



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOTENSINA-(1-7) EN LA  
HIPERTROFIA RENAL TEMPRANA EN UN MODELO  
DE DIABETES MELLITUS

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. ALMA ROSA NÚÑEZ ORTIZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Beatriz Vázquez Cruz

COMITÉ TUTOR: Dr. Rafael Villalobos Molina y Dra. Alicia Sánchez  
Mendoza

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2012





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOTENSINA-(1-7) EN LA  
HIPERTROFIA RENAL TEMPRANA EN UN MODELO  
DE DIABETES MELLITUS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. ALMA ROSA NÚÑEZ ORTIZ

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Beatriz Vázquez Cruz**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Rafael Villalobos Molina y Dra. Alicia Sánchez  
Mendoza**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2012**



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **NUÑEZ ORTÍZ ALMA ROSA** con número de cuenta 405070297 con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOTENSINA -(1-7) EN LA HIPERTROFIA RENAL TEMPRANA EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. BEATRÍZ VAZQUEZ CRUZ:**

Presidente: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS  
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO  
Secretario: DR. MARTÍN PALOMAR MORALES  
Suplente: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA  
Suplente: DRA. MARÍA ALICIA SÁNCHEZ MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de marzo 2012.

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, U.N.A.M.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico No. de beca 233847.

También agradezco el apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT *IN210307*.

A mi comité tutorial: Dra. Beatriz Vázquez Cruz, al Dr. Rafael Villalobos Molina y a la Dra. Alicia Sánchez Mendoza.

## Agradecimientos

Al profesor David Segura Cobos por su amable y valioso apoyo durante la realización de experimentos y la redacción de esta tesis, así como por ser un excelente compañero de laboratorio.

A los profesores Héctor Barrera Escoria y Pablo Ruíz Puga por permitirme el acceso al laboratorio de microscopia de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como asesorarme durante las observaciones.

A la M.V.Z. Yolanda Romero Sánchez por su apoyo para llevar a cabo la técnica histológica de eosina-hematoxilina, en el laboratorio de histopatología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A Hipólito Flores por su apoyo en el laboratorio.

A Abel Núñez Rodríguez por su cariño, apoyo y consejo en todo momento.

A mis hermanos (as) que siempre han estado conmigo.

A Gerardo García García por todo el amor y apoyo que me impulsan a seguir adelante.

A mis amigos por todo lo que hemos vivido juntos y por estar conmigo siempre.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Definición y aspectos generales de la diabetes mellitus.....	3
1.2 Clasificación .....	3
1.3 Complicaciones de la diabetes mellitus.....	4
1.4 Mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes mellitus .....	5
1.4.1 Aumento de la vía de los polioles.....	5
1.4.2 Glicación y formación de productos de glicación avanzada (AGEs).....	6
1.4.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC).....	7
1.4.4 Aumento de la vía de la hexosamina.....	7
1.5 Nefropatía Diabética.....	9
1.6 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).....	11
2. ANTECEDENTES.....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVO TERMINAL .....	17
4.1 OBJETIVOS INTERMEDIOS .....	17
5. METODOLOGÍA .....	17
5.1 Material biológico .....	17
5.2 Reactivos de uso general .....	18
5.3 Reactivos especiales:.....	18
5.4 Equipo de laboratorio .....	19
5.5 Reproducción del modelo de diabetes mellitus .....	20
5.6 Estudio de la hipertrofia renal (HR) .....	21

5.6.1 Técnica histológica .....	21
5.6.2 Aislamiento de DNA por el método de TRIZOL® Reagent.....	22
5.7 Estudio de la función renal .....	22
5.7.1 Cuantificación de creatinina .....	22
5.7.2 Cuantificación de proteínas en orina. ....	23
5.8 Análisis por inmunoblot (Western blot) de la expresión de receptores AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub> . ....	23
5.8.1 Homogenización de médula .....	23
5.8.2 Homogenización de corteza .....	23
5.8.3 Homogenización de los cultivos celulares .....	24
5.9. Inmunoblots de los receptores AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub> . ....	25
5.9.1 Electroforesis.....	26
5.9.2 Transferencia a membranas.....	26
5.10 Tratamiento con losartán o captopril .....	21
5.11 Análisis estadístico .....	28
6. RESULTADOS .....	28
6.1 Reproducción del modelo de diabetes mellitus (DM) .....	28
6.2. Estudio de la HR.....	31
6.3 Determinación de la presencia de los receptores AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub> en el riñón de ratas control y diabéticas .....	33
6.4 Efecto de los tratamientos con losartán o captopril en las ratas diabéticas.....	35
6.5 Efecto del tratamiento del losartán o captopril sobre la HR.....	40
6.6 Efecto del tratamiento con losartán o captopril sobre la función renal.....	43
6.7 Expresión de los receptores AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub> en corteza y médula renal. ....	45
6.8 Expresión de receptores en las células tubulares proximales LLC-PK1.....	49
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51

7.1 Reproducción del modelo de DM .....	51
7.2. Cultivo celular.....	57
8. CONCLUSIONES .....	59
9. BIBLIOGRAFÍA .....	60
APÉNDICES.....	71
APÉNDICE 1. Técnica histológica.....	71
APÉNDICE 2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	71
APÉNDICE 3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry. ....	72
APÉNDICE 4. Preparación de geles para electroforesis.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1 Principales mecanismos que desencadenan el desarrollo de la nefropatía diabética</i> .....	8
<i>Fig. 2 Principales péptidos del sistema renina-angiotensina-aldosterona</i> .....	13
<i>Fig. 3 Biosíntesis de la Ang-(1-7)</i> .....	15
<i>Fig. 4 Disposición de los filtros, la membrana PVDF y el gel de electroforesis en la cámara de transferencia.</i>	27
<i>Fig. 5 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre la glucosa sanguínea</i> .....	29
<i>Fig. 6 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el consumo de agua durante 24 h</i> .....	29
<i>Fig. 7 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el consumo de alimento durante 24 h</i> .....	30
<i>Fig. 8 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el volumen urinario en 24 h</i> .....	30
<i>Fig. 9 Curso temporal del peso de las ratas control y diabéticas, durante 7 d</i> .....	31
<i>Fig. 10 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el peso del riñón en el séptimo día de DM</i> .....	32
<i>Fig. 11 Cortes histológicos teñidos con la técnica E-H</i> .....	32
<i>Fig. 12 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el área de las células del túbulo proximal</i> .....	33
<i>Fig. 13 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en corteza y médula renal</i> .....	34
<i>Fig. 14 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en corteza y médula renal</i> .....	34
<i>Fig. 15 Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre los niveles de glucosa sanguínea.</i> .....	35
<i>Fig. 16 Efecto de losartán o captopril sobre la hiperglucemia</i> .....	36
<i>Fig. 17 Efecto de losartán o captopril sobre el consumo de agua en ratas diabéticas</i> .....	36
<i>Fig. 18 Efecto de losartán o captopril sobre el consumo de alimento de ratas diabéticas en 24 h</i> .....	38
<i>Fig. 19 Efecto de losartán o captopril sobre el volumen urinario de ratas diabéticas en 24 h</i> .....	39

