



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR B1 EN EL RIÑÓN DE ANIMALES DIABÉTICOS

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

ARRELLANO BUENDIA ABRAHAM SAID

Director de Tesis: Dr. en C. Maria del Roció Bautista Pérez



Tlanepantla, Edo. de México

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DIABETES MELLITUS.....	1
1.1.1. HISTORIA.....	1
1.1.2. TIPOS DE DIABETES.....	2
1.1.3. INSULINA.....	3
1.1.3.1. RECEPTOR DE LA INSULINA.....	4
1.1.3.2. TRANSPORTADORES DE LA GLUCOSA.....	5
1.1.3.3. METABOLISMO DE LA GLUCOSA.....	7
1.1.4. FISIOPATOLOGIA.....	7
1.1.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES.....	11
1.2. EL RIÑÓN.....	13
1.2.1. Nefrona.....	13
1.2.2. Riego sanguíneo a la nefrona.....	14
1.2.3. Función del Riñón.....	15
1.3. EL SISTEMA CININA-CALICREINA.....	15
1.3. 1. Síntesis de las cininas.....	16
1.3.1.1 El sistema cinina-caliceína plasmático.....	16
1.3.1.2 El sistema cinina-caliceína tisular.....	16
1.3. 2. El metabolismo de las Cininas.....	17
1.3.2.1 Enzima Convertidora de Angiotensina.....	18
1.3.2.2 Aminopeptidasa P (AmP).....	18
1.3.2.3 Endopeptidasa Neutra (NEP).....	18
1.3.2.3 Carboxipeptidasa N y M (CNP, CPM).....	18

1.3. 3. Receptores de las Cininas.....	19
1.3.4. Efectos de las Cininas.....	21
1.4. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	21
1.5. ANTECEDENTES.....	22
1.6. Hipotesis	25
1.7. Objetivos	25
2. Métodos.....	26
2.1. Modelo de diabetes	26
2.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	26
2.3. Western Blotting.....	27
2.4. Aislamiento de RNA.....	27
2.5. RT-PCR.....	28
2.5.1. Retrotranscripción Inversa.....	28
2.5.2. PCR.....	29
3. Resultados.....	31
4. Discusión.....	41
4.1 Conclusion.....	45
5. Bibliografía	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Nefrona, unidad funcional del riñón.....	13
Figura 2: Vasculatura Renal.....	14
Figura 3: Formación de Bradicinina por el sistema cinina-caliceína plasmático.....	16
Figura 4: Formación de Calidina por el sistema cinina-caliceína tisular.....	17
Figura 5: Sitios de hidrólisis de la Bradicinina y Calidina por las cininasas.....	17
Figura 6: Estructura tridimensional de los receptores B1 Y B2.....	19
Figura 7: Vía de señalización del receptor B1 y B2.....	20
Figura 8: Sistema Renina angiotensina.....	21
Figura 9: Participación de la ECA en el sistema renina-angiotensina y en el sistema de las cininas.....	22

INDICE RESULTADOS

Figura 1: Peso corporal de los animales control y diabéticos.....	31
Figura 2: Concentración de glucosa en sangre de animales control y diabéticos..	32
Figura 3: Volumen urinario de animales control y diabéticos.....	33
Figura 4: Concentración de proteína en orina de animales control y diabéticos....	33
Figura 5. Concentración de glucosa en orina de animales control y diabéticos.....	34
Figura 6. Expresión del receptor B1 al nivel de proteína en animales control y diabéticos.....	35
Figura 7. Expresión del receptor B1 al nivel de RNAm en animales control y diabéticos.....	35

Figura 8: Peso corporal de animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos tratados con ramipril.....	36
Figura 9: Concentración de glucosa en sangre de animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos ramipril.....	37
Figura 10: Volumen urinario de animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos ramipril.....	38
Figura 11: Proteína total en orina de animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos ramipril.....	38
Figura 12: Expresión del receptor B1 a nivel de proteína en animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos ramipril.....	39
Figura 13: Expresión del receptor B1 a nivel de RNAm de animales control, diabéticos, control ramipril y diabéticos ramipril.....	40

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la prevalencia de la diabetes mellitus, la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2025 habrá en el mundo alrededor de 300 millones de casos con diabetes clínicamente diagnosticados. (King y col, 1998). La diabetes se asocia con el desarrollo de complicaciones macrovasculares (infarto al miocardio, arteriosclerosis, hipertensión) y microvasculares (neuropatía, retinopatía y nefropatía)(Feldman, 2003). La nefropatía se presenta en el 20-30 % de los pacientes con diabetes tipo 1 (10 % de la población diabética) y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (90 % de la población diabética)(Feldman, 2003; Zimmet, 2003).

1.1. DIABETES MELLITUS

1.1.1. HISTORIA

La diabetes mellitus fue considerada durante siglos como una enfermedad del riñón. Así lo prueba la descripción de Areteo de Capadocia: “La diabetes es un mal que causa asombro, los pacientes nunca dejan de orinar y el flujo es incesante...” Este médico postulaba que la enfermedad se producía por la incapacidad del riñón para retener agua. Tal postulado galénico sería válido durante más de 1,500 años, hasta que Mering y Minkowski en 1889 demostraron que el origen de la enfermedad residía en el páncreas (Poulsen J. 1982). La primera descripción de proteinuria en pacientes diabéticos se atribuye a Cotunnus en 1770, pero fue Bright en 1836 quien estableció la relación entre proteinuria y enfermedad renal. El descubrimiento de la insulina en 1921 por Banting y Best,

origina un cambio brusco en la historia natural de la diabetes, con una reducción importante de la mortalidad y un aumento en la expectativa de vida. El reconocimiento del impacto que la diabetes tiene sobre el riñón se inicia en 1936 con las descripciones de los patólogos Kimmelstiel y Wilson acerca de la formación de nodulaciones hialinas en los glomérulos, basados en el estudio de 8 necropsias. A esta lesión se denominó glomeruloesclerosis nodular. En 1942 Bell describe la glomeruloesclerosis difusa, diferenciándola claramente de la nodular, y señala la gran importancia de las lesiones arteriolares en la patogenia de la nefropatía diabética. El término de microangiopatía diabética fue propuesto por Lunbaeck en 1954, basándose en el hallazgo común de enfermedad de pequeños vasos tanto en la retinopatía como en la nefropatía diabética. La introducción de la biopsia renal percutánea y la disponibilidad del microscopio electrónico han permitido conocer a fondo la enfermedad, pero a pesar de estos avances existen algunas interrogantes por resolver (Hayashi H y col, 1992).

1.1.2. TIPOS DE DIABETES

La diabetes se clasifica como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, dependiendo de las características que el paciente presenta. La diabetes tipo 1 se desarrolla cuando el páncreas no produce insulina, mientras que la diabetes tipo 2 se desarrolla cuando se presenta una deficiencia en la producción o acción de la insulina.

Todos tenemos glucosa en la sangre, ésta la obtenemos de los alimentos que consumimos. Cuando comemos, el proceso digestivo permite que se

aprovechen mejor los alimentos, tomando de ellos glucosa, proteínas y grasa. Gracias a la insulina, la glucosa se convierte en energía y se utiliza de inmediato o se guarda como fuente de reserva en el hígado y en los músculos.

Para que la glucosa pueda entrar a las células necesitamos que se produzca insulina. La insulina es la encargada de regular los niveles de glucosa que tenemos en la sangre, ésta es una hormona que se produce por las células β del páncreas. En el caso de las personas con diabetes el organismo es incapaz de producir insulina.

En algunos casos el páncreas puede producir una cantidad limitada de insulina, que no es suficiente, o bien el cuerpo no puede utilizarla correctamente. De esta manera, es difícil que las personas con diabetes puedan tener un control de glucosa adecuado.

1.1.3. INSULINA

La insulina con un peso molecular de 5.8 kDa es la hormona anabólica más potente y esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento. La insulina es sintetizada por las células β del páncreas en forma de preprohormona. La preproinsulina, al perder 23 aminoácidos de la secuencia líder, se convierte a proinsulina unida por puentes disulfuro intracatenarios y por el péptido C o péptido conector. Posteriormente, la proinsulina se transforma en insulina por acción de las endoproteasas específicas, quedando como hormona funcional con cadenas A y B de polipéptidos unidos por puentes disulfuro (Hunter -Garvey 1998). Por último, la insulina es secretada por las células β del páncreas (islotes de

Langherhans) en respuesta al incremento en los niveles de glucosa. Además, en el hígado (a través de la disminución de la gluconeogénesis y glucólisis) disminuye la salida de glucosa y en el tejido muscular y adiposo promueve la incorporación de glucosa al interior de la célula.

1.1.3.1. Receptor de la insulina

El receptor de la insulina, se clasifica dentro de aquellos receptores con actividad de tirosina cinasas. El gen del receptor de la insulina está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 humano y está constituido por 22 exones distribuidos a lo largo de 150 kb. Su transcripción da lugar a una proteína precursora que al ser procesada origina dos cadenas α y dos cadenas β . (Seino S y col, 1989; Seino S y col, 1990). El receptor de la insulina solamente se expresa en músculo, tejido adiposo, hígado y páncreas como un tetrámero, donde las dos cadenas α (135 kDa) ricas en cisteínas y glicinas interactúan con la insulina. Estas cadenas se unen por puentes disulfuro a dos cadenas β (95 kDa) que atraviesan la membrana plasmática y cerca de la región carboxilo terminal se encuentran los residuos de tirosinas (Cheatham B-Kahn C, 1995; Wang B y col, 1996). La incorporación de la glucosa a las células se hace por mecanismos diferentes dependiendo del tejido. La insulina ejerce su acción para el control de la glucosa de manera indirecta a través del receptor de la insulina. El primer evento específico es la unión de la insulina a las cadenas α del receptor. La interacción de la insulina provoca un cambio conformacional en las cadenas α y autofosforilación de las cadenas β (Hunter -Garvey 1998). Mediante el análisis mutacional de la

región intracitoplásmica de la cadena β , se ha podido conocer cuantos residuos de tirosina contiene el receptor y cual es su función. Las tirosinas en las posiciones 1158, 1162 y 1163 son esenciales como mediadoras de la actividad de las tirosina cinasas, la tirosina 960 como sitio de regulación y la tirosina 972 para el anclaje y fosforilación del sustrato del receptor de la insulina (IRS). (Wang B y col, 1996). Asimismo, dentro de esa región del receptor se encuentran las tirosinas 1328 y 1334 que sirven para activar a otras proteínas involucradas en la proliferación celular. Las tirosinas 1146, 1150 y 1151 participan en la internalización dependiente del ligando-receptor. (Carpentier J- Paceaude J, 1994). Además, se ha demostrado la presencia de residuos de serinas y treoninas que modulan la actividad de las tirosina cinasas y los sitios para la unión del ATP. (Cheatham B-Kahn C, 1995).

1.1.3.2. Transportadores de glucosa

La etapa final para el control de la glucosa se efectúa mediante los transportadores de glucosa (GLUT). A la fecha se han identificado nueve transportadores del uno al cinco y del ocho al once. El GLUT1 es un transportador constitutivo de la glucosa que se expresa en varios tejidos como en el cerebro, eritrocitos y en las células endoteliales. El GLUT2 (con baja afinidad por la glucosa) es el sensor en las células β del páncreas para la liberación de la insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa; también se expresa en el riñón, en el epitelio del intestino delgado y en el hígado. El GLUT3, transportador de alta afinidad para la glucosa, se expresa en neuronas y placenta. El GLUT 5

transportador de fructosa se expresa en intestino delgado, en células espermáticas, en riñón, en cerebro, en tejido muscular y adiposo. El GLUT8 transporta glucosa y es regulado hormonalmente a nivel testicular en el adulto. (Shepherd P- Khan B, 1999; Doege H y col, 2000). El GLUT4, con peso molecular aproximado de 45 kDa, es el principal responsable de la incorporación de la glucosa al interior de las células musculares y de los adipocitos. (Doege H y col, 2000). El GLUT4 es una proteína que atraviesa 12 veces la membrana plasmática y es entre los dominios seis y siete donde se localiza el sitio de entrada de la glucosa. En ausencia de insulina, alrededor de 90% del GLUT4 se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas que son llevadas hacia la membrana plasmática por la activación previa del complejo proteico PI 3-cinasa, las proteínas PKB/Akt, la PKC y la cinasa JNK. (Kandror K-Pilch P, 1996; Lamothe B y col, 1998). Las vesículas transportadoras contienen proteínas V-SNARE (conocida como sinaptobrevina), VAMP2 y VAMP3 que interactúan físicamente con las proteínas T-SNARE (conocida como syntaxina 4 y SNAP23) que se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana plasmática. Otras proteínas accesorias del tipo Munc18c, Synip y NSF se requieren en los eventos de anclaje y fusión de la membrana con las vesículas que contienen los GLUT. Además, en esta asociación participan las proteínas del citoesqueleto como la actina y la tubulina que interactúan con los complejos proteicos para la movilización y anclaje de los GLUT en la membrana plasmática. (Doege H y col, 2000).

