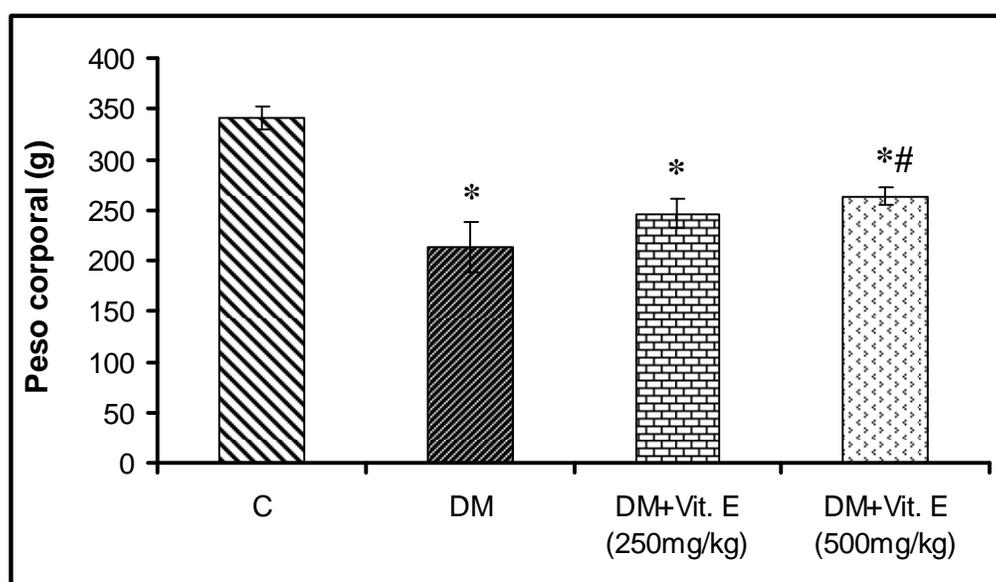


Figura 18 Efecto de la vitamina E sobre el peso corporal de ratas con 28 días de DM. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control; # p<0.05 con respecto al DM.

7. 3 Hipertrofia renal

El peso del riñón del grupo de ratas con DM aumentó en relación al grupo control, ($4.87 \text{ mg/g} \pm 0.22$ y $3.19 \text{ mg/g} \pm 0.25$ respectivamente). Para los grupos tratados con vitamina E, en dosis de 250 y 500 mg/kg, el peso de los riñones fue menor en relación al grupo diabético ($4.31 \text{ mg/g} \pm 0.18$ y $4.16 \text{ mg/g} \pm 0.27$ respectivamente) (figura 19).

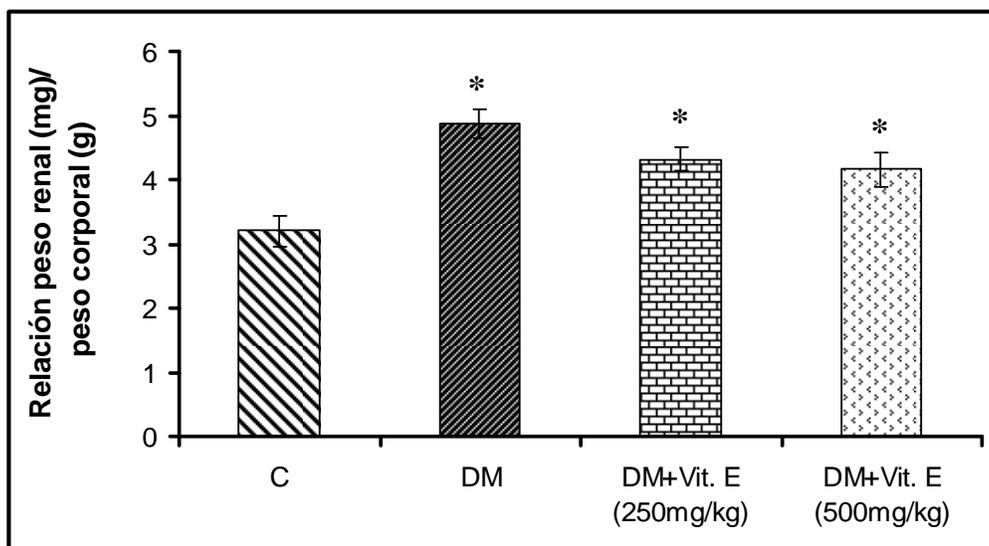


Figura 19. Efecto de la vitamina E sobre el peso del riñón en ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control.

El cociente de proteínas/DNA fue mayor en las ratas diabéticas (0.2768 u.a. \pm 0.018) en relación al grupo control (0.20 u.a. \pm 0.003). En los grupos con DM tratados con vitamina E en dosis de 250 y 500 mg/kg dicho parametro fue menor significativamente (0.1865 u.a. \pm 0.010 y 0.2054 u.a. \pm 0.020); respecto a las ratas diabéticas (figura 20).

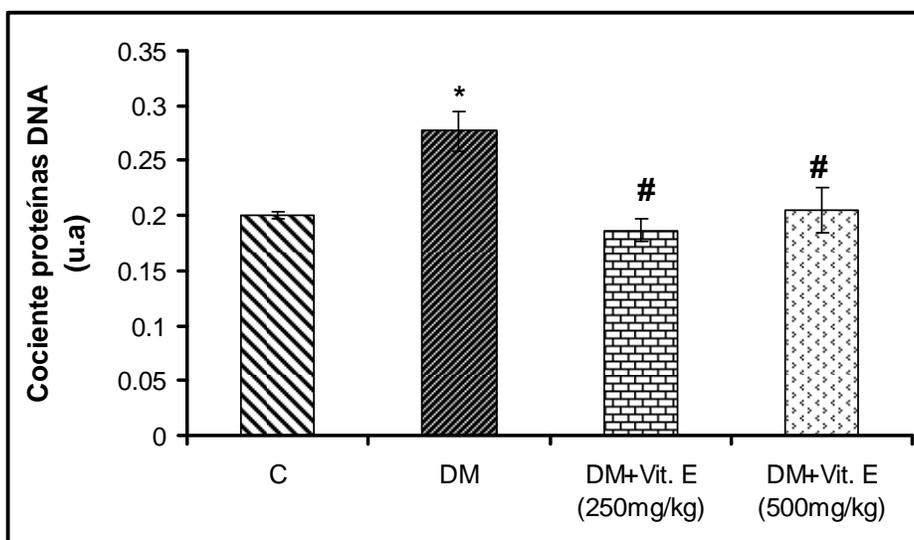


Figura 20. Efecto de la vitamina E sobre el cociente de proteínas/DNA en las ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 con respecto al control; # p<0.05 con respecto al DM.

El área celular de los túbulos proximales fue mayor significativamente en el grupo con DM ($84.72 \mu\text{m}^2 \pm 1.82$), respecto a las ratas control ($68.81 \mu\text{m}^2 \pm 1.73$). En los grupos con DM tratados con vitamina E, a la dosis de 250 y 500 mg/kg, el área celular fue de ($84.72 \mu\text{m}^2 \pm 1.82$ y $69.43 \mu\text{m}^2 \pm 0.84$ respectivamente). Por lo tanto se observó una disminución en el área celular de los tubulos proximales respecto a las ratas diabéticas (figura 21 y 22).

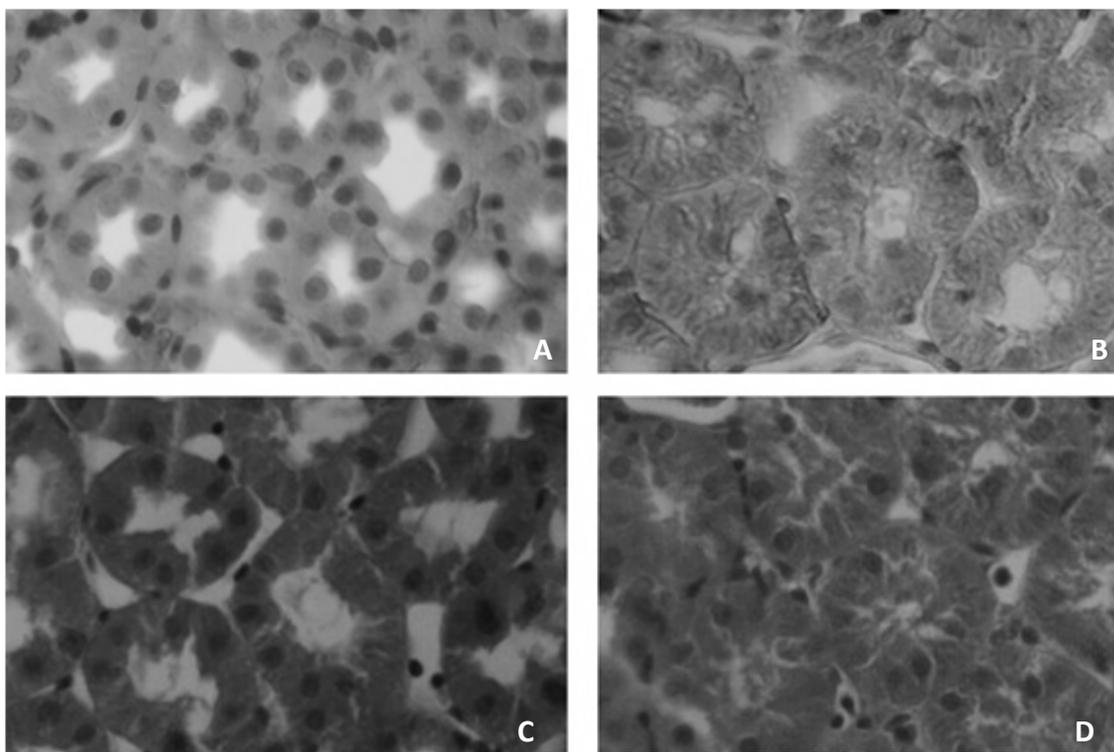


Figura 21. Microfotografía representativa de los cortes de riñón teñido por la técnica de Hematoxilina - Eosina (40X). A) Control, B) Diabéticas, C) DM + vit. E 250 mg/kg y D) DM + vit. E 500 mg/kg.