<i>Fig. 20 Efecto de losartán o captopril sobre el peso corporal de ratas diabéticas en 24 h</i>	39
<i>Fig. 21 Efecto de losartán o captopril sobre el peso del riñón</i>	41
<i>Fig. 22 Cortes histológicos procesados con la técnica de Eosina-Hematoxilina</i>	42
<i>Fig. 23 Efecto de losartán o captopril sobre el área de las células del túbulo proximal en ratas diabéticas</i>	42
<i>Fig. 24 Efecto de losartán o captopril sobre el cociente renal proteínas/DNA en ratas control y diabéticas</i>	43
<i>Fig. 25 Efecto de losartán o captopril sobre la excreción de proteínas en orina de ratas diabéticas</i>	44
<i>Fig. 26 Efecto de losartán o captopril sobre la depuración de creatinina en ratas diabéticas</i>	45
<i>Fig. 27 Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la corteza de ratas diabéticas</i>	46
<i>Fig. 28 Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la médula de ratas diabéticas</i>	46
<i>Fig. 29 Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en la corteza de ratas diabéticas</i>	47
<i>Fig. 30 Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en la médula de ratas diabéticas</i>	48
<i>Fig. 31 Efecto del losartán sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en células incubadas en glucosa alta.</i>	49
<i>Fig. 32 Efecto del PD123319 sobre la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en células incubadas en glucosa alta</i>	50
<i>Fig. 33 Efecto del D-Ala Ang-(1-7) sobre la expresión del receptor Mas en células incubados en glucosa alta</i>	51

#### Lista de abreviaturas

12-LO	12-lipooxigenasa
ADH	Hormona Antidiurética o vasopresina (Antidiuretic Hormone)
AGEs	Productos de glicación avanzada (Advanced Glycation End-products)
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANOVA	Análisis de Varianza
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection)
ATP	Trifosfato de adenosina
BK	Bradicinina (Bradykinin)
C	Grupo de ratas control
CDK	Cinasas Dependientes de Ciclinas (Cyclin-dependent Kinases)
CTGF	Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (Connective Tissue

	Growth Factor)
D	Grupo de ratas diabéticas
DAG	Diacilglicerol
DC	Grupo de ratas diabéticas tratadas con captopril
DL	Grupo de ratas diabéticas tratadas con losartán
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECA-2	Enzima Convertidora de Angiotensina-2
ECM	Matriz extracelular (Extracellular Matrix)
EEM	Error Estándar de la Media
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor)
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)
GLUT	Transportador de glucosa (Glucose Transporter)
GN	Glucosa normal (5.5 mM)
GA	Glucosa alta (25 mM)
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenoico (Hydroxyeicosatetraenoic Acid)
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor)
HR	Hipertrofia renal
i.p.	Intraperitoneal
IGF-1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (Insulin-like Growth Factor 1)
LLC-PK1	Línea Celular del epitelio Renal de Cerdo (Porcine Kidney Epithelial Cell Line)
MAPKs	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (Mitogen-activated Protein Kinase)
MCP-1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos (Monocyte Chemoattractant Protein)
MODY	Diabetes tipo 2 de aparición juvenil (Maturity onset diabetes of the young)

ND	Nefropatía Diabética
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcripción kappa B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NO	Óxido Nítrico (Nitric Oxide)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1 (Plasminogen Activator inhibitor-1)
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos (Phosphate buffered saline)
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (Platelet-Derived Growth Factor)
PKC	Proteína Cinasa C (Protein Kinase C)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene fluoride)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TBST	Amortiguador Tris salino suplementado con Tween 20 (Tris-Buffered Saline supplemented with Tween 20)
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ (Transforming Growth Factor $\beta$ )
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

## RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno crónico que se presenta por alteración del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; y se caracteriza por hiperglucemia. La frecuencia de este padecimiento ha aumentado del 10.5% al 22%, entre 2000 y 2005. Los pacientes diabéticos sin un adecuado control de la glucemia pueden desarrollar diferentes complicaciones, una de las cuales es la nefropatía diabética, que afecta entre el 15 y el 25% de los pacientes con DM tipo 1 y del 30 al 40% de pacientes con DM tipo 2. La nefropatía diabética es considerada la principal causa de enfermedad terminal renal que puede llevar a la muerte. No se ha descrito claramente la fisiopatología de la nefropatía diabética; sin embargo, se sabe que la hiperfiltración glomerular y la hipertrofia renal (HR) participan, de manera importante, en su desarrollo. Se ha observado que durante la HR se activan diferentes componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y que el daño renal durante la DM es causado, principalmente, por incremento de la actividad de la angiotensina II, a través su receptor  $AT_1$ , y disminución del receptor  $AT_2$ . En este trabajo se empleó un modelo de DM inducida por estreptozotocina ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ), en ratas macho Wistar con un transcurso de 7 días y se inhibió al SRAA por losartán o captopril. Observamos que durante la DM se presentaron los síntomas típicos (hiperglucemia, polidipsia, poliuria y pérdida de peso), y se observó un aumento del peso renal y modificaciones estructurales renales, como: mayor área de las células del túbulo proximal; también se presentaron modificaciones funcionales renales, como aumento de proteínas en orina. La expresión del receptor  $AT_1$  en las células tubulares aumentó y el receptor  $AT_2$  disminuyó. Al inhibir el SRAA observamos que el losartán provocó disminución significativa del consumo de agua, del volumen urinario, del peso renal y de la proteinuria; mientras que el captopril no modificó significativamente estos parámetros. Para conocer las alteraciones causadas por exposición a la alta concentración de glucosa, y determinar el efecto directo de los antagonistas de los receptores  $AT_1$ ,  $AT_2$  y *Mas*, se realizaron experimentos en células LLC-PK1 y se observó que la expresión de los receptores