1.1.3.3. Metabolismo de la glucosa

El metabolismo de la glucosa es importante no solamente como fuente de energía, también se relaciona estrechamente con diversas vías metabólicas. Para realizar dichas funciones, es necesaria la participación de diversas proteínas que regulan la utilización de la glucosa. El metabolismo de la glucosa es mediado por la enzima glucocinasa. La reacción es catalizada por una familia de enzimas, la hexocinasa I, II y III cuya actividad esta regulada por la concentraciones de la glucosa 6-fosfato, mientras que la glucocinasa IV (baja afinidad por la glucosa) no es regulada por la glucosa 6-fosfato. (Lamothe B y col, 1998). Dependiendo de las necesidades de la célula, la glucosa puede seguir la ruta de la glucólisis y/o la síntesis de ácidos grasos. (Ebeling P y col, 1998; Proud C- Denton R, 1998).

1.1.4. FISIOPATOLOGIA

La proteinuria fue primero reconocida en el siglo XVIII y posteriormente, 40 años después, Bright postuló esta forma de enfermedad renal como específica de la Diabetes. En 1830 fue clarificada por Kimmelstiel y Wilson, describiendo las lesiones clásicas de la glomeruloesclerosis nodular con proteinuria e hipertensión. (Cooper M, 1998). La microalbuminuria, estadio inicial de la proteinuria, de acuerdo a la clasificación de Mogensen, es definida como la tasa urinaria de excreción de albumina de 20-200 mg/min, predictivo del desarrollo de lesión renal diabética, asociado además a otras complicaciones diabéticas, especialmente enfermedad cardiovascular. Muchas de estas alteraciones se explican por disfunción endotelial, hipertensión, anormalidades del metabolismo de lípidos,

resistencia a la insulina, glicosilación de proteínas (Becker B y col, 1998; Cooper M, 1998; Ismail N-Becker B1994; Mogensen C y col, 1995; Viberti G y col, 1982). La proteinuria ayuda más a predecir el desarrollo de nefropatía diabética en los pacientes insulino-dependientes, pero también es de ayuda en los no insulino - dependientes, sin embargo en este grupo parece predecir mejor el riesgo cardiovascular (Schmidtz A-Vaeth M, 1988; Stehouwer C y col, 1998). Se ha correlacionado la microalbuminuria con la disfunción endotelial, la retinopatía y la enfermedad cardiovascular, además de la lesión renal (Araúz - Pacheco C y col, 1992; Stehouwer C y col, 1998).

Se menciona que la hiperfiltración glomerular y la elevación de la presión hidrostática glomerular puede contribuir a la nefropatía diabética, estando involucrados diversos mecanismos neurohormonales como el sistema renina - angiotensina y el sistema nervioso simpático (Hoogenberg K y col, 1998).

Se conocen también fenómenos oxidativos en la nefropatía diabética y en general en el daño vascular de la diabetes (Kudziora - Kornatowska K y col, 1998).

Existe una interrelación de vías metabólicas y hemodinámicas en la microcirculación renal del diabético. Los inhibidores de estas vías han aumentado el entendimiento para el desarrollo de nuevas opciones en el tratamiento de la nefropatía diabética (Cooper M, 1998; Sugiyama S y col, 1998).

Debido a que la diabetes es un estado de hiperglicemia crónica, es posible que el proceso dependiente de hiperglicemia esté envuelto en la nefropatía diabética, por ejemplo vía la generación de proteínas glicosiladas, que al

acumularse en el riñón, altere la función del mismo. La aminoguanidina, un inhibidor de la formación de glicosilación proteica, reduce la acumulación de dichas proteínas en el riñón y retarda el desarrollo de albuminuria y proliferación mesangial (Bach L y col, 2000; Cooper M, 1998). El uso del compuesto tiazólico, bromuro de fenaciltiazolio, revierte algunos de los efectos de las proteínas glicosiladas y su daño en el riñón (Cooper M, 1998). Por otro lado, la pentosidina se ha correlacionado con la severidad de las complicaciones diabéticas y se ha encontrado que es capaz de elevar el marcador de activación de monocitos, neopterina, en comparación con otros marcadores de función inmunológica (Weiss M y col, 1998).

Otra vía dependiente de glucosa es la vía del poliol, que ha sido implicado en la patogénesis de la nefropatía diabética, los inhibidores de la enzima aldosa reductasa han sido utilizados en roedores y humanos sin resultados claros, aunque el inhibidor activo oral de la isoforma de la protein cinasa C β , ha sido desarrollado y este compuesto (LY333531) previene el desarrollo de la hiperfiltración y albuminuria en ratas diabéticas (Cooper M, 1998).

Los pacientes con nefropatía diabética tienen un metabolismo lipoproteico anormal que puede ser influido por la alteración de la función renal y por la alteración del control metabólico de la diabetes (Araúz - Pacheco C y col, 1992; Kudziora - Kornatowska K y col, 1998; Sugiyama S y col, 1998), este daño se da en el transporte lipídico, con cambios en el metabolismo de lipoproteínas que contienen Apo B y Apo A, que contribuyen a los cambios estructurales de la alteración catabólica, lo que puede aumentar el potencial aterogénico

característico en estos pacientes (Araúz - Pacheco C y col, 1992; Kudzióra - Kornatowska K y col, 1998).

El desarrollo de la falla renal en los diabéticos, altera la cinética de la insulina, la resistencia tisular a la insulina, la ingesta calórica y otros determinantes del control de la glucosa sanguínea (Attman P y col, 1998).

La nefropatía diabética es comúnmente asociada a la hipertensión sistémica y se ha encontrado aumento de la presión intraglomerular aún en ausencia de hipertensión sistémica, relacionándose dichos cambios al efecto de angiotensina II y endotelina, acumulación de matriz mesangial, por lo que el uso de los inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II y de antagonistas de receptores de angiotensina II han demostrado reducir la presión intraglomerular, mejorando la progresión de la nefropatía diabética, quedando aún por establecer la acción de los antagonistas de receptores de angiotensina II (Araúz - Pacheco C y col, 1992; Cooper M, 1998; Hrick D, 1998), también se ha postulado que las citocinas proescleróticas, factor de desarrollo transformador (TGF)- β , factor de crecimientos similar a la insulina (IGF) estimulan la glicosilación proteíca y las hormonas vasoactivas como angiotensina II y endotelina a jugar un papel importante en el desarrollo de la nefropatía diabética, genéticamente expresado e induciendo cambios de hiperinsulinismo, hiperglicemia, y otros que influyen en la génesis de la lesión renal del modelo animal murino (Bach L y col, 2000; Cooper M, 1998; Grzeszc Z y col, 1998; Thorogood J y col, 1991).

Se ha relacionado la nefropatía diabética con susceptibilidad genética, en vista que solo afecta una tercera parte de los pacientes con diabetes de más de veinte años de evolución y se ha encontrado predisposición familiar (Thorogood J y col, 1991). La red de citocinas y factores de crecimiento tanto sistémicos como intrarrenales, pueden ser modulados por el estado diabético, con énfasis particular de los péptidos profibrogénicos, demostrándose que la angiotensina II puede participar en la progresión de la nefropatía diabética, encontrándose alteraciones en los receptores de angiotensina tipo 1 (AT 44), tanto en túbulos como glomérulos de la enfermedad diabética renal (Grzeszc Z y col, 1998; Ichikawa I, 1996; Kimura H 1998).

1.1.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES

Con el nombre de diabetes mellitus se hace referencia a un grupo de trastornos consistentes en un defecto en la respuesta secretora de insulina, una infrautilización de la glucosa y desarrollo de hiperglicemia. El efecto neto es una alteración crónica del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, con complicaciones a largo plazo que afectan a los ojos, los nervios, vasos sanguíneos y los riñones (Couture R y col; 2004).

Retinopatía Diabética: Es un trastorno en el que los niveles elevados de glucosa en sangre lesiona los vasos sanguíneos de la retina, los nervios y otras estructuras. Por otra parte ciertas sustancias derivadas de la glucosa se acumulan en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, provocando su engrosamiento

y posible rotura. Al aumentar el grosor de los vasos, estos cada vez aportan menos nutrientes a la retina y puede llevarse a cicatrización, desprendimiento de retina y ceguera.

Neuropatía Diabética: Complicación de la diabetes en la cual la hiperglicemia causa cambios químicos en los nervios y daña la capacidad para transmitir señales. También tiene el potencial para dañar los vasos sanguíneos que llevan el oxígeno y los nutrientes a los nervios. Se puede manifestar como falta de sensibilidad en extremidades (pueden terminar en gangrena y amputaciones), problemas digestivos, impotencia, etc.

Complicaciones Cardiovasculares: La hiperglicemia en forma crónica (años) aumenta el riesgo de padecer complicaciones como hipertensión arterial, enfermedad coronaria, enfermedad vascular cerebral, enfermedad vascular periférica y aterosclerosis.

Nefropatía Diabética: Se sabe que si los niveles de glucosa en la sangre se mantienen elevados, los riñones deben trabajar en exceso tratando de filtrar más cantidad de glucosa y eventualmente, esto va dañando los pequeños vasos capilares. Además, un tejido fibroso se va formando en las paredes de los capilares (membrana basal), el cual también interfiere con el proceso de filtración, por lo que las sustancias de desecho no son eliminadas y van concentrándose en la sangre, mientras que otras sustancias necesarias para el organismo, como las proteínas, son eliminadas por la orina. Poco a poco, el daño se va convirtiendo en insuficiencia renal avanzada donde el riñón casi no puede eliminar sustancias

tóxicas y en ese momento, de no ser tratado el problema, las sustancias de desecho se concentran a niveles tan elevados que se tornan tóxicas y puede causar la muerte.

1.2. EL RIÑÓN

1.2.1. Nefrona

La unidad funcional del riñón es la nefrona, cada nefrona consta de dos componentes: Un glomérulo y un túbulo. El *glomérulo*, está formado por una red de capilares derivada de la arteriola aferente y que desemboca en la arteriola eferente. La totalidad del glomérulo está revestido por la *cápsula de Bowman*. El túbulo es una continuación de la estructura epitelial de la cápsula de Bowman. La estructura y función de las células epiteliales varía mucho de un segmento del túbulo a otro. Los diferentes segmentos tubulares son: el *túbulo proximal*, *asa de Henle*, *túbulo contorneado distal*, *túbulo de conexión* y *túbulo colector* (Figura 1) (Kriz y Bankir, 1988; Vander, 1993).