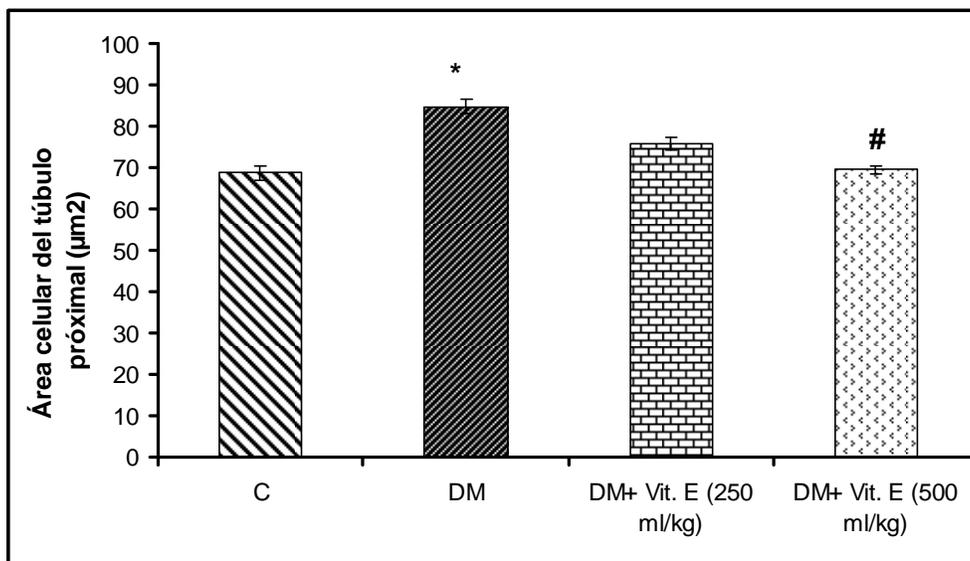


Figura 22. Efecto de la vitamina E sobre el área celular de los túbulos proximales en ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM.

7.4 Función renal

Las ratas diabéticas presentaron un aumento significativo de proteinuria (34.43 mg/24h \pm 4.57) respecto al grupo control, cuyo valor fue de 23.94 mg/24h \pm 3.36; los grupos DM tratados con vitamina E con ambas dosis (250 y 500 mg/Kg) presentaron una disminución significativa respecto al grupo DM. En el grupo tratado con vitamina E en dosis de 500 mg/kg, el valor de la proteinuria fue menor (11.32 mg/h \pm 2.59), que el grupo tratado con vitamina E en dosis de 250 mg/kg (24.99 mg/24h \pm 3.10), como se observa en la figura 22.

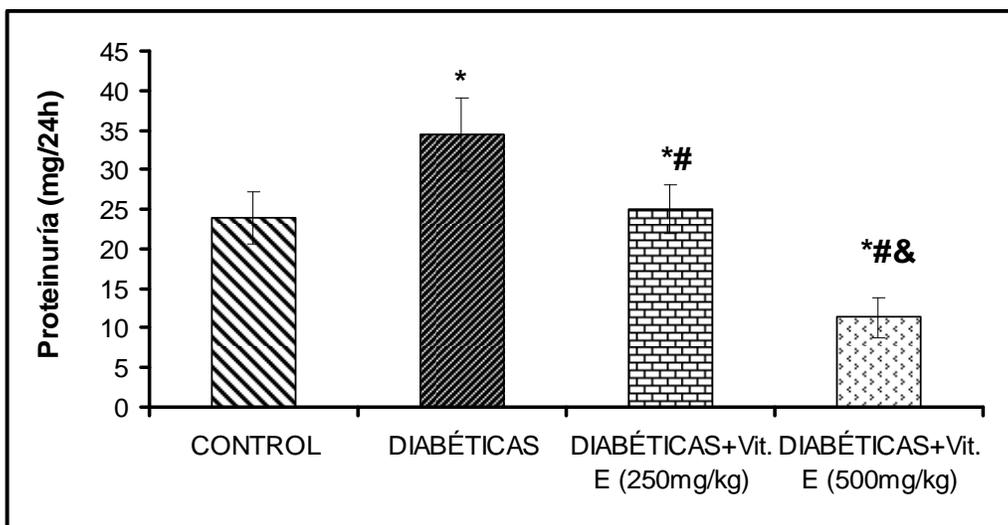


Figura 23. Efecto de la vitamina E sobre la excreción de proteínas en orina de 24 h C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM; &p<0.05 respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

La depuración de creatinina fue menor significativamente en el grupo diabético en comparación con el grupo control (21.32 mL/min. \pm 4.94 y 86.79 mL/min. \pm 14.75 respectivamente). Los grupos con DM tratados con vitamina E con ambas dosis aumentaron la depuración de creatinina, la cual fue mayor de manera significativa con la dosis de 500 mg/Kg (96.31 mL/min \pm 4.52), respecto a la dosis de 250 mg/kg (77.26 mL/min \pm 15.71) y al grupo DM (figura 24).

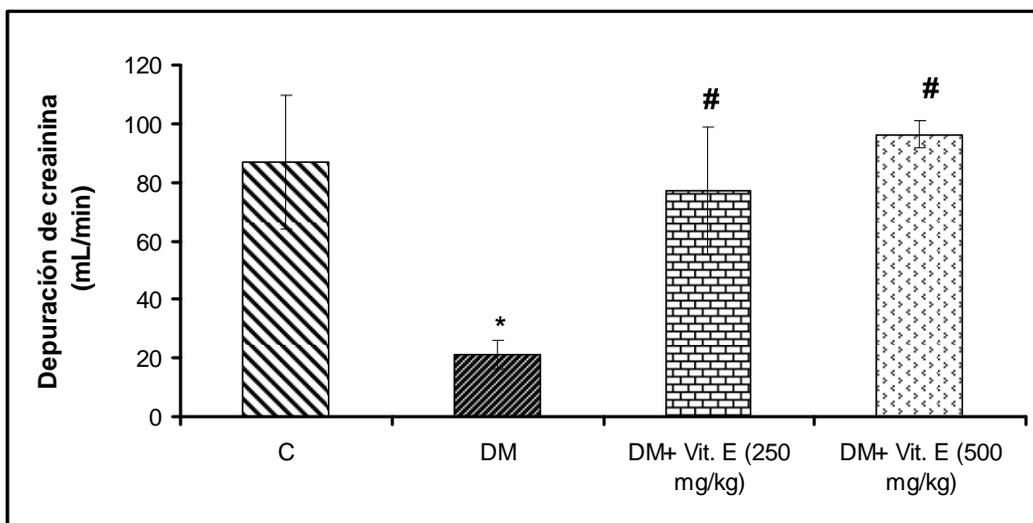


Figura 24. Depuración de creatinina de las ratas diabéticas, con administración de vitamina E. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM.

7.5 Actividad de las enzimas antioxidantes

a) Catalasa

En el grupo de ratas diabéticas disminuyó la actividad de la catalasa ($63.36 \text{ UI/mg} \pm 9.82$), con respecto al grupo control ($89.20 \text{ UI/mg} \pm 6.08$). El grupo tratado con vitamina E con dosis de 250 mg/kg no presentó diferencias significativas ($67.23 \text{ UI/mg} \pm 19.58$), en relación al grupo DM. El grupo que recibió la dosis de 500 mg/kg , tuvo un aumento de la actividad enzimática de la catalasa ($78.31 \text{ UI/mg} \pm 4.20$), con respecto a las ratas diabéticas y a las tratadas con vitamina E con dosis de 250 mg/kg (figura 25).