AT<sub>1</sub> y *Mas* incrementaron en respuesta a la glucosa alta y el receptor AT<sub>2</sub> disminuyó con respecto a lo observado en glucosa normal, lo que podría ser un mecanismo homeostático para contrarrestar los efectos Ang II-receptor AT<sub>1</sub>.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disorder that occurs by alterations of the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, and is characterized by hyperglycemia. In Mexico the frequency of DM has increased from 10.5% to 22% from 2000 to 2005. Diabetic patients with inadequate glycemic control may develop different complications; one of these is diabetic nephropathy, which affects 15-25% of patients with type 1 DM and 30-40% of patients with type 2 DM. Diabetic nephropathy is considered the leading cause of end-stage renal disease that can lead to death. The pathophysiology of diabetic nephropathy is still unclear, but it is known that both glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy are significantly involved in its development. Renal hypertrophy involves activation of different components of the renin-angiotensin system (RAS), and it is known that kidney damage during DM is mainly caused by increased activity of angiotensin II through its AT<sub>1</sub> receptor and diminished AT<sub>2</sub> receptor. In this work, we used a model of streptozotocin-induced DM (65 mg kg<sup>-1</sup>) in Wistar male rats, with a course of 7 days, and inhibited the RAS by losartan or captopril administration. Rats treated with streptozotocin shows clinical symptoms of DM (hyperglycemia, polydipsia, polyuria and weight loss), and increased kidney weight and renal structural changes (increased area of proximal tubule cells) were observed; while functional changes as increased urinary protein. In diabetic rats AT<sub>1</sub> receptor expression increased and AT<sub>2</sub> receptor expression decreased. Diabetic rats treated with losartan significantly reduced water consumption, urinary volume, renal weight and proteinuria; whereas captopril did not significantly alter these parameters. We also conducted experiments with cultured LLC-PK1 cells, and found that both AT<sub>1</sub> and *Mas* receptor expression increased in high glucose concentration; while AT<sub>2</sub> receptor expression decreased with respect to values found in normal glucose, which could be a homeostatic response.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Definición y aspectos generales de la diabetes mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno crónico que se presenta con alteración del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; se caracteriza por hiperglucemia, debido a la inadecuada secreción de insulina, o por deficiencia de la acción insulínica, o por efecto de la combinación de ambas, con alta morbi-mortalidad a nivel mundial (Kumar *et al.*, 2005; Mathis *et al.*, 2001). De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006) la frecuencia de este padecimiento ha aumentado del 10.5% al 22% entre 2000 y 2005.

## 1.2 Clasificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a la DM en: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional y otros tipos específicos (Tabla 1); las dos variantes principales son la DM tipo 1 y la DM tipo 2. La DM tipo 1, antes conocida como insulino dependiente o juvenil, es causada, por la destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$ , que se localizan en los islotes de Langerhans pancreáticos, por las células T; un subtipo de ésta, también se asocia con una grave deficiencia de insulina, pero sin signos de alteración inmunitaria por lo que también se le conoce como DM idiopática de la DM tipo 1. Por otro lado, la DM tipo 2, conocida anteriormente como no insulino dependiente o del adulto, es la más frecuente, afecta a cerca del 80% de los pacientes con DM, es causada por resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina y en ciertos casos por deficiencia relativa de la hormona. La mayoría de los expertos considera que la resistencia a la insulina es el fenómeno primario, mientras que la deficiencia de la secreción es el resultado de la hiperglucemia sostenida y la sobre-estimulación persistente de la célula  $\beta$ ; sin embargo, el mecanismo del desarrollo de la DM tipo 2 es el menos conocido (Brenner *et al.*, 2001; Donath y Halban, 2004 y Tuomilehto *et al.*, 2001). La DM gestacional es el resultado de la intolerancia a la glucosa durante el

embarazo y en la mayoría de los casos la glucemia regresa a la normalidad después del parto.

**Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus. MODY (Maturity onset diabetes of the young, Diabetes tipo 2 de aparición juvenil).**

I.	Diabetes mellitus tipo 1
	A. De causa inmunitaria (tipo 1A)
	B. Idiopática
II.	Diabetes mellitus tipo 2
III.	Otros tipos específicos de diabetes
	A. Defectos genéticos de la función de las células caracterizadas por mutaciones de
	1. Factor de transcripción nuclear hepatocítico (HNF) 4 $\alpha$
	2. Glucocinasa
	3. Factor de transcripción Nuclear Hepatocítico 1 $\alpha$
	4. Factor Promotor de la Insulina
	B. Defectos genéticos en la acción de la insulina (por ejemplo, resistencia a la insulina del tipo A).
	C. Enfermedades del páncreas exocrino: pancreatitis, pancreatectomía, neoplasia, fibrosis quística, hemacromatosis
	D. Endocrinopatías: Síndrome de Cushing, acromegalia, feocromocitoma, hipertiroidismo, glucagonoma.
	E. Fármacos o sustancias químicas: glucocorticoides, tiazidas, otros.
	F. Infecciones: rubéola congénita, citomegalovirus, Virus Coxsackie, otros.
	G. Formas desconocidas de diabetes de causa inmunitaria: síndrome del “hombre rígido”, anticuerpos antirreceptor de la insulina
	H. Otros síndromes genéticos asociados a diabetes: Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, etc.
IV.	Diabetes mellitus gestacional

### 1.3 Complicaciones de la diabetes mellitus

La morbilidad asociada a la DM de larga duración, de cualquier tipo, se debe a diversas complicaciones, las cuales pueden clasificarse como:

- a) Complicaciones a corto plazo
- b) Complicaciones a largo plazo

Las complicaciones a corto plazo son: hiperglucemia, hipoglucemia, coma hiperosmolar no cetósico y cetoacidosis diabética.

Las complicaciones a largo plazo son: patologías en vasos sanguíneos, ojos, nervios y riñones (Goodman, 2003), que conllevan a enfermedades cardiovasculares, neuropatía diabética, retinopatía diabética y nefropatía diabética (Andersen *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1993).

#### **1.4 Mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes mellitus**

Se han estudiado varios mecanismos que relacionan la hiperglucemia con las complicaciones de la DM de larga evolución. En la actualidad se considera a cuatro de ellos como los más importantes: 1) aumento de la vía de los polioles; 2) formación de productos de glicación avanzada (AGEs); 3) activación de la proteína cinasa C (PKC); y 4) aumento de la vía de la hexosamina (Fig. 1) (Brownlee, 2001; Makino *et al.*, 2002; Rodby, 1997).