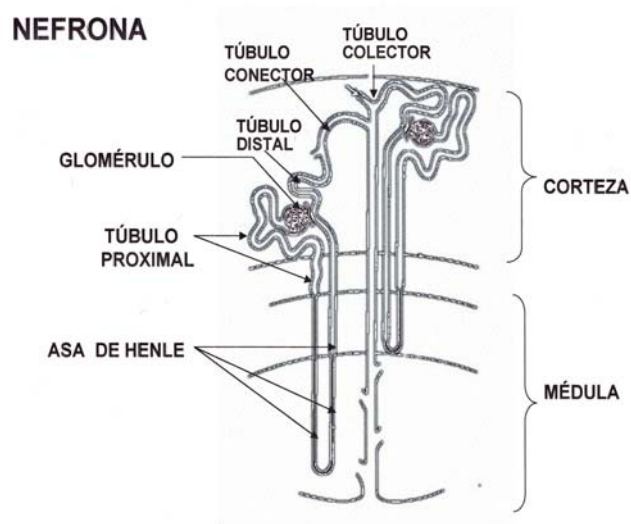


Figura 1: Nefrona, unidad funcional del riñón

1.2.2. Riego sanguíneo a la nefrona

La sangre llega a cada riñón por medio de una arteria renal que se va subdividiendo en ramas cada vez de menor calibre: arterias interlobares, arcuatas y por último corticales radiales (arterias interlobulares). Cada arteria cortical radial durante su curso hacia la superficie renal emite una serie de arteriolas aferentes paralelas, en ángulo recto a sí mismas; cada una de ellas se dirige a un glomérulo. Los capilares glomerulares se reúnen para formar otro conjunto de arteriolas llamadas arteriolas eferentes. Por tanto, la sangre abandona el glomérulo a través de una sola arteriola eferente que pronto se subdivide en un segundo grupo de capilares. Estos capilares peritubulares se distribuyen con profusión por todas las porciones del túbulo al cuál están íntimamente adheridos; este arreglo permite el movimiento de solutos y agua entre la luz del túbulo y los capilares. Después los capilares peritubulares se reúnen para formar las venas por las cuales sale la sangre del riñón (Figura 2)(Vander, 1993).

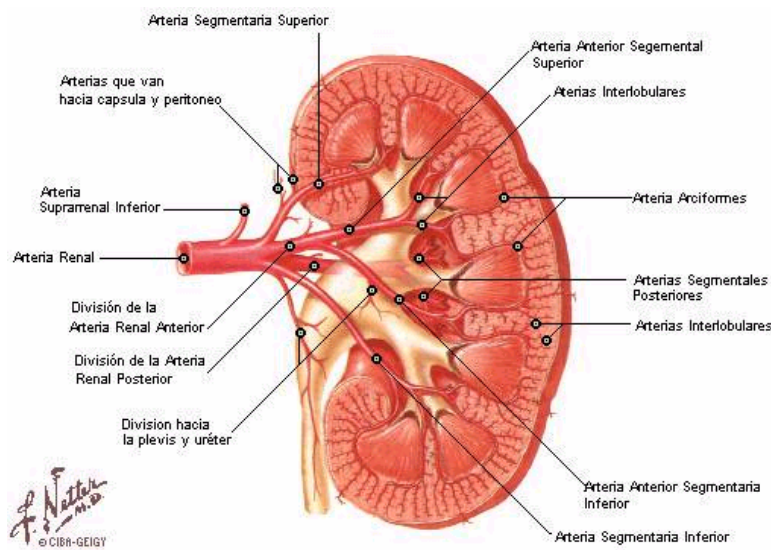


Figura 2: Vasculatura Renal

1.2.3. Función del Riñón

El riñón tiene un papel predominante en el control de la presión arterial a largo plazo, ya que dispone de mecanismos capaces de modificar los factores hemodinámicos que le sustentan, como son el volumen y la resistencia periférica. Por otro lado, el riñón produce sustancias vasoactivas que aumentan (angiotensina II, endotelina, tromboxano) ó disminuyen el tono vascular (prostaglandinas, bradicinina, óxido nítrico). El desequilibrio entre los factores vasopresores y vasorrelajantes adquiere gran importancia en la generación de las alteraciones renales.

Se ha descrito que el sistema de la cinina-caliceína y el sistema renina-angiotensina participan en la regulación de la función cardiovascular y renal. El sistema de las cininas se opone al efecto vasoconstrictor del sistema renina-angiotensina (Margolius HS, 1995).

1.3. EL SISTEMA CININA-CALICREINA

La existencia del sistema cinina-caliceína fue descubierto hace casi un siglo cuando Abelous y Bardier, en 1909, mostraron el efecto hipotensor de la orina humana. Desde aquel tiempo, este sistema ha sido y sigue siendo sujeto de investigación intensa. La Bradicinina (BK) está en el centro de este sistema; sin embargo, no es la única cinina farmacológicamente activa.

Se han reportado dos vías para la síntesis de cininas: a) El sistema cinina-caliceína plasmático y b) El sistema cinina-caliceína tisular.

1.3.1 Síntesis de las cininas

1.3.1.1. El sistema cinina-caliceína plasmático:

El contacto del plasma con una superficie cargada negativamente conduce a la autoactivación de factor XII (el factor de Hageman) al factor XIIa, este último hidroliza a la precaliceína para generar caliceína plasmática, a su vez esta hidroliza al cininogeno de alto peso molecular (HMWK) para liberar BK. La autoactivación del factor XII no es sólo un primer paso en la iniciación de la cascada de la coagulación intrínseca y la generación de cininas, sino que también conduce a la activación de la vía del complemento (Figura 3). (Bhoola KD y col, 1992).

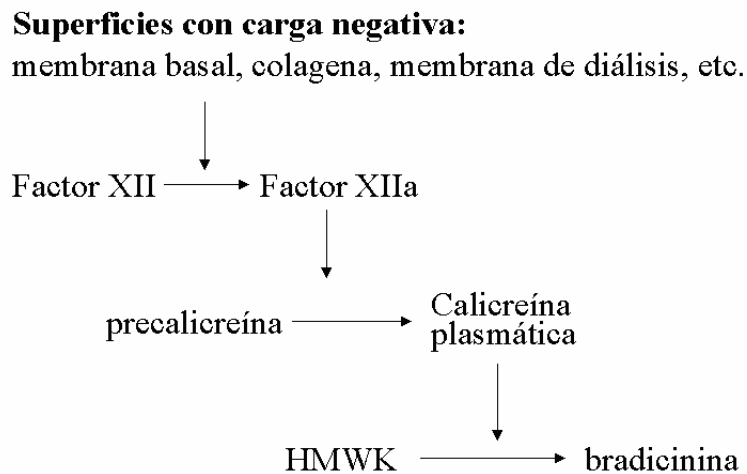


Figura 3: Sistema cinina-caliceína plasmático

1.3.1.2. El sistema cinina-caliceína tisular

La caliceína tisular se localiza en riñón, vasos sanguíneos, sistema nervioso central (SNC), páncreas, intestino, bazo, glándula suprarrenal y neutrófilos. La caliceína tisular libera calidina (KD) a partir del cininogeno de bajo

peso molecular (LMWK); aunque LMWK, es el sustrato principal de la calicreína tisular, esta también es capaz de hidrolizar HMWK (Figura 4). (Bhoola KD y col, 1992).

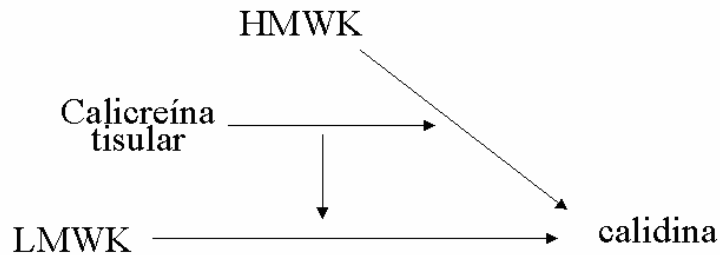


Figura 4: Sistema cinina-callicreína tisular

1.3.2. El metabolismo de las Cininas

Se tienen pruebas experimentales de que 4 metalopeptidasas son las principales responsables del metabolismo de BK: la enzima convertidora de angiotensina (ACE), aminopeptidasa P (AmP), endopeptidasa neutra 24.11 (NEP, neprilisina) y carboxipeptidasas M y N (CPM, CPN) (Figura 5)(Campbell D.J; 2000).

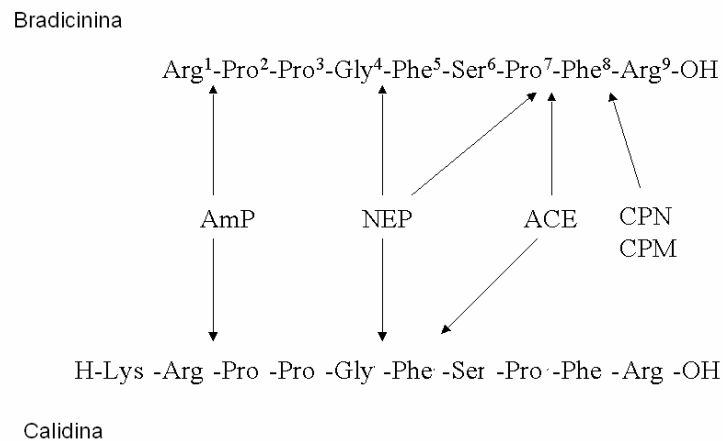


Figura 5: Sitios de hidrólisis de la Bradicnina y Calidina por las cininasas

1.3.2.1. Enzima Convertidora de Angiotensina

La ACE es una dipeptidil carboxipeptidasa que regula la bioactividad de péptidos vasoactivos como angiotensina I (Ang I) y BK, que son responsables del control de la tensión arterial. La ACE (150-180 kDa) cuenta con aproximadamente 1300 aminoácidos y está presente en la mayor parte de los tejidos (superficie del endotelio vascular de los pulmones y sobre las membranas de borde en cepillo de riñón, intestino, placenta y el plexo coroides) (Figura 5).)(Campbell D.J; 2000).

1.3.2.2. Aminopeptidasa P (AmP)

Se han reportado dos isoformas: una citosólica (AmPc) y otra membranal (AmPm), su homología es del 43%. Las cininas son los principales sustratos para AmPm. La AmP hidroliza entre Arg¹-Pro² lo cual contribuye a la inactivación de BK en el pulmón (Figura 5).)(Campbell D.J; 2000).

1.3.2.3. Endopeptidasa Neutra (NEP)

Es una proteína superficial de tipo II, inactiva a BK al producir el dipeptido Phe⁸-Arg⁹ y el tripéptido Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷. A la calidina la hidroliza entre Arg² y Pro³. NEP es la principal enzima responsable del metabolismo de las cininas en el riñón así como en el endotelio (Figura 5).)(Campbell D.J; 2000).

1.3.2.4. Carboxipeptidasa N y M (CNP, CPM)

Conocidas actualmente como cinasa I, ambas la CPN y CPM son zinc metalopeptidasas, tienen el 41% de homología. Ellas hidrolizan una gran cantidad de péptidos que contienen un C-terminal Arg o Lys. CPN inactiva las anafilotoxinas

del complemento (C3a, C4a y C5a) separando su carboxilo terminal del residuo Arg. Ambas carboxipeptidasas transforman BK y KD en des-Arg-BK y des-Arg-KD, las cuales son metabolitos activos vía receptor B1 (B1R). Esta actividad de la cinasa 1 constituye un camino metabólico de menor importancia a menos que la ACE sea inhibida (Figura 5).)(Campbell D.J; 2000).

1.3.3. Receptores de las Cininas

Se conocen dos tipos de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que median los efectos celulares de las cininas, el receptor B1 y el receptor B2 (Figura 6). (Regoli y Barabé, 1980).