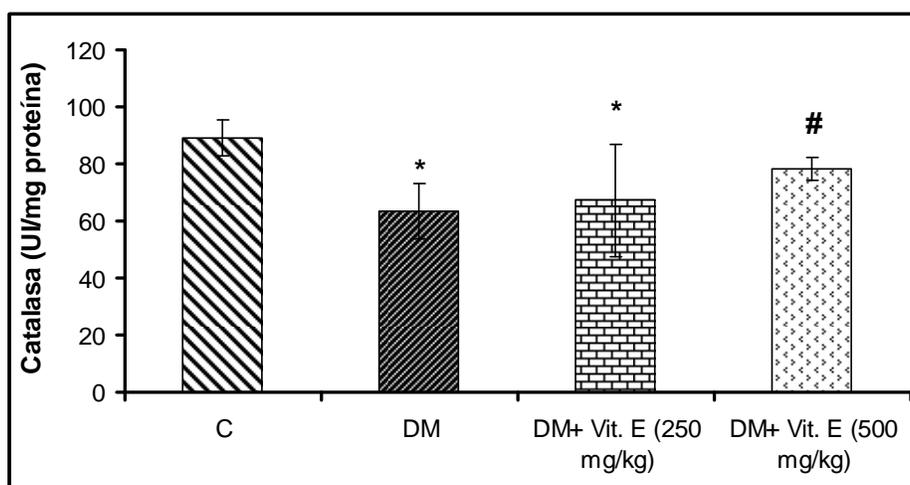


Figura 25. Actividad enzimática de la catalasa en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, $n=6$, $*p<0.05$ respecto al control; $\#p<0.05$ respecto al DM; $\&p<0.05$ respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

b) Superóxido dismutasa

El grupo de ratas diabéticas tuvo una disminución significativa en la actividad de la SOD ($18.07 \text{ UI/mg} \pm 2.32$) respecto al grupo control ($24.89 \text{ UI/mg} \pm 1.29$). Los grupos con DM tratados con ambas dosis de vitamina E aumentaron la actividad de la SOD, dosis de 250 mg/kg ($28.49 \text{ UI/mg} \pm 0.94$) y dosis 500 mg/kg ($30.73 \text{ UI/mg} \pm 4.35$) respecto al grupo de ratas diabéticas (figura 26).

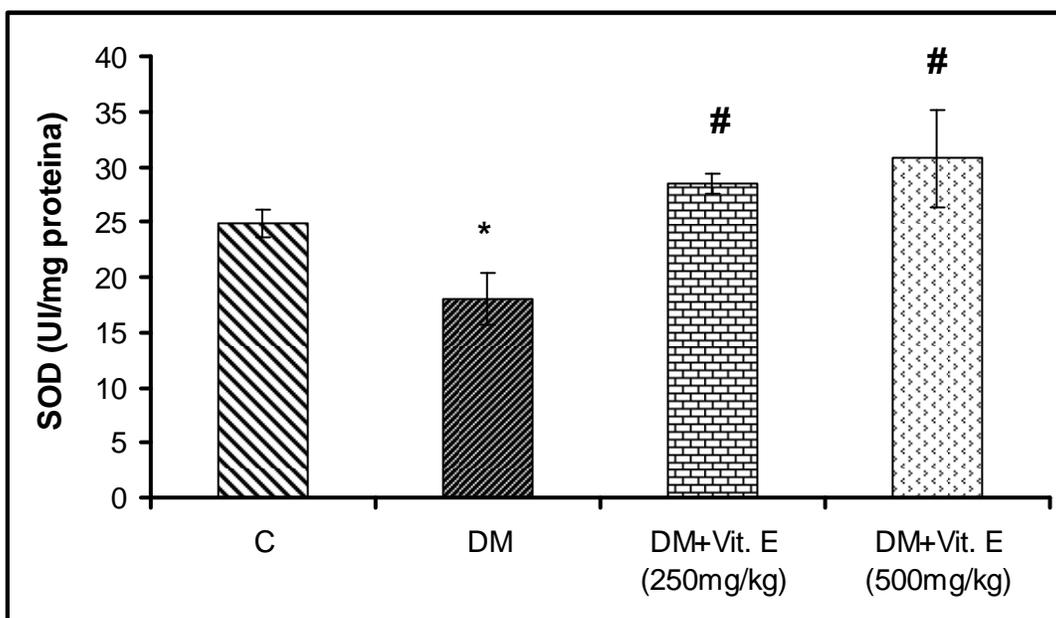


Figura 26. Actividad enzimática de la SOD en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E.. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM; &p<0.05 respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

c) Glutación peróxidasa

En el grupo de ratas diabéticas disminuyó la actividad de la GPx ($638.29 \text{ UI/mg} \pm 199.07$), en relación al grupo control ($2215.53 \text{ UI/mg} \pm 271.20$). La actividad de la GPx en los grupos DM tratados con vitamina E con ambas dosis (250 y 500 mg/kg) aumentó significativamente ($1508.05 \text{ UI/mg} \pm 167.45$ y $2228.86 \text{ UI/mg} \pm 243.08$ respectivamente) en comparación al grupo diabético (figura 27).

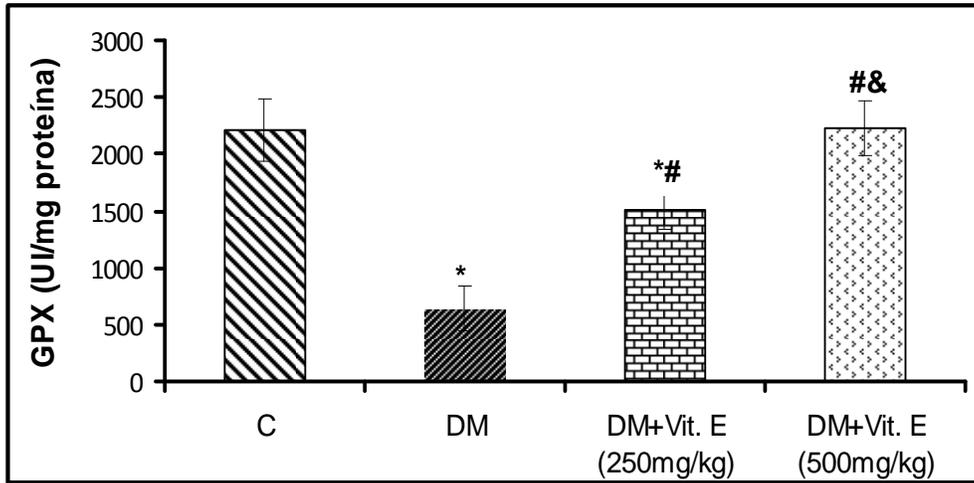


Figura 27. Actividad enzimática de la GPx en corteza renal de ratas diabéticas tratadas con vitamina E. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM; &p<0.05 respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

7.6 Expresión de los AT₁R y AT₂R por inmunoblot

a) AT₁R

Se puede observar que la expresión del AT₁R fue mayor significativamente en médula y corteza renal del grupo diabético (1.54 ur. \pm 0.15 y 1.10 ur. \pm 0.10 respectivamente), en comparación al grupo control (1.03 ur. \pm 0.085 y 0.86 ur. \pm 0.11), el grupo DM tratado con vitamina E con dosis de 250 mg/kg presentó una disminución (0.92 ur. \pm 0.03 y 0.80 ur. \pm 0.25) en relación al grupo diabético, en el grupo DM que recibió la dosis de vitamina E de 500 mg/kg, la expresión de este receptor fue menor (0.58 ur. \pm 0.12 y 0.52 ur. \pm 0.10) en relación al grupo diabético y al tratado con dosis de vitamina E 250 mg/kg (figuras 28 y 29).

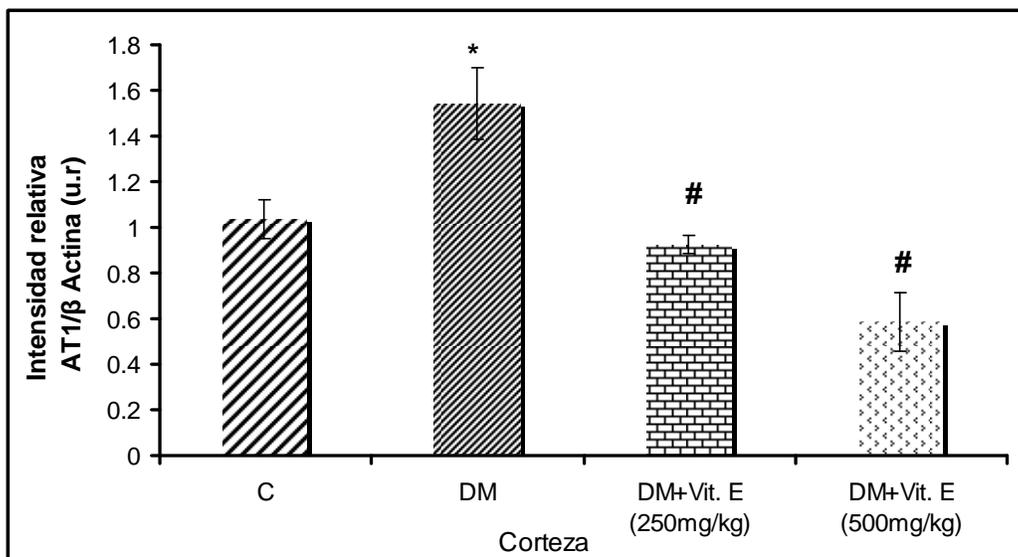


Figura 28. Efecto de la vitamina E sobre la expresión proteica del AT₁R en corteza renal de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con vitamina E. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media ± EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM; &p<0.05 respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