##### **1.4.1 Aumento de la vía de los polioles**

En algunos tejidos que no requieren insulina para el transporte de glucosa, como los nervios, el cristalino, los riñones y los vasos sanguíneos, la hiperglucemia provoca aumento de la glucosa intracelular; donde es reducida a sorbitol por la aldosa reductasa, que posteriormente se oxida a fructosa por una segunda enzima, la sorbitol deshidrogenasa. La acumulación de sorbitol y fructosa incrementa la osmolaridad intracelular, provocando entrada de agua y lesión celular osmótica. En el cristalino el agua, osmóticamente absorbida, provoca tumefacción y opacidad. La acumulación de sorbitol también altera las bombas iónicas y se cree que facilita la lesión de las células de Swann y los pericitos de los capilares retinianos, con la consiguiente neuropatía periférica y formación de microaneurismas retinianos. En el caso del riñón (mesangio y células del túbulo proximal), la acumulación de sorbitol altera la concentración de *mio*-inositol celular y reduce la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. La fructosa, como segundo producto de

la vía, puede contribuir a la fructosilación no enzimática de proteínas y a la generación de AGEs (Dunlop, 2000).

#### **1.4.2 Glicación y formación de productos de glicación avanzada (AGEs)**

Los azúcares se unen covalentemente con los grupos amino libres de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El grado de glicación no enzimática es proporcional al valor de la glucemia. Los productos de glicación precoz del colágeno y otras proteínas de vida larga que existen en los intersticios y en las paredes de los vasos sanguíneos experimentan reordenamientos químicos que los llevan a formar estructuras complejas llamadas productos terminales de glicación avanzada (AGEs). Los AGEs en proteínas como el colágeno generan enlaces cruzados entre los polipéptidos, los cuales pueden atrapar proteínas plasmáticas intersticiales no glucosiladas, entre otras las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con lo que se retrasa su salida desde la pared del vaso, facilitando el depósito de colesterol. Los AGEs pueden alterar la estructura y función de capilares, incluidos los del glomérulo renal, resultando en el aumento del grosor de las membranas basales, haciéndolos más permeables (Kumar *et al.*, 2005).

Los AGEs pueden unirse a receptores de diferentes tipos celulares, como: endotelio, monocitos, macrófagos, linfocitos, células mesangiales, entre otras. Esa unión induce diversas actividades biológicas, como migración de monocitos, liberación de citocinas y factores de crecimiento por los macrófagos, aumento de la permeabilidad endotelial, incremento de la proliferación y síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos y las células musculares lisas. Otros eventos de señalización inducidos por los AGEs son: activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y factores de transcripción como el Factor nuclear de transcripción kappa B (NF- $\kappa$ B), que incrementan la actividad de varios factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y de ese modo alteran la expresión de proteínas de matriz extracelular (ECM). También provocan el aumento de la síntesis de colágeno I y IV, disminuyendo la expresión de proteoglicanos y promoviendo la polimerización y expansión de

proteínas anómalas de ECM (Kumar *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2000; Kanwar *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2002).

#### **1.4.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC)**

Varios estudios han reportado que los niveles de diacilglicerol (DAG) en el tejido vascular, la retina, la aorta, el corazón y el glomérulo renal están incrementados en la DM. Este aumento del DAG también fue reportado en células vasculares en cultivo, con dos concentraciones de glucosa en el medio de cultivo 5.5 y 22 mM por 3-5 días; como consecuencia de la elevación de la concentración de DAG, aumenta la actividad de la PKC, 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 nefropatía diabética (ND) (Lee *et al.*, 1989).

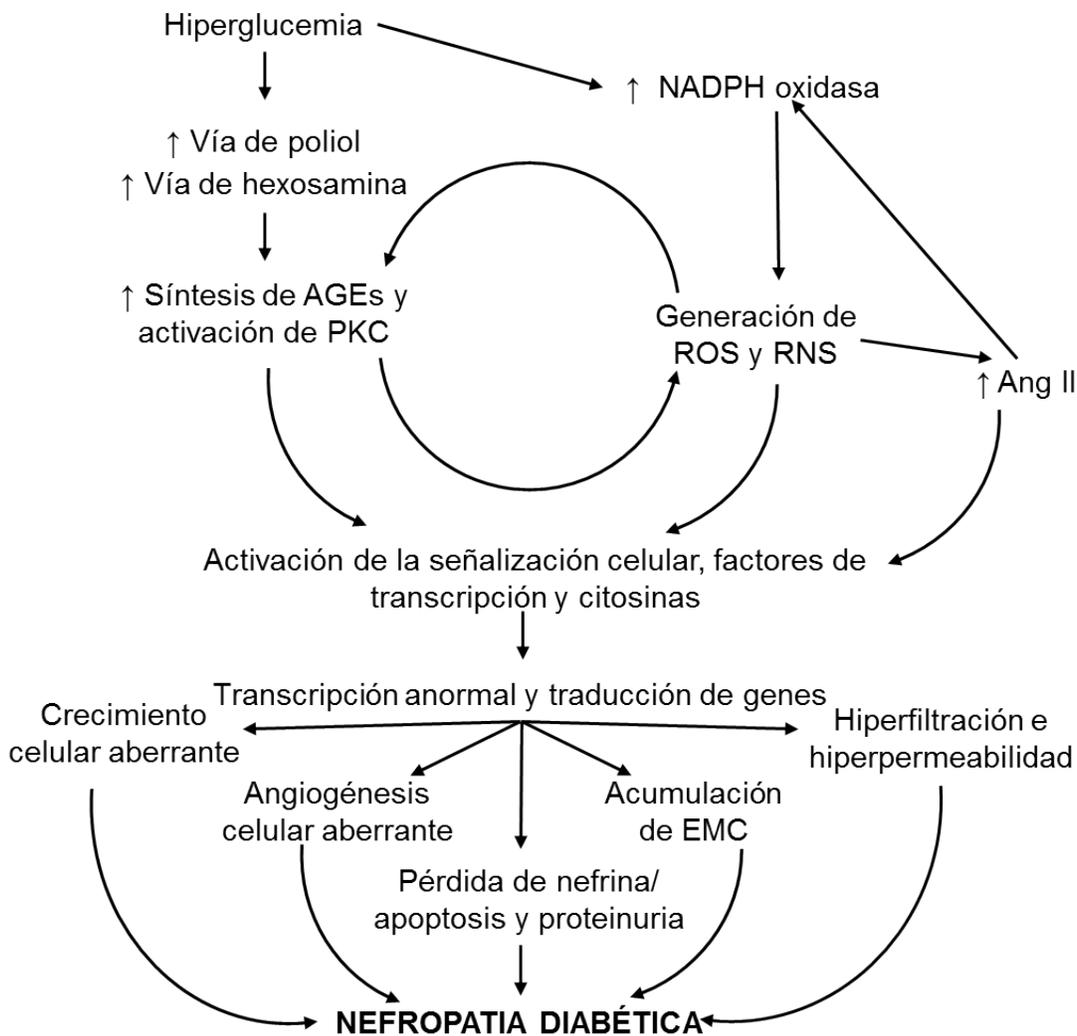
El aumento de actividad de la PKC, modula la expresión genética de las células mesangiales, incluyendo la síntesis proteica de ECM, especialmente colágeno tipo IV y fibronectina, mediados por el TGF- $\beta$  (Huang y Preisig, 2000). La activación de PKC se relaciona con activación de MAPKs, y es importante en la señalización extracelular para la proliferación e hipertrofia. La activación de PKC aumenta la producción de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE<sub>2</sub> y PG<sub>2</sub>), que participan en la hiperfiltración e incremento de la permeabilidad a la albúmina (Kanwar *et al.*, 2008).