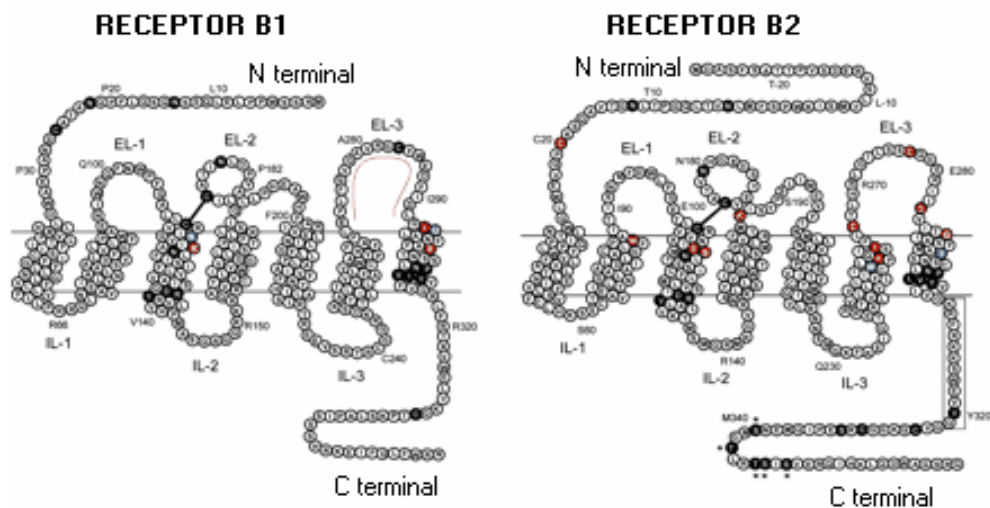


Figura 6: Estructura tridimensional de los receptores B1 y B2

El receptor B1 no se expresa de manera constitutiva, pero se induce su expresión en células de músculo liso vascular (VSMC), células endoteliales (EC) y fibroblastos. El receptor B1 responde a los metabolitos de las cininas generados

por la cininasa 1: des-Arg⁹-BK, Lys-des-Arg⁹-BK o des-Arg¹⁰-KD. El receptor B2 tiene alta afinidad por BK y KD, se expresa constitutivamente en casi todos los tejidos. La activación del receptor B2 en el endotelio produce vasorelajación a través de la liberación de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI) y/o el ácido epoxyeicosatrienoico (EETs) (Vanhoutte y col 1993; Busse y col, 1994; Blatter y col, 1995; Groves y col, 1995; Mombouli y col 1997; Danser y col 1998; Fisslthaler y col 1999) (Figura 7).

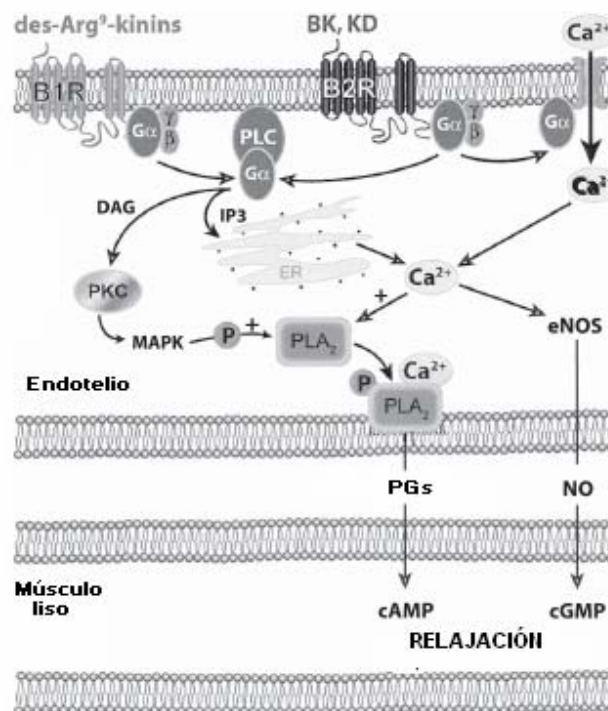


Figura 7: Vía de señalización del receptor B1 y B2

En el músculo liso vascular y en los cardiomiocitos el receptor B2 media la respuesta contráctil e inotrópico, respectivamente (Field y col, 1994; Fasciolo y col, 1990; Yang CH M y col, 1999; Dendorfer y col, 2001; Gobeil y col, 2002; Tom y col, 2001^a).

1.3.4. Efectos de las Cininas

Varios efectos farmacológicos están relacionados a BK como son vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, el estímulo sensorial y la contracción de músculo liso (Moreau y col, 2005)

1.4. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Desde que la renina fue descubierta por Tigerstedt y Bergman hace más de un siglo (Tigerstedt R-Bergman P, 1898), numerosos investigadores han establecido las complejas relaciones que tienen lugar en el sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) (Gardner D, 2002). La renina es una enzima proteolítica que se secreta en las células de la región yuxtaglomerular de las nefronas del riñón. La renina ejerce su acción proteolítica sobre el angiotensinógeno; este es una alfa 2 globulina producida en el hígado. La renina hidroliza el angiotensinógeno convirtiéndolo en angiotensina I que es biológicamente inactivo pero que a su vez es convertido en diferentes tejidos en angiotensina II (Figura 8).

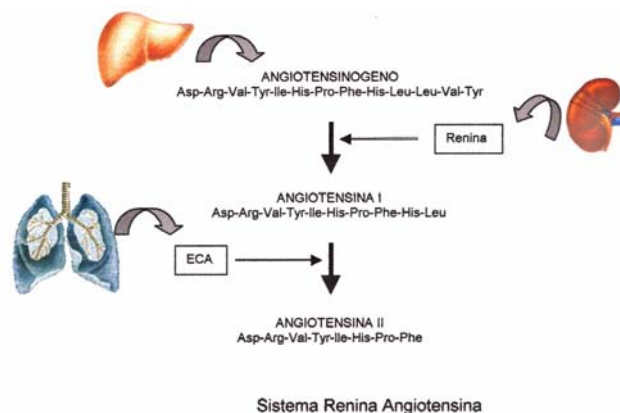


Figura 8: Sistema renina-angiotensina

La enzima convertidora de la angiotensina (ECA), uno de los elementos esenciales de SRAA, convierte la angiotensina I en angiotensina II y degrada la bradicinina. (Dzau V, 2001).

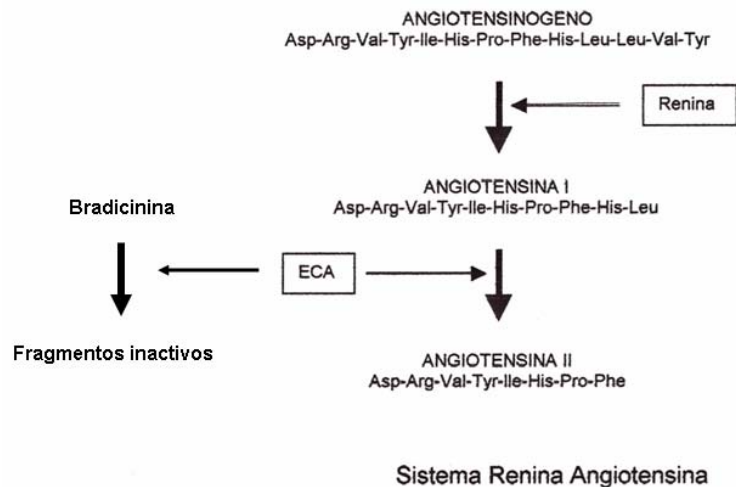


Figura 9: Participación de la ECA en el sistema renina-angiotensina y en el sistema de las cininas.

1.5. ANTECEDENTES:

Antes del descubrimiento de la insulina y su utilización clínica como tratamiento de fondo de la diabetes, el coma diabético era la complicación más frecuente y a menudo fatal, lo que condicionaba una esperanza de vida muy limitada para el enfermo. Con la utilización de la insulina esto dejó de ser así; los diabéticos dejaron de estar condenados a morir jóvenes a causa de un coma y, por tanto, se prolongó notablemente la supervivencia. No obstante, el prolongar la vida de los pacientes ha traído como consecuencia la aparición de complicaciones desconocidas en el pasado, que continúan siendo desafíos casi tres cuartos de siglo más tarde.

La nefropatía diabética, una complicación grave de la diabetes, es una de esas complicaciones debidas a que los pacientes diabéticos viven más tiempo en la actualidad. La enfermedad renal afecta a un tercio de los pacientes diabéticos, y la diabetes es la causa más habitual de fracaso renal en los países desarrollados (Breyer, 1992). A pesar de las mejoras en el control de los niveles de glucosa en sangre y en el manejo de la hipertensión, pocos avances se han producido hacia la curación o la prevención de la nefropatía diabética. Conforme la función renal decae, los pacientes diabéticos se enfrentan sucesivamente a la anemia, la acidosis crónica, el desequilibrio electrolítico, la enfermedad metabólica ósea, la hipertensión, el síndrome nefrótico y la uremia (Mogyorosi & Ziyadeh, 1996). Los pacientes con nefropatía diabética también presentan un riesgo extremadamente alto de enfermedad cardiovascular, con una tasa de mortalidad 30 veces superior a la población general (Mogyorosi & Ziyadeh, 1996).

Los científicos han logrado enormes avances en el desarrollo de métodos para retrasar la aparición y el progreso de la enfermedad renal en personas con diabetes. Los fármacos antihipertensivos, fármacos que bajan la presión arterial, pueden retrasar en forma importante el progreso de la enfermedad renal. Hay dos tipos de fármacos que han retrasado eficazmente el progreso de la enfermedad renal: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IACEs y antagonistas de los receptores AT1 (McFarlane et al., 2003).

Las cininas son probablemente las mayormente implicadas en los efectos benéficos de los IACEs en el tratamiento de la diabetes (Rejean Couture, 2004).

Hasta el momento no hay evidencias suficientes que demuestren cual es la participación del receptor B1 en la regulación del tono vascular; pero se sugiere que puede tener un efecto benéfico ya que el tratamiento con los IACEs induce su expresión en el riñón y vasos de ratas normotensas así como en ratones Knockout al receptor B2 (Bk B2R^{-/-}) (Marin-Castaño y col, 2002). También se induce la expresión del receptor B1, en el riñón y corazón de ratones “Bk B2R^{-/-}” con hipertensión renovascular, y aumenta la presión arterial en ratones tratados con un antagonista del receptor B1 (R-892) (Duka I y col, 2001; 2003). Estos resultados sugieren que en ausencia del receptor B2, se induce la expresión del receptor B1 y este asume las propiedades hemodinámicas del receptor B2. En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 16 semanas de edad, se induce la expresión del receptor B1 en el glomérulo y túbulo renal, la infusión de un antagonista del receptor B1 por 4 semanas incrementa la presión arterial y la excreción urinaria de albúmina, produce fibrosis en el intersticio renal, aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF- β) y de la colágena tipo III (Hagiwara M y col, 2004). Sin embargo, Ni A y col (2003) reportaron que la sobreexpresión del receptor B1 produce hipertensión.

En cuanto a la participación del receptor B1 en la diabetes, se ha reportado que en miocardio, glomérulo y microvasos de retina de animales diabéticos también se induce la expresión del receptor B1, en los microvasos de retina producen vasodilatación a través del NO y PGI (Marceau y col, 1998; Tschöpe C y col, 2000; Mage M y col, 2002; Abdouh M y col, 2003). El tratamiento con un antagonistas del receptor B1 mejora la función renal en ratones diabéticos (Zuccollo y col, 1996; 1999). Lawson SR y col (2005) muestran que el receptor B1

modula la permeabilidad vascular en ratas diabética y sugieren que este receptor participa en las complicaciones vasculares.

1.6. HIPÓTESIS:

“ En el riñón de animales diabéticos se induce la expresión del receptor B1”.

1.7. OBJETIVOS

1.- Determinar la expresión del receptor B1 al nivel de proteína y RNAm en el riñón de animales diabéticos.