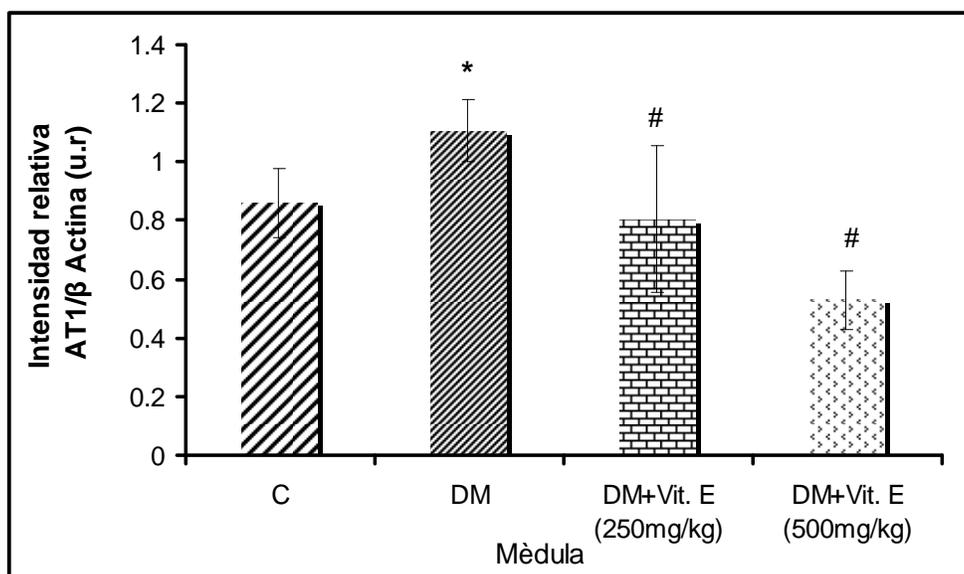


Figura 29. Efecto de la vitamina E sobre la expresión proteica del AT₁R en médula renal de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con vitamina E. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media ± EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM; &p<0.05 respecto al DM + Vit. (500 mg/kg).

b) AT₂R

La expresión del AT₂R fue mayor significativamente en corteza renal del grupo diabético (1.21 ur. ± 0.096), con respecto al grupo control (0.86 ur. ± 0.042); para los grupos con DM tratados con vitamina E, en dosis de 250 y 500 mg/kg la expresión del AT₂R fue significativamente menor (0.72 ur. ± .051 y 0.67 ur. ± 0.01 respectivamente) en relación al grupo diabético (figura 30).

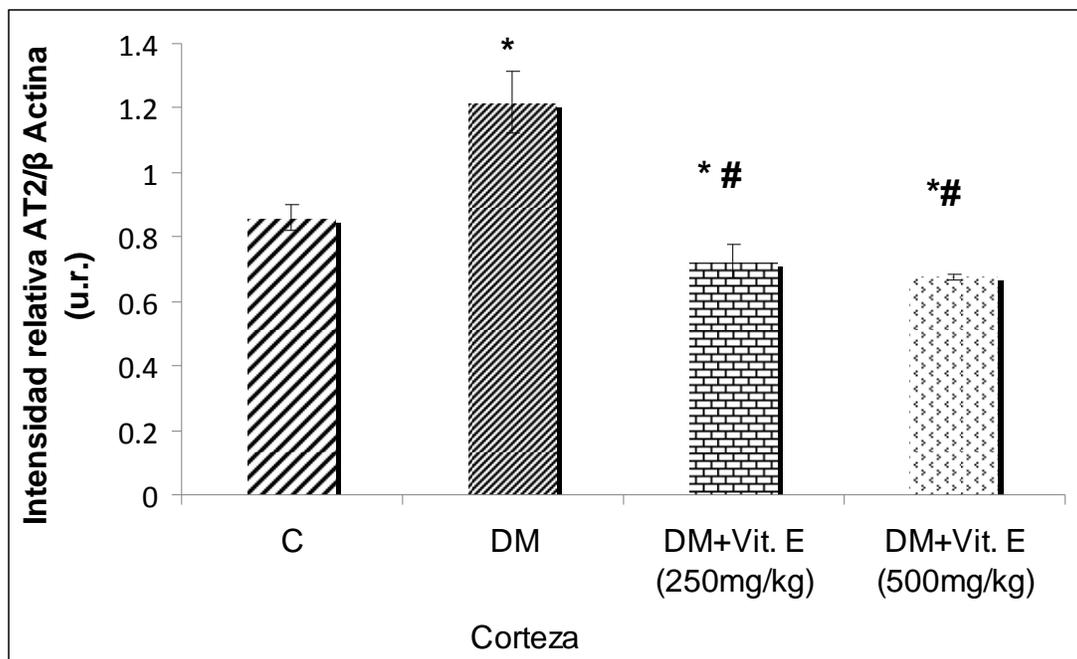


Figura 30. Efecto de la vitamina E sobre la expresión del ATR2 en corteza renal de ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media ± EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al DM.

En medula renal en la expresión del ATR2 mostró un incremento en el grupo diabético (1.44 ur. ± 0.10), con respecto al control (1.17 ur. ± 0.12); los tratamientos con vitamina E, con ambas dosis 250 y 500 mg/kg modificaron la expresión del ATR2 respecto al grupo diabético (1.10 ur. ± 0.078 y 1.07 ur. ± 0.13 respectivamente) (figura 31).

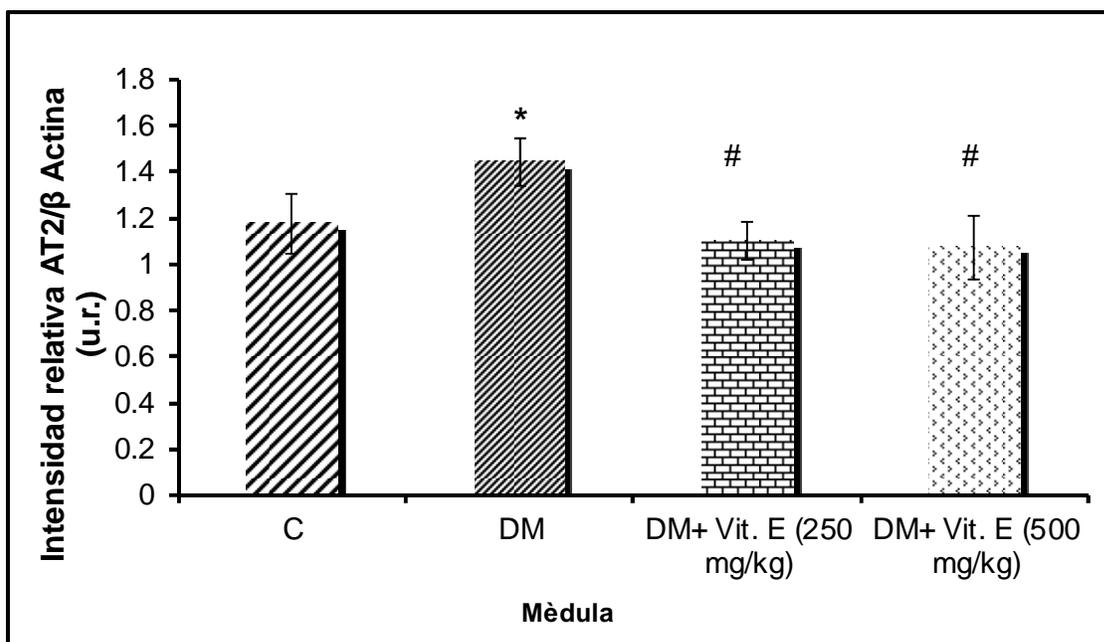


Figura 31. Efecto de la vitamina E sobre la expresión del ATR2 en médula renal de ratas diabéticas. C= Control, DM= Diabéticas. Los valores expresan la media \pm EEM, n=6, *p<0.05 respecto al control.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto antioxidante de la vitamina E sobre las alteraciones renales que produce la DM. Para lo cual se utilizó el modelo de DM inducido por administración de STZ, este modelo se caracteriza por la aparición de hiperglucemia a las 24-48 h de su administración y disminución de los niveles de insulina, debido a la destrucción de las células beta del páncreas. El daño producido por la STZ a las células beta es causado por metilación del DNA, destrucción autoinmune de las células β y por inhibición de la enzima N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (Chávez y col, 2007). Los resultados obtenidos nos permiten considerarlo como un modelo de diabetes que mimetiza a la MD tipo 1, debido a que se observó polifagia, polidipsia, poliuria y pérdida de peso, signos que persistieron a lo largo del experimento (4 semanas); resultados similares fueron obtenidos por Chávez y col. (2007).

La hiperglucemia es la alteración característica que produce la DM, y a su vez causa otras alteraciones o signos de la enfermedad; cuando se sobrepasa el máximo de reabsorción tubular de glucosa, esta es excretada a través de la orina,

el exceso de glucosa no reabsorbida en el túbulo contorneado proximal produce por osmosis retención de agua en la luz tubular y consecuentemente aumento del volumen de orina, es decir se produce poliuria, para tratar de compensar la pérdida de agua y electrolitos lo que lleva a la deshidratación, se produce aumento de la ingesta de agua lo que se conoce como polidipsia.

Por otra parte, debido a la falta de insulina, la glucosa no puede ser utilizada por las células del tejido muscular estriado y las células del tejido adiposo, lo que aumenta el catabolismo de los lípidos y las proteínas, por lo que aumenta el apetito y la ingesta de alimento, signo llamado polifagia; la utilización excesiva de estos metabolitos conduce a la pérdida de peso (Robbins, 2004).

La vitamina E a las dosis administradas, no modificó los valores de hiperglucemia, poliuria, polidipsia y polifagia, ya que estos se mantuvieron prácticamente igual. Solo se observó que la pérdida de peso fue menor en las ratas tratadas con vitamina E, especialmente con la dosis de 500 mg/Kg en relación a las ratas con DM, lo que podría deberse al efecto antioxidante de la vitamina E que disminuyó el catabolismo de los alimentos y fueron mejor asimilados por el organismo.