#### **1.4.4 Aumento de la vía de la hexosamina**

Aproximadamente 2-5% de la glucosa entra a la vía de biosíntesis de hexosamina. En ésta vía, la fructosa-6-fosfato es convertida por la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa a glucosamina-6-fosfato y finalmente a uridina difosfato *N*-acetilglucosamina (UDP-*N*-acetilglucosamina); este último puede servir de sustrato para varias reacciones: la glicación de proteínas intracelulares, la síntesis de glucolípidos y proteoglicanos y la formación de moléculas ancladoras de glicosil fosfatidil inositol. Ante condiciones de glucosa

alta se ha observado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la biosíntesis de hexosaminas incrementa en células endoteliales, mesangiales y del músculo liso (Goldberg *et al.*, 2006).

Las hexosaminas estimulan la expresión de genes proescleróticos en las células mesangiales *in vitro* como el TGF- $\beta$ , el Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1(PAI-1), fibronectina y laminina, los que aceleran la acumulación de ECM y expansión mesangial *in vivo*, características de la DM (Satriano, 2007; Schleicher y Weigert, 2000).



**Fig. 1. Principales mecanismos que desencadenan el desarrollo de la nefropatía diabética.** AGEs, productos de glicación avanzada; PKC, proteína cinasa C, NADPH oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies

reactivas de nitrógeno; Ang II, Angiotensina II; EMC, matriz extracelular. Modificado de Kanwar *et al.*, 2008 y Lakshmanan *et al.*, 2011.

## 1.5 Nefropatía Diabética

La ND es una complicación frecuente en pacientes con DM sin control adecuado de su glucosa sanguínea. Afecta del 15 al 25% de los pacientes con DM tipo 1 y entre el 30 y 40% de los pacientes con DM tipo 2, e implica daños micro y macrovasculares, y es considerada como la principal causa de enfermedad renal terminal que puede llevar a la muerte (Benter *et al.*, 2007; Hovind *et al.*, 2001; Sheetz y King, 2002; Wang *et al.*, 2011).

El síndrome clínico de la ND consiste en proteinuria, hipertensión y disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (Andersen *et al.*, 1983; Hovind *et al.*, 2001; Mauer *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 2005; Schena y Gesualdo, 2005; Seyer-Hansen, 1983). Durante su desarrollo se presentan cambios estructurales y funcionales.

Dentro de los cambios estructurales se incluyen: la **hipertrofia renal** (HR), la cual es uno de los cambios más tempranos que consiste en el incremento de tamaño de cada célula renal (Wolf, 2002), la **glomeruloesclerosis difusa**, que es una de las primeras anormalidades demostradas con el microscopio electrónico e incluye engrosamiento difuso de la membrana basal capilar del glomérulo, el aumento de ECM y la proliferación de las células mesangiales (Kumar *et al.*, 2005), así como la **glomeruloesclerosis nodular** (glomeruloesclerosis intercapilar o enfermedad de Kimmelstiel-Wilson), que consiste en una lesión de los glomérulos causada por depósitos nodulares de la matriz laminar en el centro mesangial del lobulillo, esos nódulos se desarrollan en la periferia del glomérulo (Kumar *et al.*, 2005). Se presentan **lesiones vasculares** con formación de ateromas en las arterias renales o sus ramas principales, produciendo isquemia y contracciones generalizadas o infartos focales (Kumar *et al.*, 2005; Lackshmanan *et al.*, 2011; Makino *et al.*, 2002; Stanton y King, 2011; Thomson *et al.*, 2002; Ziyadeh, 1993).

Los cambios funcionales son: **hiperfiltración glomerular** e **hiperfunción**; la hiperfiltración es el aumento de la tasa de filtración glomerular, considerado como indicador del control de la glucemia, así como factor de desarrollo de ND

(Hostetter, *et al*, 1981; Jerums *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2004). Bak *et al.*, (2000), demostraron en un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina (STZ) en ratas, mediante una serie de experimentos de hidrodinámica renal que la hipertrofia se presenta incluso 24 h después de la inducción de la hiperglucemia y precede a la **hiperfunción renal** (aumento de la absorción de solutos y cambios hemodinámicos). Thomson *et al.*, (2002) demostraron que el aumento en la tasa de filtración glomerular se debe principalmente al aumento en la reabsorción del túbulo proximal dado por la hipertrofia que la DM induce en el riñón. Estos autores demostraron que en la diabetes inducida por STZ, la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima que interviene en el desarrollo de la hipertrofia proximal inducida por la DM, aumenta un día después de administrar el compuesto y que el tratamiento previo con un inhibidor específico de la ODC atenúa la HR. De esta manera, estos grupos de investigadores sientan las bases para pensar que, aunque la nefropatía diabética puede ser un evento tardío en la evolución de la DM, los cambios iniciales que conllevan a dicha complicación suceden de manera muy temprana.

El túbulo contorneado proximal reabsorbe cerca del 65% del NaCl del filtrado glomerular, y del restante 35%, sólo 10% alcanza la mácula densa. Este NaCl regula la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2, la cual a su vez, participa en el mecanismo de señalización para la liberación de renina. Durante la DM se ha demostrado un aumento en la cantidad de COX-2 en algunas partes del riñón, en especial de la mácula densa, así como un aumento en la cantidad de radicales libres dependientes de la actividad de esta enzima (Khan *et al.*, 2001; Schambelan *et al.*, 1985; Tabatabaie *et al.*, 2003).