2. METODOS:

2.1. MODELO DE DIABETES

Se utilizaron ratas wistar macho de 200g de peso; a estos animales se les administro por vía intraperitoneal 60 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en buffer de citrato 0.1 M pH 4.0, a los animales del grupo control sólo se les administro buffer de citrato. Después de 72 horas se determino la concentración de glucosa en sangre por el método de One Touch™ Basic™ Plus (Lifescan a Jonson & Jonson company), los animales con ≥ 20 mmol/L de glucosa fueron utilizados para el estudio. Se formaron cuatro grupos experimentales: 1) grupo control, 2) grupo con diabetes, 3) grupo tratado con ramipril y 4) grupo con diabetes tratadas ramipril (3 mg/L en el agua de beber)(Tikellis C y col, 2003). A las 4 semanas se colocaron en cajas metabólicas individuales para determinar la cantidad de volumen urinario, concentración de proteína y glucosa en orina durante 24 h. Posteriormente se extrajeron los riñones para los experimentos para los experimentos de Western blot y RT-PCR

2.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE

BRADFORD:

Se homogeneizo 150 mg de corteza renal con 500 μ l de amortiguador para muestra (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8). Se determino la concentración de proteínas por el método de Bradford, las muestras fueron leídas a 595 nm (espectrofotometro Beckman DU* 650) (Bradford, 1976).

2.3. WESTERN BLOTTING:

Se utilizaron 60 μg de proteína y las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. La electroforesis se corrió en presencia del amortiguador de corrida (0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS) a 100 volt. La transferencia se llevo a cabo en un sistema Trans-Blot SD a 20 volts por 2 horas. La membrana se incubo con el anticuerpo primario contra B1 (Santa cruz).

2.4. AISLAMIENTO DE RNA (Método de Trizol)

Se homogeneizo 100 mg de corteza renal con 1 ml de trizol y se incubo por 30 minutos a 4°C. Posteriormente cada incubación y centrifugación se llevo a cabo a 4°C. Después de la disociación del complejo nucleoproteico se adiciono 200 μl de cloroformo, se incubo por 30 minutos y se centrifugo a 12,000 rpm por 30 minutos, posteriormente se tomo 500 μl de la fase acuosa y se le adiciono 500 μl de isopropanol (para precipitar el RNA), se centrifugo a 12,000 rpm por 30 minutos, se elimino el sobrenadante y se adiciono 1 ml de etanol al 75% para lavar la pastilla de RNA, se centrifugo a 6,000 rpm por 10 minutos y se elimino el sobrenadante.

Finalmente se resuspendió la pastilla de RNA en agua DEPC (0.1%). Posteriormente se llevo acabo la cuantificación a 260/280 nm (UV). La relación $A_{260/280 \text{ nm}}$ indica el grado de pureza, si la relación es menor de 1.8 indica contaminación con proteínas, también se determino la concentración del RNA.

Para determinar la integridad del RNA se coloco en un gel de agarosa al 1%, 2 μ g de RNA. El gel se tiño con bromuro de etidio y se visualizo en un transiluminador (UV). Se observo la presencia de RNA total: RNAr, RNAt y RNAm.

2.5- RT-PCR

La RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas molde de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. La amplificación de DNA permite la multiplicación exponencial de unas pocas moléculas molde de DNA hasta 10^6 copias con una alta especificidad.

2.5.1-RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 10 μ l RNA (2 μ g), 1 μ l de oligo dt (0.5 μ g/ μ l), 2 μ l amortiguador (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 2 μ l de 25 mM MgCl₂, 1 μ l de 10 mM dNTP, 2 μ l de 0.1 M DTT, 1 μ l de superscript RT, se incubo a 42°C por 50 minutos, se inactivo a la enzima a 70° C por 15 minutos, 4° C por 15 minutos. El control negativo se realizo con los componentes de la mezcla antes indicados, excepto superscript RT y posteriormente se realizará la PCR.

2.5.2- PCR

Los “primers” se diseñaron tomando en cuenta las siguientes características, son específicos de la secuencia blanco, el largo es de 19-25 nucleótidos, presentan del 45-60% en GC, se evitaron repeticiones mayores de tres bases, el extremo 3´ terminal es G ó C / GC, la temperatura de alineamiento es similar para el par de “primers”, la secuencia de ambos “primers” no son complementarias por lo tanto no hibridan con ellos mismos o entre ellos.

Los “primers” específicos de la secuencia blanco son (número de acceso en Gen Bank).

B1: receptor a Bradicinina (NM_030851)

Sentido (28-45) 5´aagacagcagtcacatc 3´

Antisentido (430-413) 5´gacaaacaccagatcgga3´

Tamaño del producto 385 pb

β-ACTINA: (NM_031144)

Sentido (51-69) 5´gaaatcgtgcgtgacattaaag 3´

Antisentido (745-765) 5´ctagaagcatttgcggtgga 3´

Tamaño del producto 511 pb

La reacción se llevo a cabo en un volumen final de 25 µl, los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 2.5 µl amortiguador (200 nM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 1.5 µl de 25 mM MgCl₂, 0.5 µl de 10 mM dNTP, 0.5 µl primer

sentido 10 μM , 0.5 μl primer antisentido 10 μM , 0.25 μl Taq DNApol (platinum Taq, 2-5 unidades/ μl), 1 μl cDNA y 18.25 μl agua deionizada estéril.

La mezcla de reacción así como las muestras permanecieron en hielo hasta iniciar la reacción bajo las siguientes condiciones en el termociclador Perkin Elmer 2400: predesnaturalización (94°C por 2 minutos), 36 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), alineamiento (64°C por 1 minuto) y extensión (72° C por 1 minuto). Un ciclo de extensión final (72°C por 10 minutos).

Se mezcló 2.5 μl del producto de PCR con 2.5 μl de amortiguador de muestra [Glicerol 5% (v/v), Na₂EDTA • 2H₂O 10 mM, SDS 0.1% (w/v), azul de bromofenol 0.01% (w/v)] y se colocó en un gel de agarosa 2%, el cuál se corrió a 70 volt por 40 minutos en presencia del amortiguador TAE. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (UV).

3. RESULTADOS:

En la Figura 1 se muestra el peso corporal de los grupos experimentales, los animales diabéticos perdieron 63g de peso en comparación con los animales control (Figura 1).

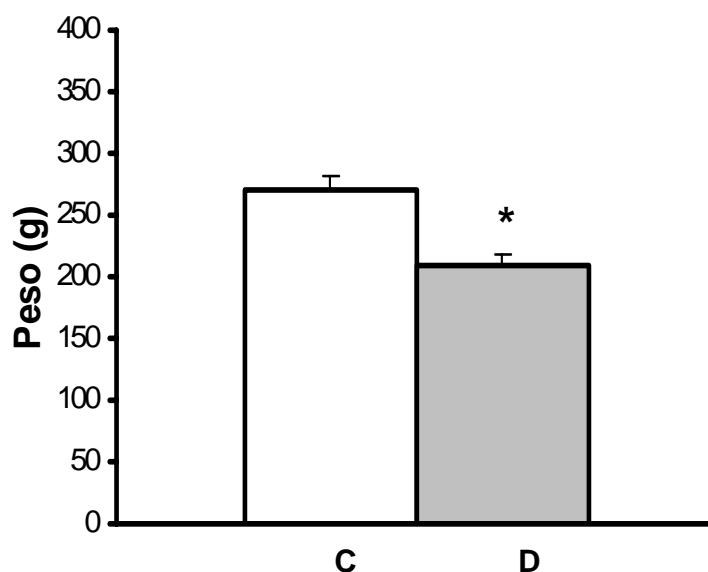


Figura 1: Peso corporal de los animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P < 0.05$ cuando se compara con el control.

En los animales diabéticos, la concentración de glucosa en sangre fue de 368 ± 10 mg/dl, mientras que en el grupo control fue de 90 mg/dl ± 10 mg/dl (Figura 2), estos resultados demuestran que la STZ induce diabetes.

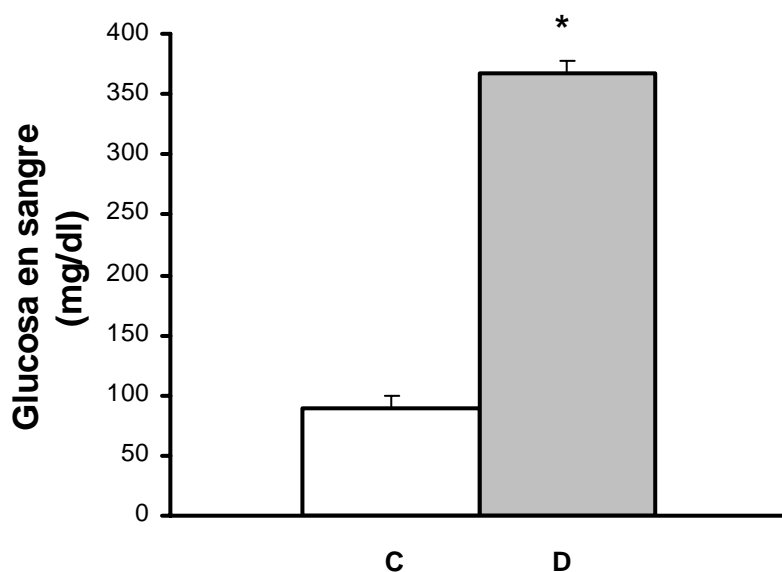


Figura 2: Concentración de glucosa en sangre de animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

Para evaluar la función renal, se recolectó la orina a los 30 días de la inducción de la diabetes, y se determinaron los siguientes parámetros: volumen urinario, concentración de proteína y concentración de glucosa en orina.

En la Figura 3 observamos que el volumen urinario en el grupo control fue de 24 ± 1 ml/24 horas y en los animales diabéticos aumentó a 69 ± 7 ml/24 horas. En la Figura 4 se muestra que la concentración de proteína en el grupo control fue de 14 ± 0.7 mg/24 horas y en los animales diabéticos incremento a 36 ± 4 mg/24 h.

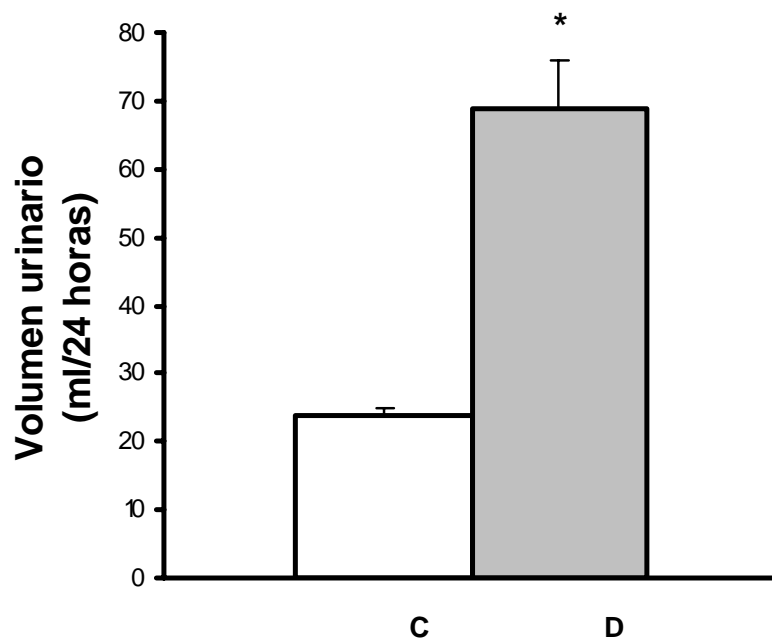


Figura 3: Volumen urinario de animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

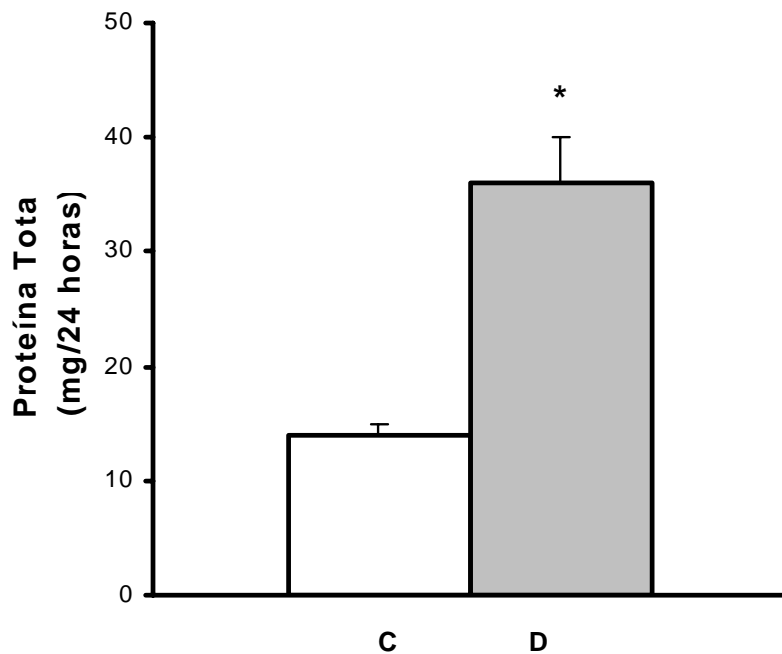


Figura 4: Concentración de proteína en orina de animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

La concentración de glucosa en orina de animales diabéticos fue de 131 ± 0.1 mg/dl mientras que en el grupo control fue de 0 mg/dl (Figura 5).