Varios grupos de investigadores han reportado que antes de la aparición de los signos clínicos de la ND, se produce un aumento de la masa renal, conocido como hipertrofia renal, la cual es una de las alteraciones estructurales tempranas desde el inicio de la DM (Gallego y col., 1998, Thompson y col., 2002).

Algunos estudios en células mesangiales en cultivo con concentraciones altas de glucosa han mostrado que aumenta la síntesis de algunas citocinas, como el factor de crecimiento insulinoide tipo1 (IGF-I), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), estas citocinas estimulan el crecimiento celular, especialmente el TGF- β (García y col., 2001). En estudios *in vivo*, a los 10 y 50 días de la inducción de la DM, se ha observado incremento del peso de los riñones de un 55 y 93%, respectivamente, de modo que el volumen glomerular, la longitud tubular y el volumen intersticial aumentan significativamente en los animales diabéticos, respecto a los controles (Rasch y Dorup, 1997). Los resultados observados en este estudio mostraron que los riñones de los animales

diabéticos aumentaron de peso así como el área de las células del túbulo proximal y en los animales diabéticos tratados con vitamina E se observó disminución del peso renal y del área de las células del túbulo proximal en relación al grupo diabético, lo que sugiere que la vitamina E al disminuir el estrés oxidativo, disminuyó la estimulación del TGF- β , factor considerado como el principal estimulante del crecimiento celular, pues estudios experimentales en animales diabéticos, con tratamiento anti-TGF- β 1 han reportado que previene la reducción progresiva de la función renal y revierte el engrosamiento y la expansión mesangial de las células renales (Rubio y col., 2014), aunque la disminución del peso renal no fue significativa, la determinación del cociente de proteínas /DNA mostró que los grupos tratados con vitamina E presentaron una disminución significativa de este cociente en relación al grupo de ratas con DM (Snuani y col., 2009). En condiciones fisiológicas las células proliferan de acuerdo a su ciclo celular normal, replican su DNA y se dividen durante la mitosis. En cambio las células que se hipertrofian, detienen el ciclo celular en la fase G1, por lo que aumenta su tamaño, su contenido de RNA y proteínas, y no se duplica su DNA, lo cual se observa como un aumento en el cociente proteínas /DNA (Wolf y Ziyadehf., 1999).

Cada una de las fases del ciclo celular están controladas por las enzimas quinasas dependientes de ciclinas (DCK), que son capaces de fosforilar proteínas, por transferencia de los grupos fosfato a otras proteínas. La actividad de estas enzimas depende de la formación de complejos con otras proteínas específicas del ciclo celular, como las ciclinas y otras proteínas inhibidoras denominadas CDKi. La activación de las CDK genera una cascada de señales por fosforilación/desfosforilación que en último término permiten la transcripción y transducción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Cuando el DNA sufre algún daño provoca el incremento de p53, que actúa activando la transcripción de P21, la cual inhibe el complejo CDK 2/ciclina E y secuestra el factor PCNA, factor indispensable para que se inicie y se desarrolle la replicación (Paunesku y col., 2001). Por lo tanto el estrés oxidativo induce el daño al DNA, provocando que el ciclo celular se detenga en la fase G1, lo que predispone a la hipertrofia.

Los mecanismos del desarrollo de la HR se han estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* y en ambos casos se ha mostrado que la hiperglucemia *per se* modifica el metabolismo de la glucosa por sobreactivación de vías metabólicas alternas, las cuales producen metabolitos por autooxidación de la glucosa, citosinas, activación de factores de crecimiento y exceso de RL que generan daño oxidativo a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, e inducción de factores de transcripción e inhibición de la apoptosis (Kashihara y col. 2010, Calderón y col. 2013), lo que estimula la proliferación celular y la hipertrofia y consecuentemente produce las alteraciones estructurales y funcionales renales (Olmos y col; 1998). En este estudio posiblemente la vitamina E a través de sus propiedades antioxidantes disminuyó el estrés oxidativo, lo que se reflejó en la disminución del peso renal, del cociente proteínas/DNA y del área celular del túbulo proximal.

Uno de los signos clínicos de daño renal en la evolución de la ND, es la proteinuria, que en los primeros estadios se conoce como microalbuminuria (20 a 200 mg/24 h), hasta llegar a macroalbuminuria (>300 mg/24 h.) (Mogensen y col; 1983), por lo tanto la cuantificación de proteínas en la orina es un parámetro clínico muy importante para valorar el funcionamiento renal y el estadio de la ND.

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma (60% de todas las proteínas) y contribuye al mantenimiento de la presión oncótica entre el plasma y el espacio intersticial, por lo que también está implicada en la regulación del intercambio de líquidos a través de la pared capilar glomerular. Aunque la albúmina es una proteína aniónica, no es completamente retenida por la barrera de filtración glomerular, una parte de ella es filtrada y reabsorbida a lo largo de los túbulos proximales por endocitosis mediada por receptores, para lo que debe unirse a las proteínas megalina y cubilina (Gekle y col., 2003). Otro mecanismo implicado en la retención de las proteínas en el glomérulo son los proteoglicanos que forman parte de la barrera de filtración, que contienen grupos sulfato con carga negativa por lo que repelen los grupos ionizados de los aminoácidos de la albúmina. La albúmina filtrada actúa como un estímulo proinflamatorio y profibrótico siendo el inicio o el promotor de los daños túbulo-intersticiales, por lo que su cuantificación en la orina es un parámetro para el diagnóstico y la

progresión de la ND. Nuestros resultados indican que a las 4 semanas del curso de DM, aumentó la excreción de proteínas y en los animales diabéticos tratados con ambas dosis de vitamina E, dicha excreción fue menor, de manera similar al grupo control, estos resultados nos sugieren la participación del SRA, pues, la hiperglucemia estimula al SRA, liberando Angiotensina II, la cual produce vasoconstricción en las arteriolas eferentes, lo que aumenta la presión capilar glomerular y como consecuencia las proteínas plasmáticas, pasan hacia el filtrado glomerular (Mora y col., 2008; Pérez y col., 2006), predominantemente la albúmina (Venegas y Arbeláez, 2007), pues más del 40% de las proteínas excretadas es albúmina, 20% globulinas de bajo peso molecular y el resto son proteínas de origen tubular y del tracto urinario (Escalante y col., 2007; Flores y col., 2009). Otro mecanismo implicado en la proteinuria es por estimulación del TGF- β , el cual estimula el engrosamiento de la barrera de filtración con disminución de los proteoglicanos por lo que al disminuir las cargas negativas de los proteoglicanos no se produce la repulsión de las cargas aniónicas de la albúmina y por consecuencia es filtrada (Gallego y col., 1998).

Otra estudio que se realizó para valorar el funcionamiento renal fue la depuración de creatinina (DC), la cual mide la velocidad de los riñones para eliminar o depurar una sustancia del plasma (Hernández, 2009; Strasinger y Dilorenzo, 2010). Los resultados obtenidos mostraron que la depuración de creatinina disminuyó significativamente en las ratas diabéticas en comparación a las ratas control; en cambio las tratadas con vitamina E con ambas dosis presentaron una depuración muy semejante al grupo control. Lo que muestra que en este modelo de DM se presenta daño en la función renal; y pone de manifiesto la participación del estrés oxidativo. Pues se observó que las ratas tratadas con vitamina E tuvieron una depuración de creatinina significativamente mayor y una proteinuria menor, especialmente con la dosis de 500 mg/Kg, o cual puede atribuirse a que la vitamina E al neutralizar los RL disminuyó el estrés oxidativo y la estimulación al SRA fue menor por lo que la función renal se afectó menos.

Ha sido demostrado que existe una relación temporal entre la severidad del daño renal y el estrés oxidativo, pues en los pacientes con ND se ha observado

mayor daño oxidativo del DNA y mayor grado de lipoperoxidación que en los pacientes con ND incipiente (microalbuminuria), los estudios histológicos muestran la presencia de productos de gluco-oxidación y lipo-oxidación en la matriz mesangial y en las lesiones nodulares glomerulares de pacientes diabéticos. Por otra parte también se ha reportado que la actividad de las enzimas antioxidantes de pacientes diabéticos se encuentra disminuida (Shimoike y col., 2000; Ceriello y col., 2000; Navarro, 2008).

La sobre producción de $O_2^{\cdot-}$ y de otras especies reactivas genera estrés oxidativo, responsable de la disminución de la actividad de las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) en pacientes con ND (Ceriello y col., 2000) y en ratas con DM por inducción con estreptozotocina (Mora y col., 2009), estos datos se correlacionan con nuestros resultados, ya que las ratas con DM mostraron disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes con respecto a las ratas del grupo control. Numerosos reportes han indicado que la disminución de la actividad de estas enzimas, se debe al exceso de producto, como en el caso de la SOD que se inhibe en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 (García y col., 2005). En muchos sistemas multienzimáticos el producto final de la secuencia de reacciones puede actuar como inhibidor específico, de una enzima situada al comienzo de la secuencia de reacciones, lo cual determina que la velocidad de las reacciones resulte condicionada a la concentración del producto final, en estado estacionario, este tipo de inhibición se designa, como inhibición por producto final, inhibición feed-back o retroinhibición (Lehninger y col., 2005).