Asimismo se ha demostrado la participación de COX-2 en los cambios hemodinámicos renales en la DM (Perazella y Eras, 2000).

## 1.6 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

La renina liberada por el mecanismo de señalización de la COX-2 constituye el primer paso en la producción de angiotensina II (Ang II) (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Paul *et al.*, 2006).

El papel de la Ang II durante la diabetes sobre la fisiología y morfología renal se ha estudiado intensamente a raíz de la demostración en animales y en la clínica de la mejora en la función renal y el efecto renoprotector de los fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> (Arici y Erdem, 2009; Mogensen, 1982; Donnelly, 1992; Maschio *et al.*, 1996; Hilgers y Mann, 2002; Rossing *et al.*, 2002) de especial interés resulta el hecho de que el tratamiento con diversos fármacos que bloquean la acción de Ang II revierte los cambios hipertróficos observados en el corazón de los pacientes diabéticos con nefropatía (Suzuki, 1993). Estos medicamentos mejoran importantemente parámetros como la proteinuria, la acumulación de colágeno y los cambios hemodinámicos glomerulares en modelos animales. Muchos de estos efectos se han relacionado con la capacidad de Ang II de estimular a su vez otros compuestos, entre los que sobresale el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Kanwar, 2008; Wolf *et al.*, 1993).

Existen varios reportes en los que se ha demostrado la participación del SRAA en el desarrollo de la HR (Makino *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.* 2003; Yarger *et al.*, 1980). La Ang II es un mediador central en el daño renal debido a su capacidad de producir hipertensión capilar glomerular, daño al epitelio glomerular, al endotelio y a las células mesangiales. Tanto la Ang II como la aldosterona tienen varios efectos no hemodinámicos que son importantes en dicha patogénesis, incluyendo la activación de rutas asociadas a la inflamación, fibrosis, acumulación de matriz extracelular, producción de ROS nefrotóxicas (Siragy y Carey, 2010), estimulación de la proliferación celular y el remodelamiento del tejido mediante incremento de la síntesis de citocinas profibróticas tales como TGF- $\beta$ 1 (Huang y Preisig, 2000). La Ang II también incrementa la deposición de

colágeno III por inhibición de proteasas cuya función es degradar proteínas anormales en el tejido (Lakshmanan *et al.*, 2011).

El SRAA tiene como función principal la regulación homeostática de la presión arterial y la composición de electrolitos en los líquidos corporales (Braun-Menéndez *et al.*, 1946; Xu *et al.*, 2009). Este sistema ha sido estudiado extensamente debido a sus acciones fisiológicas y su participación en la fisiopatología de la hipertensión; una de las aportaciones recientes es el descubrimiento de que el SRAA también actúa a nivel local (Paul *et al.*, 2006; Miyazaki y Takai, 2006). El SRAA está integrado por la enzima renina (44 kDa), sintetizada, almacenada y secretada por las células granulares del aparato yuxtglomerular del riñón; esta enzima hidroliza la unión entre los residuos 10 y 11 del amino terminal del angiotensinógeno (62 kDa) generando Angiotensina I (Ang I), un decapeptido. La enzima convertidora de angiotensina (ECA), hidroliza dos aminoácidos de la Ang I, produciendo Ang II (Skeggs *et al.*, 1954).

Los efectos de la **Ang II** se producen por interacción con sus receptores **AT<sub>1</sub>** y/o **AT<sub>2</sub>**. Cuando interacciona con el receptor AT<sub>2</sub> produce diuresis, natriuresis, apoptosis y vasodilatación. Sin embargo, la Ang II produce sus efectos a través de la interacción con el receptor AT<sub>1</sub>, estimulando la reabsorción de Na<sup>+</sup>, liberación de la hormona antidiurética (ADH), vasoconstricción, proliferación celular, secreción de aldosterona y sed, estos efectos están relacionados con el control y mantenimiento de la presión arterial, la sobreactivación Ang II-AT<sub>1</sub> es un factor muy importante que participa en el desarrollo de la hipertensión arterial (Fig. 2) (Carey y Siragy, 2003; Faggiotto y Paoletti, 1999; Nguyen *et al.*, 2002; Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009).