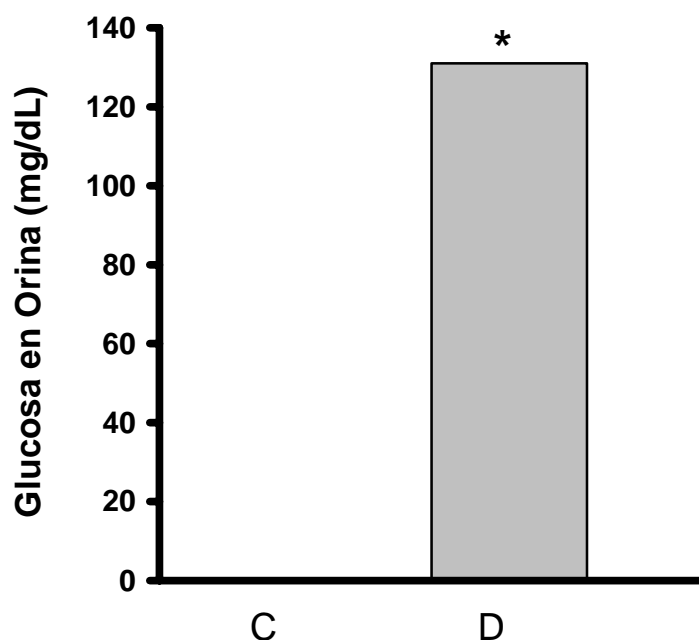


Figura 5. Concentración de glucosa en orina de animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$ * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

Después de determinar la función renal se diseco el riñón y de inmediato se congelo en nitrógeno líquido para la extracción de proteína y RNA. La expresión de receptor B1 a nivel de proteína se determino por Western blot (Figura 6) y a nivel de RNAm se determino por RT-PCR (Figura 7), como se puede observar en ambos casos se aumenta la expresión del receptor B1.

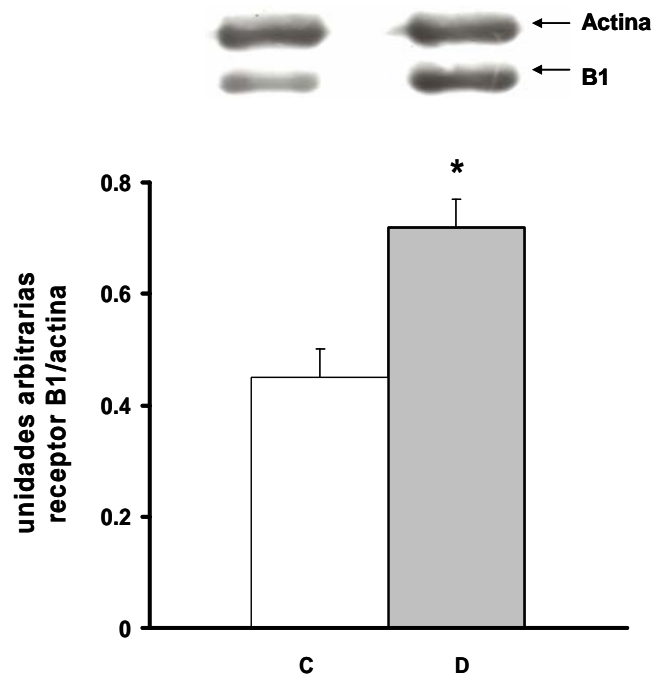


Figura 6. Expresión del receptor B1 al nivel de proteína en animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5 *P<0.05 cuando se compara con el control.

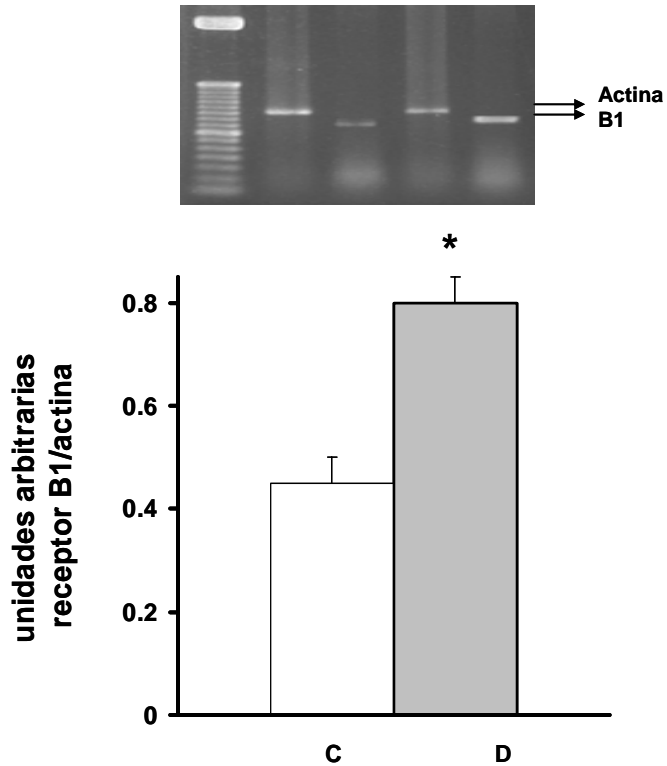


Figura 7. Expresión del receptor B1 al nivel de RNAm en animales control (C) y diabéticos (D). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5 *P<0.05 cuando se compara con el control.

En la Figura 8 se muestra el peso corporal de los cuatro grupos experimentales: en los diabéticos ($208 \pm 10\text{g}$) y diabéticos tratados con ramipril ($226 \pm 10\text{g}$) disminuyo el peso corporal en comparación con los animales control ($271 \pm 10\text{g}$) y control ramipril ($305 \pm 10\text{g}$)

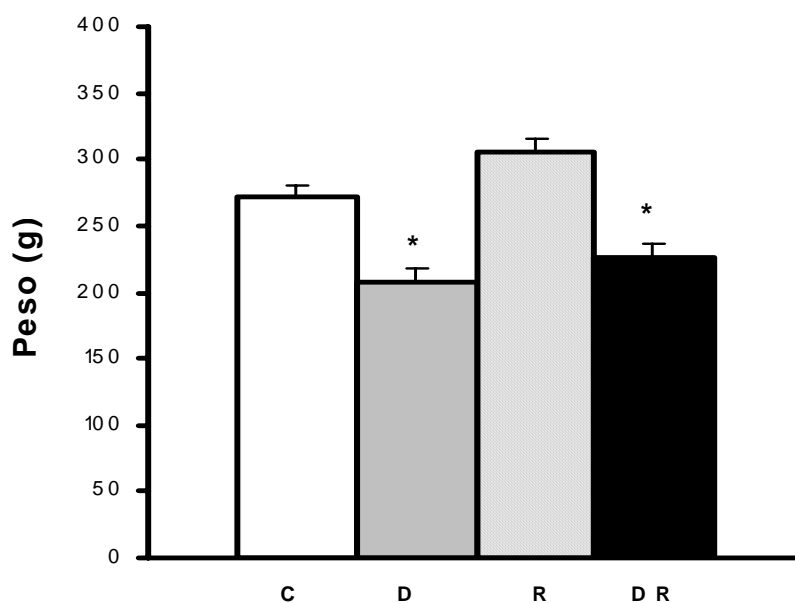


Figura 8: Peso corporal de animales control (C), diabéticos(D), control ramipril (R) y diabéticos tratados con ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

En los animales diabéticos y diabéticos tratados con ramipril la concentración de glucosa en sangre fue de $368 \pm 10 \text{ mg/dl}$ y $358 \text{ mg/dl} \pm 10$ respectivamente, mientras que en los animales control fue de $90 \text{ mg/dl} \pm 10 \text{ mg/dl}$ y en el grupo control tratado con ramipril fue de $87 \text{ mg/dl} \pm 10$ (Figura 9).

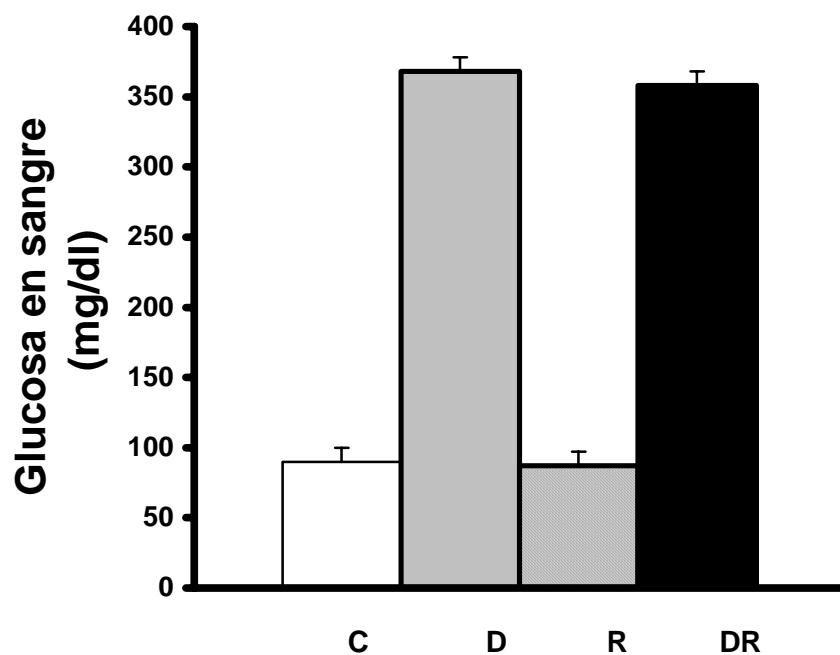


Figura 9: Concentración de glucosa en sangre de animales control (C), diabéticos (D), control ramipril (R) y diabéticos ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de $n=5$. * $P<0.05$ cuando se compara con el control.

En la Figura 10 observamos que en el grupo de animales diabéticos y diabéticos tratados con ramipril ($69 \pm 7\text{ml}$ y $61 \pm 2\text{ml}$ respectivamente) aumentó el volumen urinario en 24 horas en comparación a los grupos control con y sin ramipril ($24 \pm 1\text{ml}$ y $28 \pm 2\text{ml}$ respectivamente).

En la Figura 11 se muestra que la concentración de proteína en orina incrementó en los animales diabéticos $36 \pm 4 \text{ mg}/24 \text{ h}$ en comparación con el grupo control y disminuyó en los animales diabéticos tratados con ramipril $21 \pm 4 \text{ mg}/24 \text{ h}$ en comparación con los animales diabéticos.