En las ratas con DM se observó disminución de la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx, sin embargo, los grupos con DM tratadas con vitamina E (250 y 500 ml/kg) mostraron aumento de la actividad de estas enzimas antioxidantes, respecto a las ratas diabéticas. Estos resultados se correlacionan con varios estudios en los que se ha descrito el uso benéfico de los antioxidantes exógenos en el tratamiento de la ND. Bo y col., (2013), mostraron que aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes en ratas tratadas con ácido α -lipoico, así como una mejoría en los parámetros evaluados sobre la función renal, lo que pone de

manifiesto la importancia del estrés oxidativo en el daño renal y la función antioxidante de la vitamina E

Considerables evidencias sugieren que el sistema RAS intrarenal (glomérulo y túbulo proximal) puede ser activado por la hiperglucemia conduciendo a la liberación local de Angiotensina II (Ang II), la cual tiene efectos directos sobre las células glomerulares e induce esclerosis de manera independiente de sus acciones hemodinámicas. Para estudiar las acciones no hemodinámicas de la Ang II se han utilizado células renales cultivadas en un medio alto en glucosa (25 mM) o en la presencia de Ang II, en ambos casos se ha observado que aumenta la síntesis de las proteínas de la matriz e inhibición de la actividad de las enzimas degradativas (colágenas y plasmina). Estos efectos se producen por la interacción de la Ang II con su receptor AT1R, presente en las células glomerulares, tubulares vasculares y en el intersticio. Así de esta forma la activación del AT1R incrementa la resistencia vascular, reduce el flujo renal y estimula la producción de la matriz extracelular en el mesangio y en el intersticio de las células tubulares. La Ang II contribuye al daño renal a través de distintos mecanismos, entre ellos por activación de la NADPH oxidasa renal que contribuye a la formación de ERO y al estrés oxidativo (Barber y Barber 2003; Whaley y col., 2009). En el presente estudio las ratas con DM presentaron un aumento significativo de la expresión de la proteína del AT1R, en médula y corteza renal con respecto a las ratas control, lo cual se correlaciona con los estudios de Núñez y col. (2012) y Wehbi y col. (2002), quienes obtuvieron resultados similares en ratas con 7 y 14 días de DM respectivamente, lo que sugiere la participación del SRA intrarrenal desde las fases tempranas de la DM. El tratamiento con vitamina E (ambas dosis) disminuyó la expresión del AT1R, en médula y corteza renal, lo cual sugiere la participación de Ang II a través de su receptor AT1R en el desarrollo de la ND por estrés oxidativo (Onozato y col., 2002).

Con respecto a la expresión del AT2R se observó un aumento en su expresión en médula y corteza renal, respecto a las ratas control. Escalante. (2004) sugiere que el AT2R es inducido en el intento homeostático del tejido por regular el efecto

opresor de la AII, ya que la activación del AT2R se asocia con aumento de la producción de óxido nítrico, natriuresis e inhibición del crecimiento celular.

Se ha mostrado que el AT2R se expresa principalmente en tejidos embrionarios, mientras que en adultos solo se encuentra en algunos tejidos (cardíaco, riñón, útero y cerebro) y poco expresado, lo que sugiere que el AT2R, desempeña un papel importante en el crecimiento y desarrollo celular durante la etapa embrionaria y la vida fetal, y que puede sobre expresarse en situaciones patológicas (Touyz y Scchiffrin, 2000) como es el caso de la ND.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la administración de vitamina E a ratas diabéticas disminuyó la expresión de la proteína del AT2R en corteza y medula renal con respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento; observándose resultados similares a los obtenidos en las ratas control. Lo que se correlaciona con los datos de Bernabé, (2010), quién describió un aumento de la expresión de las proteínas COX₁, COX₂, AT1R, AT2R y ODC en medios de cultivo con glucosa alta, y una disminución significativa de estas proteínas en cultivos con glucosa alta y vitamina E. Lo que sugiere que los radicales libres tienen un papel importante en la expresión de los AT1R y AT2R, tanto *in vitro* como *in vivo*.

9. CONCLUSIÓN

9.1 La administración de vitamina E a las ratas diabéticas retarda y/o disminuye la hipertrofia renal.

9.2 La vitamina E restablece la función renal determinada por la disminución de la proteinuria y aumento de la depuración de creatinina.

9.3 La vitamina E disminuye el estrés oxidativo, ya que mejora la actividad de las enzimas; catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en tejido renal.

9.4 El efecto antioxidante de la vitamina E regula los efectos nocivos del sistema renina angiotensina, al reducir la expresión del receptor AT1R en la DM.

Lo anterior demuestra el poder antioxidante de la vitamina E y su posible efecto protector sobre el deterioro renal en la DM. Lo que pone de manifiesto la importancia de los antioxidantes como parte de la terapia en la DM.

10. BIBLIOGRAFÍA.

Aebi HE. 1983. Oxidoreductases acting on groups other than CHOH. 3.9 Catalase: hydrogen-peroxidase: hydrogen-peroxidase oxidoreductase E. C. 1. 11. 1. 6. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. III. Weinheim: Verlag Chemie. 273-286.

Al D., Chávez R., Martínez S., Ferreira B. y León F. 2004. El equilibrio redox en la diabetes y sus complicaciones. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 23 (29):231-242.

Altamirano G., Frías de León M. G., Reyes M., Hernández V. y Suárez C. 2011. Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 54:3:46-53.

American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37(1):81-90.

Aponte R. Ramírez Z., Hernández G. y Somontes Z. 2009. Los procesos de glucosilación no enzimáticas. *Ciencias Medicas Camaguey Cuba*. 13(6): 1-15.

Barber F. y Barber G. 2003. El sistema renina- angiotensina y el riñón en la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 22(3):192-8.

Beauchamp C. y Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44:276-287.

Bernabé L. 2010. Efecto de derivados flavonoides con propiedades antioxidantes en la expresión de factores clave para la hipertrofia renal en diabetes mellitus. Tesis (Maestría en Farmacología). México D.F. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina. 60 pg.

Bo F., Xin- F., JunLi X., Lei X y Hua W. 2013. The protective effects of α lipoic acid a kidneys in type 2 diabetic goto-kakisak rats via reducing stress oxidative. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (4): 6746- 56

- Boveries A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharmaceutica*. 46(1):85-95.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brownlee M. 2005. The Pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* 54: 1615-1625.
- Bursell S. y King G. 1999. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Research and Clinical practice*. 45: 169- 82.
- Calderón S., Muñoz R. y Quintana E. 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*. 32(2):55-66.
- Cárdenas R y Pedraza C. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes aspectos básicos. *Educación química UNAM*. 165-173.
- Castillo P. 2002. Modelos de envejecimiento *in vitro* e *in vivo* estrés oxidativo y protección antioxidante. Tesis (Doctorado en Biología). Universidad de Alicante. 172 pg.
- Ceriello A., Assaloni R., Da Ross R., Maier A., Piconi L., Quagliario L. Eposito K. y Giugliano. 2005. Effect of Atorvastatin and Irbesartan, Alone and in Combination, on Postprandial Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. *Circulation*. 111: 2518-2524.
- Chávez A., Ledezma D., Sánchez A., Rubio F. Oliván G. y Martinense G. 2007. Evaluación de un modelo de diabetes tipo2 para estudiar la actividad hipoglicemiante de la glibenclamida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (3):5-11.
- Conget I. 2002. Diagnóstico, clasificación y patogénesis de la diabetes mellitus *Revista Española de Cardiología*. 55(5):528-35

Cruz H., Licea P., Hernández G. y Yañes Q. 2011. Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 58(2): 102-107.

Cruz H., Licea P., Hernández G., Abraham M. y Yanes Q. 2011. Estrés Oxidativo y diabetes mellitus. *Patología Clínica*. 58:4-15.

Cuerda C., Luengo L., Valero A., Vidal M., Burgos R., Clavo F. y Martínez. 2011. Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutrición Hospitalaria*. 26:68-78.

Díaz A. y Membrillo H. 2006. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. 9: 34-44.

Drost T. 1996. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. *Gaceta de Ciencia Veterinaria*. 2: 44- 57.

Escalante B. 2004. Importancia biológica de la angiotensina II (AT2) *Archivo de cardiología México*. 74(2):84-86.

Escalante G., Zeledón S. y Ularte M. 2007. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada *Acta Medica Costarricense*. 49(2):83-9

Fang Y., Yang S. and Wu G. 2002. Free radicals, antioxidant and nutrition. *Nutrition*. 18(10): 873-79.

Febles F., Soto F., Saldaña B. y García T. 2002. Función de la vitamina E. Actualización. *Revista Cubana de Estomatología*. 40: 28-32.

Flores C., Márquez Y., López O., Mendoza C., Colmenarez V. y Salas Y. 2006. Caracterización de la diabetes mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones Neri. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 12:13-18.

Flores J., Alvo M., Borja H., Morales J., Vega J., Zúñiga C., Muller H. y Münzenmayer J. 2009. Enfermedad renal crónica: Clasificación, identificación, manejo y complicaciones. *Revista Medica de Chile*. 137:137-77.

Gallego B., López Nova J. y Pérez Barriocanal. 1998. Factores de crecimiento en la nefropatía diabética. *Nefrología*. 18(6): 49-58.

García C., Díaz M. y Morales F. 2005. Presencia de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulino-dependiente. *Avances en Diabetología*. 21: 145-148.

García N., Luis Y. y Callejo A. 2001. Disfunción tubular proximal renal en la diabetes mellitus insulino-dependientes. *Nefrología*. 21(3):32-38.

Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW y Fantus GI. 2006. Posttranslational, Reversible O-Glycosylation Is Stimulated by High Glucose and Mediates Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression and Sp1 Transcriptional Activity in Glomerular Mesangial Cells. *Endocrinology*. 147(1): 222-231.