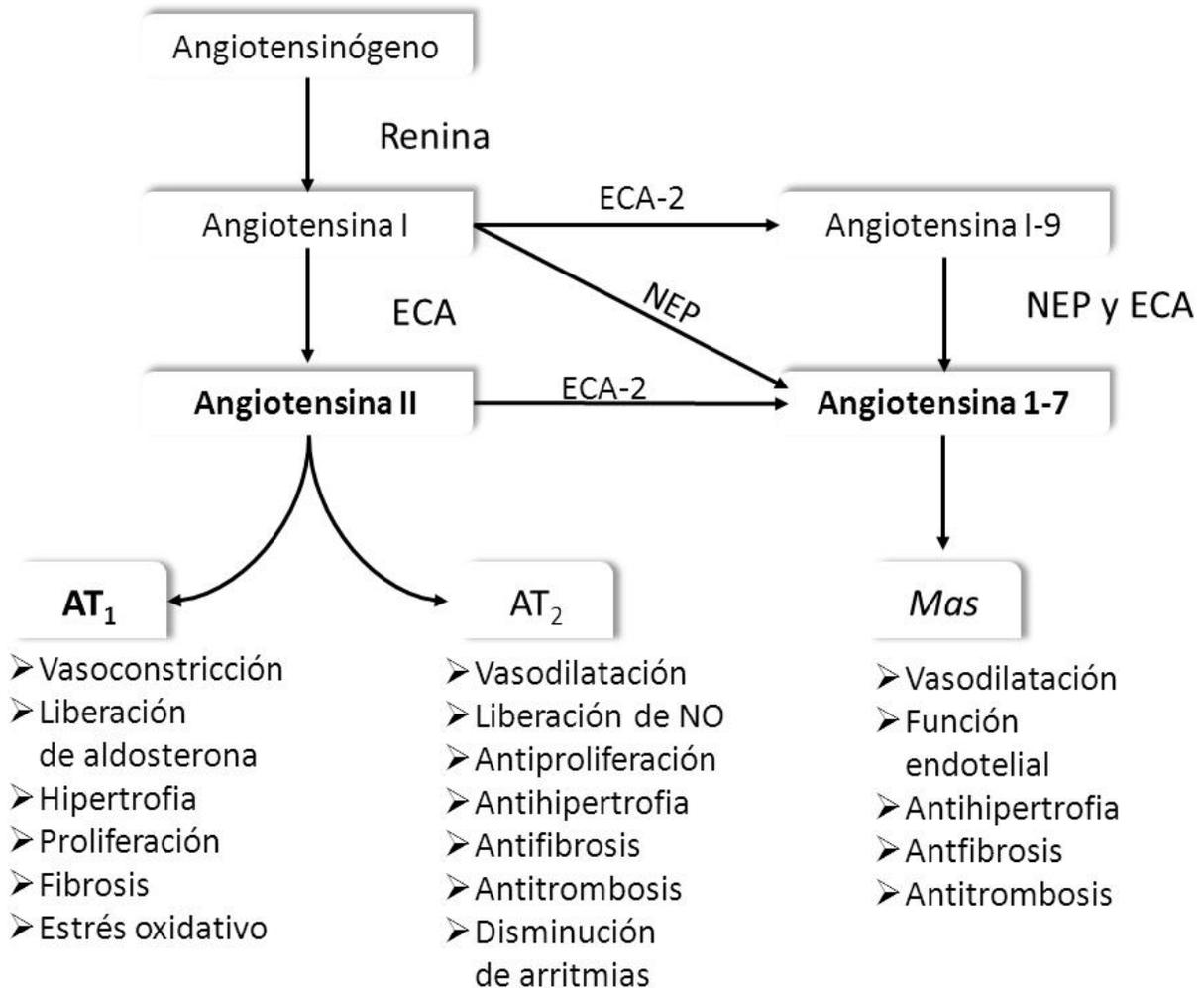


Fig. 2. Principales péptidos del sistema renina-angiotensina-aldosterona y los efectos mediados por la interacción con sus correspondientes receptores. ECA, Enzima Convertidora de Angiotensina; ECA-2, Enzima Convertidora de Angiotensina-2; AT<sub>1</sub>, Receptor tipo 1 de Angiotensina II; AT<sub>2</sub>, Receptor tipo 2 de Angiotensina II; NEP, Endopeptidasa Neutral; Mas, Receptor de Angiotensina-(1-7). Modificado de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

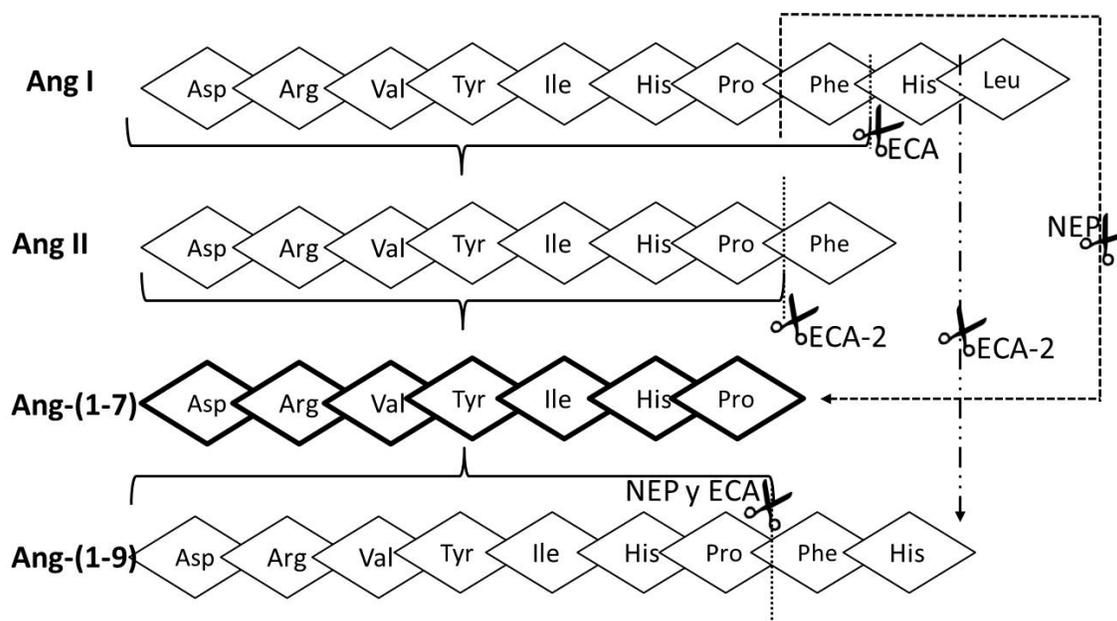
Recientemente se ha mostrado que el SRAA, además de formar Ang II, también forma otros compuestos vasoactivos, entre los cuales está la **Angiotensina III** (Ang III) heptapéptido sintetizado por aminopeptidasas que hidrolizan el residuo de arginina del extremo aminoterminal de Ang II. Se ha demostrado que la Ang III tiene efectos similares a los de la Ang II pero con menor potencia. La Ang II aumenta la presión sanguínea, la liberación de vasopresina y la sed; también estimula la liberación de aldosterona e induce natriuresis,

probablemente a través de su interacción con el receptor  $AT_2$ , cuando se encuentra bloqueado el receptor  $AT_1$ . Además, en células renales estimula la expresión de varios factores de crecimiento, mediadores proinflamatorios y proteínas de la matriz extracelular (ECM). La Ang III normalmente se une a los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$  (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008).

La **Angiotensina IV** (Ang IV) es generada a partir de Ang III por acción de la aminopeptidasa M. Este péptido biológicamente activo interactúa con el receptor  **$AT_4$**  y se cree que también interactúa con el receptor de insulina (**IRAP**) provocando vasodilatación, hipertrofia y activación de NF- $\kappa$ B, seguido del incremento de la expresión de PAI-1, de la Proteína Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1), interleucina-6 y del Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Varios estudios sugieren que la Ang IV funciona como un importante regulador en el aprendizaje, el metabolismo renal y el daño cardiovascular. La Ang IV regula el crecimiento de fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células del músculo liso vascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La **Angiotensina-(1-7)** [Ang-(1-7)] (Fig. 2) es un péptido formado por 7 aminoácidos, es sintetizado a partir de la Ang I (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008) por acción de la prolilendopeptidasa, la prolilcarboxipeptidasa y por la enzima convertidora de angiotensina-2 (ECA-2) (Donoghue *et al.*, 2000), homologa a la ECA, y también a partir de Ang II por acción de la ECA-2 (Fig. 3); se ha localizado en las membranas celulares de cardiomiocitos, en testículos y en el endotelio renal, incluso en donde se encuentra en concentraciones comparables a las de Ang II (Carey y Siragy, 2003; Santos *et al.*, 2008). Sus niveles en plasma incrementan marcadamente en respuesta a inhibidores de la ECA (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008). La Ang-(1-7) produce vasodilatación, natriuresis y diuresis; inhibe la angiogénesis y el crecimiento celular. Si bien la Ang-(1-7) puede interactuar con el receptor  $AT_1$  produciendo efectos opuestos a los de Ang II, se ha reportado que también tiene un receptor específico, el receptor **Mas** (37kDa), una proteína con siete dominios transmembranales que se acopla a proteínas G (Chappell *et al.*,