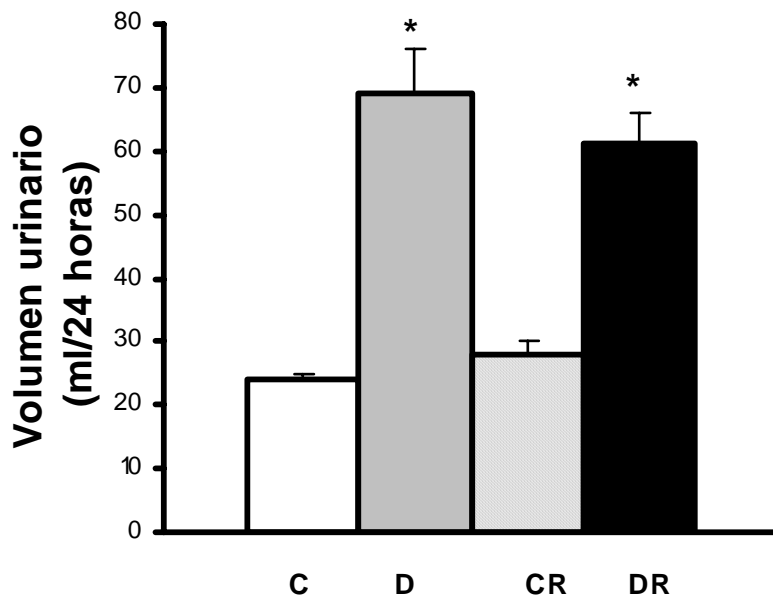


Figura 10: Volumen urinario de animales control (C), diabéticos (D), control ramipril (R) y diabéticos ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5. *P<0.05 cuando se compara con el control.

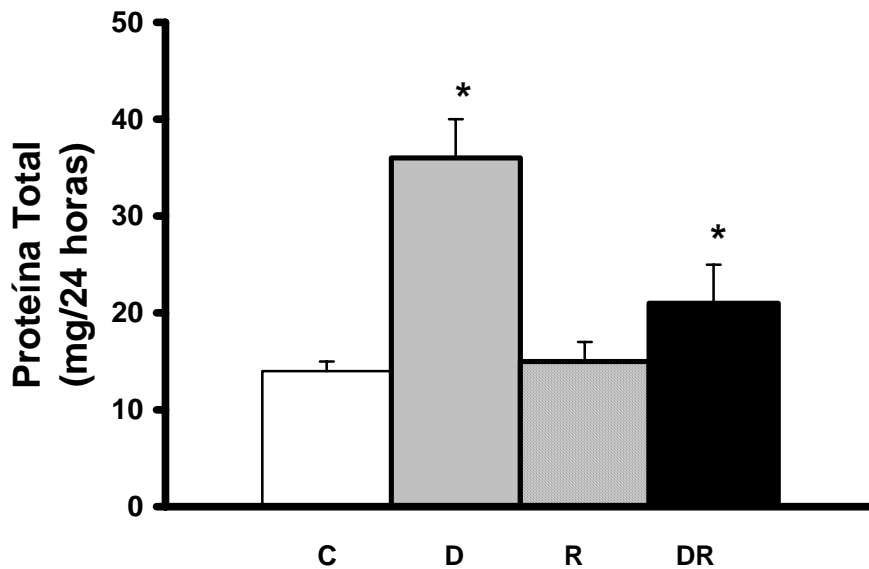


Figura 11: Proteína total en orina de animales control (C), diabéticos (D), control ramipril (R) y diabéticos ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5. *P<0.05 cuando se compara con el control.

Se induce la expresión del receptor B1 a nivel de proteína en los animales diabéticos en comparación con el grupo control pero disminuye su expresión en los animales diabéticos tratados con ramipril (Figura 12). Como se puede observar a nivel de RNAm el ramipril también disminuye la expresión del receptor B1 (Figura 13).

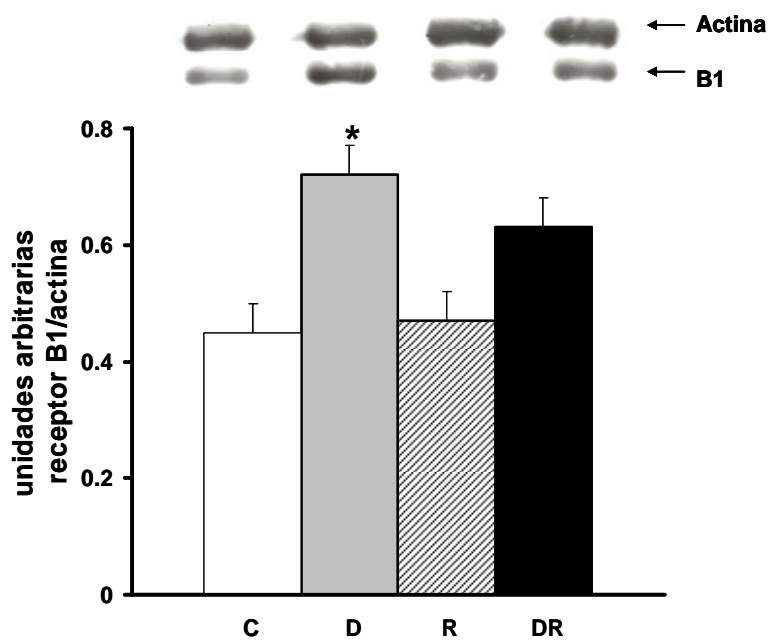


Figura 12: Expresión del receptor B1 a nivel de proteína en animales control (C), diabéticos (D), control ramipril (R) y diabéticos ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5. *P<0.05 cuando se compara con el control.

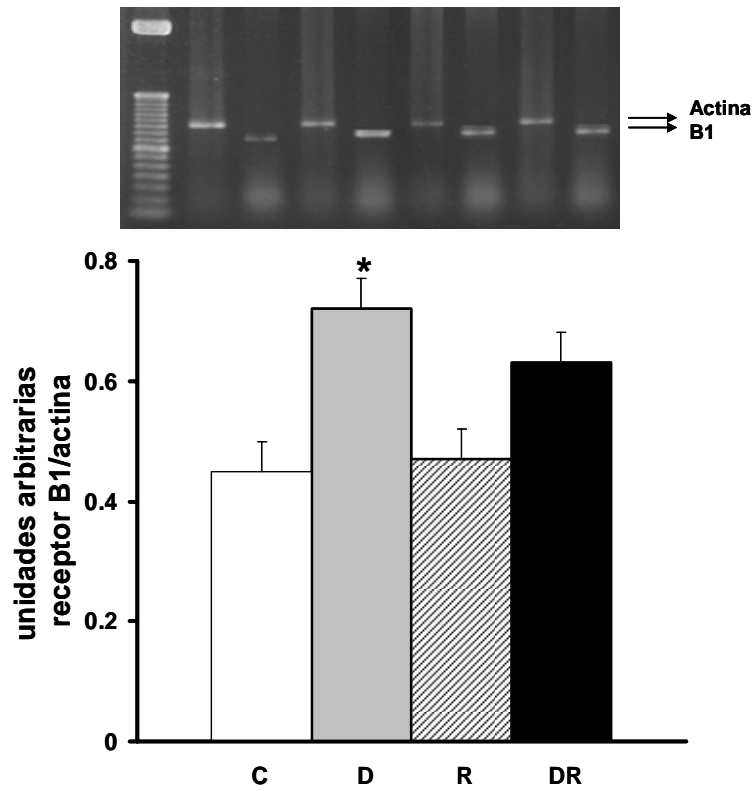


Figura 13: Expresión del receptor B1 a nivel de RNAm de animales control (C), diabéticos (D), control ramipril (R) y diabéticos ramipril (DR). Cada barra representa la media \pm EEM de n=5. *P<0.05 cuando se compara con el control.

4. DISCUSIÓN:

En los humanos, la deficiencia de insulina constituye un estado patológico común grave. En los animales puede producirse mediante la pancreatectomía, por la administración de aloxán, estreptozotocina (STZ) y otras toxinas las cuales en dosis apropiadas producen la destrucción selectiva de las células β de los islotes del páncreas; también se han descrito cepas de ratones, ratas, hámsters y cobayos, las cuales presentan una gran frecuencia de diabetes mellitus espontánea (Szkudelski, T; 2001).

La diabetes se caracteriza por poliuria, polidipsia, pérdida de peso a pesar de la polifagia (aumento del apetito), hiperglicemia, glucosuria y cetosis (Rees D., Alcolado J. 2004).

En el presente trabajo, los animales a los cuales se les administro STZ, mostraron pérdida de peso, hiperglicemia, poliuria, proteinuria y glucosuria; estos resultados demuestran que la administración de STZ induce diabetes. Mage y col, 2002; también reportan que la STZ produce hiperglicemia, pérdida de peso e incremento en la presión arterial.

Es importante señalar que la hiperglicemia por si misma, es capaz de producir síntomas por la hiperosmolaridad de la sangre. Adicionalmente se presenta glucosuria debido a que se excede la capacidad renal para la absorción de glucosa. La excreción de las moléculas de glucosa osmóticamente activas entraña la pérdida de grandes cantidades de agua (diuresis osmótica); la disminución resultante activa el mecanismo regulador de la ingestión del agua y da lugar a polidipsia. Se presentan pérdidas mínimas considerables de Na^+ y K^+ . El

incremento de la ingestión calórica por cubrir esta pérdida, simplemente aumenta mas la glucosa plasmática e incrementa la glucosuria de manera que no se evita i la movilización de las reservas de proteínas y grasas endógenas, ni la pérdida de peso.

Existen evidencias que apoyan el papel del sistema calicreína-cininas como un mediador de los cambios hemodinámicas inducidos en la diabetes. En ratas diabéticas con hiperglicemia moderada se ha observado un aumento en los niveles de calicreína y cininas renales y urinarias, junto a una disminución en la resistencia vascular lo que lleva aun aumento en la tasa de filtración glomerular (TFG) y flujo plasmático renal (FPR). El tratamiento agudo de estas ratas con aprotinina (un inhibidor de la calicreina) o con HOE-140 (un antagonista del receptor B2), disminuye la TFG y el FPR, y aumenta la resistencia vascular renal.

En el presente trabajo se demostró que se induce la expresión del receptor B1 a nivel de proteína y RNAm en el riñón de animales diabéticos. Resultados similares han sido reportados en un modelo de diabetes así como en diferentes modelos de hipertensión, como los que se describen a continuación: En la corteza renal de ratas diabéticas se incrementa la expresión del receptor B1 a nivel de proteína y RNAm (Mage y col, 2002). En ratones Knock-out al receptor B2 con o sin nefrectomía subtotal o con hipertensión renovascular, aumenta la expresión del receptor B1 a nivel de RNAm en tejido cardiaco y renal. (Duka I y col, 2001). Además en ratas SHR con 16 semanas de edad la infusión de un antagonista del receptor B1 aumenta la presión arterial y la excreción de albúmina; Estos resultados sugieren que el receptor B1 evita el daño renal (Hagiwara M y col, 2004).

Sin embargo, se ha reportado que aumenta la permeabilidad vascular en aorta, corteza y medula renal de ratas diabéticas y permanece elevada por 4 semanas; el tratamiento con R-954, un antagonista del receptor B1 disminuye la permeabilidad vascular; estos resultados sugieren que el receptor B1 participa en las complicaciones vasculares de animales diabéticos. (Lawson y col, 2005). Es decir no se ha establecido si el receptor B1 participa o evita el daño renal de animales diabéticos.

Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina es un tratamiento efectivo para demorar el desarrollo de la nefropatía diabética.

Actualmente, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se utilizan para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y la presión arterial alta (hipertensión). También se administran tras un ataque cardíaco, porque algunos estudios demuestran que estos medicamentos pueden limitar el daño sufrido por el músculo cardíaco. Y como ya se mencionó, los inhibidores de la ECA también se recetan para ciertos tipos de problemas renales, especialmente en pacientes diabéticos.

El sistema renina angiotensina se halla vinculado a través de la enzima de convertidora de angiotensina (ECA) con el sistema de las cininas. Esta enzima inactiva a las cininas mientras que transforma a la angiotensina I en II.

El mecanismo de acción del IECA se basa en la interrupción de la síntesis de angiotensina II con lo cual se previene el efecto vasoconstrictor y la secreción de aldosterona (Brunner HR y col, 1983). Es eficaz a largo plazo, en la reversión

de hipertrofia ventricular izquierda así como la reducción de la proteinuria y su acción protectora renal no sólo en pacientes diabéticos sino también en hipertensos esenciales con microalbuminuria (Parving HH y col, 1988; Gottdiener JS, 1999). Los IECA aumentan la acción del sistema de las cininas con aumento de la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras y natriuréticas (Prostaciclina, PGE₂).