González Pérez, May López y Guzmán Muñiz. 2008. El alfa- tocoferol y el ácido alfa lipoico. Una sinergia antioxidante con potencial en medicina preventiva. *Revista de Investigación Clínica*. 60: 58-67.

González T., Betancourt R. y Ortiz M. 2000, Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica* 25: 3-9.

Gugliucci A. 2002. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglucemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Médica de Uruguay* 16: 58-65.

Halliwell B and Gutteridge J. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4ed. Clarendon Press, Oxford. 888 pg.

Halliwell B. 2001. Free radicals and other reactive species in disease. *Life sciences*. 1-9.

Hansberg Torres W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*. 26: 19-54.

Heras M., Jeres M. y Coran F. 2001. Nefropatía diabética, fisiopatología y curso clínico. *Nefrología*. 21 (3): 24-31

Hernando A. 2009. Nefrología clínica. 3ed. Medica Panamericana. Madrid España. 1086 pg.

Hernández R. 2005. Líneas de defensa contra la producción de radicales libres en diabéticos con retinopatía. *Ciencia y Tecnología para la salud visual y ocular*. 5: 60-65.

Herrera A. 2003. Hipertensión arterial y nefropatía diabética. La terapéutica basada en al evidencia. *Instituto Nacional de Cardiología* 73:66-69.

Inve M., Soto E., Nishikawo M., Park Ah-Mee, Kira Y., Imada I. y Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its rol in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 2495-2505.

Johansen J. y Harris A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*. 4(5):1-11.

Kashihara N., Haruna Y., Kondeti V. K. y Kanwar. 2010. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Current Medicinal Chemistry*. 17(34):4256-4269.

Khalid R. 2007. Studies on free radicals, antioxidant, and cofactors. *Clinical interventions in Aging*. 2(2):219-36.

Konigsbeg F. y Aguilar M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno México. 634.pp

Korc I., Bidegain M. y Martell M. 1995. Radicales libres, bioquímica y sistemas antioxidantes implicados en la patología neonatal. *Revista Medica de Uruguay*. 11:121-135.

Lehninger A. Nelson D. y Cox E. 2005. Principios de bioquímica. 4 ed. Omega. 1264.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 265-275.

Luño J. 2005. Sistema renina angiotensina en la nefropatía diabética. *Nefrología* 25:2:73-81.

Madrid C. 2000. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Avances en Diabetología* 16: 86-88.

Maldonado S., Jiménez V. Bernabé G., Ceballos R. y Méndez B. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 32-39.

Martínez C. 1998. Toxicidad de xenobiótico mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39:5-18.

Martínez S. 2005. Especies reactivas de oxígeno y balance redox parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*. 29(3):9

Medivil C. y Sierre T. 2005. Acción insulínica y resistencia a la insulina: Aspectos moleculares. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. 53(4): 235-243.

Méndez D. 2003. Producto final de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México*. 139: 49-55.

Mogensen CE. Christensen CK. y Vittinghus E. 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2: 64-78.

Mora F., Macia H., Martínez C., Górriz T., Álvaro M. y Navarro G. 2008. Fisiopatología de la nefropatía diabética. *Revista Nefro Plus*. 1(1):28-38.

Mora H., Aragón N. y Ospina G. 2009. Características del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por streptozotocina. *Vitae* 16(3):311-319.

Navarro G., Mora F., Martínez C, Górriz T. y Alvaro M. 2008. Fisiopatología de la nefropatía diabética. *Nefroplus*. 1:1-19.

Oliart R. Angulo O. y Torres E. Insulina su gen y su mecanismo de acción molecular. *Revista de Educación Bioquímica*. 17(2):79-85.

Olivares R. y Arellano P. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. 27:9-18.

Olmos C., Gatica G. y Arriaga O. 1998. Proteínas glucosiladas en la fisiopatología de la nefropatía diabética. *Boletín Escuela de Medicina Pontificia universidad católica de Chile*. 27:52-55

Onozato M., Tojo A., Goto A., Fojita T., Wilcox C. 2002. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: Effects of ACEI and ARB. *Kidney International*. 61: 186-194

Oré R., Valdivieso R. y Huerta D. 2000. Capacidad antioxidante en ratas diabéticas de la vitamina E. *Revista peruana de biología* 7(2):191-197.

Orence Leonett. 2004. Nuevas direcciones en la patogénesis y tratamiento de la nefropatía diabética. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 2(1):2-4

Paglia ED, Valentine NW. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70: 158-168.

Paunesku T., Mittal M., Oryhon J., Korolev S., Joachimiak A., and Woloschak G. 2001. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation. Biology*. 77(10):1007-1021

Pazdro R. y Burgess J. 2010. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications *Mechanisms of Ageing and Development* 131: 276–286

Pérez D., Hiriart O. y Robles D. 2006. Receptores para la angiotensina II, diferentes a los clásicos membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Revista de Educación Bioquímica*. 25(2):55-60

Pham Huy L., Hua He y Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 2: 89-96.

Rasch R. y Dorup J. 1997. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetología*. 40:802-809

Robbins. 2004. Patología estructural y funcional. Interamericana 7ed. Saunders-Elsevier, Madrid.

Rosas G., García R., y Gómez P. 2009. Prevención. Diagnóstico y tratamiento temprano de la nefropatía diabética. *Asociación Latinoamericana de Diabetes*. 17(3): 106-114.

Rubio Guerra A., Vargas Robles H., Rodríguez López L., Suarez Cuenca J. y Escalante Acosta B. 2014. Asociación entre las concentraciones del factor transformante de crecimiento $\beta 1$ y albuminuria en diabéticos normotensos. *Medicina Interna Mexicana*. 30:235-239.

Serna LM, Pineda N, García AM, Aguirre M, Alfaro JM, Balthazar V, Vanegas JJ. 2009. Nephropathy diabetic. *MEDICINA UPB* 28(1): 42-53.

Shimoike T., Inogichi T., Umeda F. Kawano K. y Ochi H. 2000. The Meaning of serum levels of advance glycosylation and products in diabetic nephropathy. *Metabolism Clinical and Experimental*. 49: 1030-35.

Sinuani I., Weissgarten J., Beberashvili I., Rapoport M., Sandbank J., Feldman L., Albek M., Averbukh Z. y Sredni B. 2009. The cyclin kinase inhibitor p 57^{kip2} regulates TGF- β -induced compensatory tubular hypertrophy: effect of the immunomodulator AS101. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 24:2328-2338

Strasinger y Di Lorenzo. 2012. Análisis de la orina y de los líquidos corporales. Madrid España. Medica Panamericana. 5 ed. 348 pg.

Szkudelski T. 2000. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*. 50: 536-546.

Tebar M., y Escobar J. 2009. Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Madrid España Panamericana. 224 pp.

Torres A. y Castillo Z. 2002. Nefropatía diabética. *Revista Médica del Hospital General de México*. 5(2): 24-32.

Touyz R. y Schiffrin E. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Revista de Farmacología*. 52:639-672.

Triana M. 2001. La hiperglucemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la microangiopatía diabética. *Revista Cubana Angiología y Cirugía Vascular*. 2(2): 131-144

Ugarte P. y Carranza B. 2002. Nefropatía diabética. *Revista Chilena de Pediatría*. 73(5)455-460.

Vanegas A. y Arbeláez G. 2007. Proteinuria. *Medicina & Laboratorio*. 13(7):327-44.

Vaziri N., Bai Y., Ni Z., Quiroz Y., Pandian R. y Iturbe. 2007. Intra-renal angiotensin II/ AT₁, Oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction *KEPT. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 223(1):85-93

Vicent A., Russel J., Phillip L., and Feldmand. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*. 25 (4): 612-658.

Wallinger M. L., Rosón M., Ricci C., Linares M. y reyes T. 2011. Administración de dosis elevadas de vitamina E en ratas adultas con síndrome metabólico experimental: efecto sobre el estrés oxidativo. *Facultad de Medicina Buenos Aires Argentina* 29(135):27-34

Whaley C., Habibi J., Johnson M., Tilman R., Rehme J., Widmeyer C., Ferrario y Sovers J. 2009. Nebivolol reduces proteinuria and renal NADPH oxidase-generated reactive oxygen species in the transgenic Ren2 rat. *American Journal of Nephrology*. 30(4):354-60

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27:1047-53.

Wolf G. y Ziyadeh F. 1999. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney International*. 56: 393-405.

Yavuz D.,Kucukkaga B., Haklar G., Erzos O., Akoglo E. y Akalin S. 2003. Effects of captopril and losartan on lipid peroxidation, protein oxidation and nitric oxide release in diabetic rat kidney. *Prostaglandins Leucotrienes and Essentials Fatty*. 69:223-27.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Cuantificación de proteínas (BRADFORD)

Tubo	PBS (1x)	Albúmina (0.1 µg/µL)	Reactivo de Bradford (µL)
1	160	0	40
2	150	10	40
3	140	20	40
4	120	40	40
5	100	60	40
6	80	80	40
7	60	100	40
MUESTRAS	155	5 µL de muestra	40

La solución estándar de albúmina se diluye 1:10 (tomar 100 µL de albúmina y agregar 900 µL de agua deionizada).

Las muestras se diluyen 1:100 (10 µL de muestra por 990 µL de agua deionizada).

Nota. Tanto la curva como las muestras se hacen por duplicado.

* Una vez agregado el reactivo de Bradford se lee la absorbancia a 570 nm.

APÉNDICE 2

Cuantificación de proteínas (LOWRY)

Tubos	µg de proteína	Albúmina (µL)	Agua (µL)
1	0	0	200
2	5	10	190
3	10	20	180
4	15	30	170
5	20	40	160
6	30	60	140
7	35	70	130
8	40	80	120
9	45	90	110
10	50	100	100

Para la curva de calibración de albúmina (1mg/mL), se toman 600 µL de albúmina y se agregan 600 µL de agua y de esta se agrega a cada tubo como se indica en la tabla.

Adicionar a cada tubo 1 mL de solución C, mezclar e incubar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente agregar 100 µL de solución de Folin, agitar e incubar a temperatura ambiente por 30 min. Leer la absorbancia a 750 nm,

Solución C 1:50 (1 mL de solución B por 49 mL de solución A).

Reactivo de folin 1 N (Está 2 N, por lo que se debe diluir a la mitad).

Tratamiento de las muestras: Las muestras se diluyen 1:50 (tomar una alícuota de 10 µL y agregar 490 µL de agua deionizada), de esta se toma una alícuota de 200 µL y se hace todo el procedimiento como en la curva de calibración.

Nota. Tanto la curva como las muestras se hacen por duplicado.

APÉNDICE 3

Cuantificación de creatinina en orina

Tubo	Creatinina estándar (µL)	Agua (µL)	Concentración final (mg/dL)
A	0	500	0
B	50	450	2
C	100	400	4
D	150	350	6
E	200	300	8
F	250	250	10
G	300	200	12
H	375	125	15

Para la curva de calibración de creatinina, en una placa de ELISA se colocan 15 µL de creatinina estándar (tubo A-H) en los respectivos pozos, y se agrega 150 µL de solución de picrato alcalino, se deja en agitación y se incuba por 10 min, a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 490-500 nm, posteriormente se agregan 5 µL de ácido sulfúrico, se incuba por 10 min, a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 490-500 nm.

Solución de picrato alcalino: 2 mL de borato de sodio, 6 ml de surfactante, 12 mL de color reactivo y 3.6 ml de hidróxido de sodio.

Tratamiento de las muestras: se diluyen 1:10 (tomar una alícuota de 100 µL y agregar 900 µL de agua), tomar una alícuota de 15 µL y hacer el procedimiento como en la curva estándar.

Nota. Tanto la curva como las muestras se hacen por triplicado.

APÉNDICE 4

Cuantificación de creatinina en plasma.

Tubo	Creatinina estándar (μL)	Agua (μL)	Concentración final (mg/Dl)
A	0	500	0
B	12.5	487.5	0.5
C	25	475	1
D	37.5	462.5	1,5
E	50	450	2.0
F	75	425	3.0
G	100	400	4.0
H	125	375	5.0

Tomar 15 μL de creatinina estándar (tubos A-H) y depositarlos en sus respectivos pozos de una placa de ELISA, agregar 100 μL de búfer de reacción, 100 μL de color reactivo y al minuto leer la absorbancia 490- 500 nm, finalmente incubar por 7min a temperatura ambiente y leer la absorbancia 490- 500 nm.

Buffer de reacción: 2 mL de borato de sodio, 6 mL y 4 mL de hidróxido de sodio.

Color reactivo: 1.2% ácido pícrico (tomar 120 mg de ácido pícrico y adicionar 10 mL de agua deionizada).

Para las muestras se toman 15 μL de muestra y se hace el procedimiento como en la curva estándar.

Nota. Tanto la curva como las muestras se hacen por triplicado.

APÉNDICE 5.

Técnica de procesamiento de inclusión en parafina

Posterior a la fijación del tejido, este se pasa por un tren de deshidratación.

	Tiempo (min)
Agua corriente	30
Alcohol 70%	30
Alcohol 80%	30
Alcohol 90%	30
Alcohol absoluto	30
Alcohol amílico	60
Parafina I	60
Parafina II	60

Después de parafina II, se coloca en un bloque con parafina de inclusión (fundida a 60° C). Por último se realizan los cortes con un microtomo y se montan en portaobjetos.

Los tiempos que se muestran en la tabla son mínimos y se determinan dependiendo el tamaño de la muestra.

Nota. No dejar más de 1 h en alcohol absoluto, pues el tejido se endurece.

Apéndice 6

Tinción de Hematoxilina – Eosina (H-E)

Una vez montados los cortes en portaobjetos, se pasan por un tren de tinción.

	Tiempos (min)
Xilol I	5
Xilol II	5
Alcohol 100%	3
Alcohol 90%	2
Alcohol 80%	2
Alcohol 70%	1
Agua corriente	3
Hematoxilina de Harris	7
Agua corriente	2
Alcohol ácido	lavado
Agua corriente	2
Agua amoniacal	lavado
Agua corriente	1
Eosina Alcohólica	6
Agua corriente	Lavado
Alcohol 70%	1
Alcohol 80%	2
Alcohol 90%	2
Alcohol 100%	3
Xilol I	5
Xilol II	5
Montaje en resina Entellan	

Nota. No sacar las laminillas del último Xilol, sacar una por una al momento del montaje, para evitar que se hidraten.

APÉNDICE 7

Geles de electroforesis.

a) Gel de electroforesis

Agua demonizada (mL)	7.9
Acrilamida 30% (mL)	6.7
Tris 1.5 M pH 8.8 (mL)	5
SDS 10 % (mL)	0.2
TEMED (mL)	0.008
Persulfato de amonio 10% (mL)	0.2

b) Gel de concentración

Agua demonizada (mL)	2.4
Acrilamida 30 % (mL)	0.67
Tris 0.5 M pH 6.8 (mL)	0.5
SDS 10 % (mL)	0.04
TEMED (mL)	0.004
Persulfato de amonio 10% (mL)	0.04

* Las cantidades de ambas tablas son para preparar 2 geles

Apéndice 8

Cuantificación de la Catalasa

Reactivos:

1. Amortiguador de fosfato 66.6 mM, pH 7.0.

KH_2PO_4 3.522 g

Na_2HPO_4 7.268 g

Ajustar pH, disolver a 100 mL.

2. Peróxido de hidrógeno: 16 μL de H_2O_2 al 30% en 10 mL de amortiguador.

Método:

1. Se ajusta a cero con amortiguador de fosfatos.

2. Agregar a una cubeta de cuarzo 1 mL de peróxido de hidrógeno, más 10 μL de extracto y se registra la absorbancia cada 15 segundos a partir de la adición de la muestra.

Se calcula la desaparición de peróxido de hidrógeno utilizando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno: $\epsilon = 40/\text{M}\cdot\text{cm}$ a 240 nm. Se corrige por concentración de proteínas en la muestra y se reporta como UI/mg proteína. Una UI equivale a 1.0 μmol de peróxido de hidrógeno consumido por minuto.

Apéndice 9

Cuantificación de Superoxido dismutasa

Tubo	SOD (μL)	Buffer de muestra (μL)
A	0	500
B	20	480
C	40	460
D	80	420
E	120	380
F	160	340
G	200	300

Para la curva de calibración de SOD, se toman 10 μL de SOD estándar (tubo A-G), se adiciona 200 μL de mezcla de reacción y 20 μL de xantina oxidasa, incubar por 20 min a temperatura ambiente con agitación constante y leer la absorbancia a 570 nm.

Mezcla de reacción: NBT 2 mg, Xantina 1.7 mg, EDTA 3.72 mg, Na_2CO_3 530 mg ajustar pH (10.2) y aforar 100 mL.

Curva de extracto; para cada extracto se repite la curva anterior agregando dicho extracto en lugar de la SOD.

Apéndice 10

Cuantificación de Glutación Peroxidasa.

Amortiguador de fosfato 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.0:

Na ₂ HPO ₄	2.7469 g
NaH ₂ PO ₄	4.2304 g
EDTA	516.2 mg

Ajustar pH, aforar a 100 mL

Reactivo de Drabkin

KCN 1.6 M	5.2 mg
K ₃ Fe(CN) ₆ 1.2 M	19.7 mg
NaHCO ₃ 23.8 M	99.9 mg

Aforar a 50 mL.

Azida de sodio NaN₃ 1.125 M: 7.3125 g. Estable indefinidamente. CUIDADO: VENENO

Peróxido de hidrogeno: 2.2 µL de H₂O₂ 30% en 10 mL. Preparar fresco.

Glutación 150 mM: 46 mg/mL. Preparar fresco.

NADPH 8.4 mM: 1 mg/mL. Preparar fresco.

Glutación Reductasa: Diluir un frasco de 100UI en 1.0 mL de agua destilada. Preparar fresco.

El espectrofotómetro se calibra a cero con agua destilada, a 340 nm

En la cubeta del espectrofotómetro se coloca:

50 µL de muestra.

50 µL de reactivo de Drabkin. Mezclar.

2.58 mL de amortiguador.

100 µL NADPH

10 μ L Glutati3n reductasa

10 μ L azida de sodio

100 μ L GSH

La reacci3n se inicia con 100 μ L de per3xido de hidr3geno. Se registra la absorbencia al inicio, a los 2 y 4 minutos. Se obtiene la diferencia (ΔA_{340}) entre las lecturas a los 2 y los 4 minutos. Se define una UI como la desaparici3n de 1 μ mol de NADPH por minuto por miligramo de prote3na.