Se ha reportado que en ratas normotensas, el ramipril (inhibidor de la ECA) induce la expresión del receptor B1 a nivel de RNAm en arteriola eferente, glomérulo, tubulo proximal, tubulo distal y tubulo colector de la nefrona. Además en ratones wild-type y KOB2 el ramipril induce la expresión del receptor B1 a nivel de RNAm (Marin-Castaño 2002).

En el presente trabajo se demostró que se induce la expresión del receptor B1 a nivel de proteína y RNAm en los animales diabéticos en comparación con el grupo control pero disminuye su expresión en los animales diabéticos tratados con ramipril. En otros estudio se ha reportado que el tratamiento con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) no modifica la expresión del receptor B1 a nivel de proteína y RNAm (Mage y col,2002).

En el presente trabaja, también se observó que en los animales a los que se les administro un IECA, persiste la hiperglicemia, la perdida de peso, no modifica el volumen urinario pero disminuye la proteinuria. Mage y col,2002; reportan que el tratamiento con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) en animales diabéticos normaliza la presión arterial sin embargo la hiperglicemia y la perdida de peso persiste. Por otro lado, Tschöpe C y

col, (2003); reportan que el ramipril no modifica el volumen urinario en ratas diabéticas pero si disminuye la proteinuria.

Es importante señalar que el tratamiento con inhibidores de la ECA no solo disminuye la concentración de Angiotensina II e incrementa la concentración de Bk, sino que también favorece a la producción de agonistas del receptor B1.

4.1 CONCLUSION:

Estos resultados sugieren que el Ramipril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, disminuyen el daño en la función renal así como la expresión del receptor B1 a nivel de RNAm y proteína en el riñón de animales diabéticos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdouh M y col. (2003). Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol.* 140(1):33-40.
2. ACE Inhibition in Diabetic Nephropathy Trialists Group, (2001) Should all patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria receive angiotensin converting enzyme inhibitors? A metaanalysis of individual patients' data. *Ann. Intern. Med.* 134, 370–379.
3. Andersen, S. et al. (2000) Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 57, 601–606.
4. Araúz - Pacheco C, Raskin P.(1992) Management of hypertension in diabetes. *Endocrinol Metabolic Clin N A;* 21 (2): 371 – 394.
5. Attman PO, Knight - Gibson C, Tavella M, Samuelsson O, Alaupovic P. (1998) The compositional abnormalities of lipoproteins in diabetic renal failure. *Nephrol Dial Transplant;* 13: 2833 - 2841.
6. Bach LA, Dean R, Youssef S, Cooper ME. (2000) Aminoguanidine ameliorates changes in the IGF system in experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15: 347 - 354.
7. Becker BN, Pintar T, Becker YT, Odorico JS, Pirch JD, Sollinger HW, Brazy PC. (1998) The survival benefit of simultaneous kidney - pancreas transplantation. 31 st. Annual Meeting & Scientific Exposition, American Society of Nephrology, October 25 - 28, Philadelphia.
8. Bhoola KD y col. (1992). Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens and kininase. *Pharmacol Rev.*44:1-80.
9. Blatter LA y col (1995). Simultaneous measurements of Ca⁺⁺ and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 76:922-924.

10. Brenner, B.M. et al. (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 345, 861–869.
11. Busse R y col. (1994). Control of nitric oxide and prostacyclin síntesis in endotelial cell. *Arneimittelforschung/Drug Res.* 44:392-396.
12. Carpentier JL, Paceaude JP.(1994) Molecular and cellular biology of insulin-receptor internalization. *Ann NY Acad Sci*;733:266-278.
13. Cohen MP, Sharma K, Eltayeb BO, Ziyadeh FN. (1998) The renal TGF - β system in the DB / db mouse model of diabetic nephropathy. *Exp Nephrol*; 6: 226 - 233.
14. Cooper ME. (1998) Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*; 352: 213 - 219.
15. Chan, J.C. et al. (2000) Long-term effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and metabolic control in hypertension type 2 diabetic patients. *Kidney Int.* 57, 590–600.
16. Cheatham B, Kahn CR.(1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*;16:117-142.
17. D.A. Rees and J.C. Alcolado.(2005) Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*; 22, 359-370.
18. Danser HJ y col. (1998). Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart. *Journal of hypertension.* 16:239-244.
19. Doege H, Schürmann A, Babrenherg G, Brauers A. Joost HG.(2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem*;275(21):16275-16280.
20. Duka I y col. (2001). Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ. Res.* 88:275-281.
21. Dzau VJ.(2001) Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hipotesis. *Hipertensión*; 37:1047-1052.
22. Ebeling P, Koistinen HA, Koivisto VA.(1998) Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Lett*;436:301-303.

23. Erdos, E.G. et al. (2001) Kinins, receptors, kininases and inhibitors. Where did they lead us? *Biol. Chem.* 382, 43–47.
24. Fasciolo JC y col. (1990). Bradykinin-induced contraction of rat mesenteric arteries precontracted with noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* 101:344-348.
25. Field JL y col. (1994). Bradykinin B2 receptors and coupling mechanisms in the smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci. *BR. J. Pharmacol.* 113:607-613.
26. Fisslthaler B y col. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 401:493-496.
27. Gardner DG. (2002) Manipulating the Renin-Angiotensin System: more than we bargained for? *Am J Med;* 112:152-153.
28. Gerstein, H.C. et al. (2000) Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 355, 253–269.
29. Gobeil f y col. (2002). Studies uon the angiotensin-converting enzyme and the kinin B2 receptor in the rabbit jugular vein. *Canadian Journal of physiology and Pharmacology.*80 :153-163.
30. Groves P y col. (1995). Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation.*92:3424-3430.
31. Grzeszc Zak W, Zychma, Lacka B, Zukowska - Szczechowska E. (1998) Angiotensin I converting enzyme gene polymorphisms: Relationship to nephropathy in patients with non - insulin dependent diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol;* 9: 1664 - 1669.
32. Hagiwara M y col. (2004). Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 27:399-408.
33. Hayashi H, Karasawa R, Inn H et al. (1992) An electron microscopic study of glomeruli in Japanese patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int;* 41: 749-757.
34. Hoogenberg K, Sluiter WJ, Navis G, Van Haeften TW, Smit AJ, Reitsma WD, Dullaart RPF. (1998) Exogenous norepinephrine induces an enhanced microproteinuric response in microalbuminuric insulin - dependent diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol;* 9: 643 - 654.

35. Hrick D.E. (1998) Combined kidney - pancreas transplantation. *Kidney Int*; 53: 1091 - 1102.
36. Hunter SJ, Garvey WT. (1998) Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system. *AmJ Med*;105:331-345.
37. Ichikawa I. (1996) Will angiotensin II receptor antagonists be renoprotective in humans ? *Kidney Int*; 50: 684 - 692.
38. Ismail N, Becker B.N. (1994) Treatment options and strategies in Uremia: Current trends and future directions. *Sem Nephrol*; 14 (3): 282 - 299.
39. Kandror KV, Pilch PF. (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol*; 271:E1-14.
40. Kikkawa R, Kida Y, Haneda M. (1998) Nephropathy in type II diabetes - epidemiological issues as viewed from Japan. *Nephrol Dial Transplant*; 13: 2743 - 2745.
41. Kimura H, Gejyo F, Suzuki Y, Suzuki S, Miyazaki, Arakawa M. (1998) Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor - 1 genes in diabetes and macroangiopathy. *Kidney Int*; 54: 1659 - 1669.
42. Kudziora - Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. (1998) Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non - insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*; 13: 2829 --2832.
43. Lamothe B, Baudry A, Desbois P, Lamotte L, Bucchini D, Meyts PD, Joshi RL. (1998) Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem J*; 335:193-204.
44. Lawson SR y col. (2005). Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: Distinct vasculopathic profile of major key organs. *European Journal of pharmacology*. 514: 69-78.

45. Lewis, E.J. (2002) The role of angiotensin II receptor blockers in preventing the progression of renal disease in patients with type 2 diabetes. *Am. J. Hypertens.* 15, 123S–128S.
46. Lewis, E.J. et al. (2001) Renoprotective effect of the angiotensinreceptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 345, 851–860.
47. Mage M y col. (2002). Induction of B1 receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(4):328-33.
48. Marceau, F y col. (1998). The B1 receptors for kinin. *Pharmacol. Rev.* 50:357-386.
49. Margolius HS. (1995). Kallikreins and kinin. *Hypertensión.* 26:221-229.
50. Marin-Castaño ME y col. (2002). Induction of function bradykinin B1-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation.* 105:627-632.
51. Minshall RD y col. (1995). Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation Research.* 76:773-780.
52. Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, et al. (1995) Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet*; 346: 1080 - 1084.
53. Mombouli JV y col. (1997). Endothelium-derived hyperpolarizing factor (s): updating the unknown. *Trends in Pharmacological Science.* 18:252-256.
54. Ni A y col. (2003). Overexpression of Kinin B1 Receptors Induces Hypertensive Response to Des-Arg 9 -bradykinin and Susceptibility to Inflammation. *Biological Chemistry.* 278(1): 219–225.
55. Parving, H-H. et al. (2001) The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 345, 870–878.
56. Poulsen JE. (1998) Features to history of diabetology Copenhagen. pre-contracted rat thoracic aorta: role of RhoA/Rho-kinase and intracellular Ca Proud CG, Denton RM. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J*;328:329-341.

57. Raidoo DM y col. (1997), Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*. 36:153-160.
58. Schmidt A, Vaeth M: Microalbuminuria. (1988) a major risk factor in non - insulin - dependent diabetes. A 10 - year follow -up study of 503 patients. *Diabetic Med*; 5: 126 - 134.
59. Seino S, Seino M, Bell GI. (1990) Human insulin-receptor gene. *Diabetes*;39:129-113.
60. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci*;86:114-8.
61. Shepherd PR, Khan, BB. (1999) Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med*; 22:248-57.
62. Stehouwer CDA, Yudking JS, Fioretto P, Nosadini R. (1998) How heterogeneous is microalbuminuria in diabetes mellitus ? The case for "benign and "malignant" microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant*; 13: 1751 - 1754.
63. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Yanaka H, Maeda K, Kawashima S, Van Ypersele C, Kurokawa K. (1998) Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: Advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol*; 9: 1681 - 1688.
64. Thorogood J, Houwelingen JC, Persijn GG, et al. (1991) Prognostic indices to predict survival of first and second renal allografts. *Transplantation*; 52: 831 - 836.
65. Tigersted R, Bergman PG. (1898) Niere und kreislauf. *Scand Arch Physiol*; 8:223-271.
66. Tom y col. (2001). Negative inotropic effect of bradykinin in porcine isolated atrial trabeculae: role of nitric oxide. *Journal of Hypertension*. 19:1289-1293.
67. Tschöpe C y col, (2000). Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction. *Br J Pharmacol*. 129(8):1537-8.
68. Vanhoutte PM. (1993). Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*. 87:V9-V17.

69. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. (1982) Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin - dependent diabetes mellitus. *Lancet*; 1: 1430 - 1432.
70. Wang B, Balba Y, Knutson VP. (1996) Insulin-induced in situ phosphorylation of the insulin receptor located in the plasma membrane versus endosomes. *Biochem Biophys Res Commun*; 227:27-34.
71. Weiss MF, Rodby RA, Justice AC, Hricik DE and the Collaborative Study Group. (1998) Free pentosidine and neopterin as markers of progression rate in diabetic nephropathy. *Kidney Int*; 54: 193 - 202.
72. Wolf G, Ziyadeh FN. (1997) The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: Emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis*; 29 (1): 153 - 163.
73. Yang CH M y col. (1999). Pharmacological and Functional Characterization of Bradykinin Receptors in Rat Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell signal* 11(12):853–862.
74. Zuccollo y col. (1996). Effect of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharm.* 74:586-589.