1998; Kostenis *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2003), el cual es estructuralmente diferente a los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008). La importancia de la Ang-(1-7) radica en que contrarresta las acciones cardiovasculares producidas por Ang II, sin intervenir en la unión de Ang II a los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, es decir, contrarresta sus acciones a través de la producción de NO, liberación de prostaglandinas vasodilatadoras y su acción sinérgica con bradicinina (BK) (Chappell *et al.*, 1998; Gwathmey *et al.*, 2010; Heitsch *et al.*, 2001). La Ang-(1-7) tiene efecto vasodilatador, por lo que este péptido podría ser un importante modulador del tono vascular (Carey y Siragy, 2003; Grobe *et al.*, 2006). Se ha reportado que la ausencia de Ang-(1-7) aumenta el estrés oxidativo y la inflamación así como la activación de MAPKs las cuales participan de manera importante en el desarrollo de HR (Lakshmanan *et al.*, 2012)



**Fig. 3. Biosíntesis de la Ang-(1-7).** La ECA corta entre los aminoácidos fenilalanina e histidina de Ang I formando al decapeptido Ang II, donde la ECA-2 corta a la fenilalanina formando Ang-(1-7). La NEP corta entre prolina y fenilalanina dando origen directamente a Ang-(1-7). La ECA-2 también puede cortar entre los aminoácidos histidina y leucina de Ang I formando Ang-(1-9), en la cual pueden cortar tanto la NEP como la ECA entre los aminoácidos prolina y fenilalanina formando Ang-(1-7) (Modificado de Peach, 1977).

## 2. ANTECEDENTES

En la ND se ha demostrado que los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> y los inhibidores de la ECA contribuyen a la protección del riñón (Kostenis *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2006) y también se ha postulado que una parte de sus efectos benéficos se deba a través de la activación de la Ang-(1-7) (Benter *et al.*, 2007; Kucharewicz *et al.*, 2002).

Remuzzi *et al.* (1993) demostraron que la administración de losartán disuelto en el agua de bebida (30-35 mg kg<sup>-1</sup>), a ratas macho Sprague-Dawley, de 4-6 semanas de desarrollo de DM producida por administración de STZ, previno el incremento de la tasa de filtración glomerular (TFG), así como de la proteinuria y el daño glomerular.

Parving *et al.* (2001) mostraron que el irbesartán reduce significativamente la albuminuria, provocando un cambio mínimo (1 y 3 mm Hg) en la presión sistólica, y concluyeron que su efecto renoprotector es independiente de la presión sanguínea sistémica.

Grobe *et al.* (2006) estudiaron los efectos de la infusión de Ang-(1-7) en ratas Sprague-Dawley en ratas hipertensas por Ang II, las cuales también presentaron hipertrofia en miocitos y fibrosis intersticial miocárdica por Ang II. Observaron que Ang-(1-7) atenúo significativamente la hipertrofia de cardíaca y la fibrosis intersticial, sin cambios en la presión sanguínea. Posteriormente al administrar D-Ala-Ang-(1-7) [antagonista de la Ang-(1-7)] se reiniciaba el daño, la hipertrofia de miocitos y la fibrosis intersticial.

Iwata *et al.* (2005) observaron que en fibroblastos cardíacos al administrar Ang-(1-7) en concentraciones nanomolares, se pueden contrarrestar los efectos hipertróficos de Ang II, reduciendo la síntesis de colágeno y de endotelina-1 e inhibiendo la expresión de mRNA de factores de crecimiento.

Brenner *et al.* (2001) realizaron un estudio en pacientes con DM (doble-ciego) y comprobaron que el losartán (50-100 mg cada 24 h durante 3.4 años) redujo la proteinuria 30% y aumentó la depuración de creatinina cerca de 18%.

### **3. HIPÓTESIS**

Si en un modelo de DM temprano la Ang II media el daño renal, entonces al antagonizar al receptor AT<sub>1</sub> o inhibir la formación de Ang II disminuirá o evitará el daño renal con la posible participación de Ang 1-7 a través de su receptor *Mas*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación de la Ang-(1-7), a través de su receptor (*Mas*) en la hipertrofia renal, en un modelo de diabetes mellitus temprano

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Reproducir el modelo de DM inducida por STZ en rata.

Estudiar el desarrollo de la HR.

Determinar los cambios en la expresión de los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y *Mas* en respuesta a la inducción de DM por administración de STZ.

Determinar los cambios en la expresión de los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y *Mas* en ratas diabéticas tratadas con captopril o losartán.

Determinar los cambios en la expresión de los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y *Mas* en las células renales expuestas a concentración alta de glucosa.

### **5. METODOLOGÍA**

#### **5.1 Material biológico**

Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron ratas Wistar macho, de 230-270 g de peso corporal, suministradas por el Bioterio de la FES Iztacala, UNAM. Todas las ratas se mantuvieron en condiciones similares de luz/oscuridad ((12 h/12 h) y con acceso de alimento y agua *ad libitum*.

Para los experimentos con células aisladas se empleó la Línea Celular del epitelio tubular proximal Renal de Cerdo (LLC-PK1) obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection).

## 5.2 Reactivos de uso general

Buffer de citrato pH 4.5: Solución de citrato de sodio 10mM y ácido cítrico 10mM en proporción 45:55, respectivamente, y el pH se ajustó a 4.5 con NaOH.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS) (10X): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aforando a 1 L.

Buffer Laemli (de carga) 10 X: 12.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.5, 2 mL de SDS al 50%, 10 mL de glicerol, 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 0.12 g de azul de bromofenol.

Paraformaldehído: En PBS a 60° C se calienta la cantidad que corresponda al 4% de formaldehído llevando el pH a 7 con NaOH.

Eosina SOLVESA.

Hematoxilina ROYAL Chemical.

Parafina marca Represa.

Etanol LACOR.

## 5.3 Reactivos especiales:

Estreptozotocina (S-0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U. S. A.).

Pentobarbital sódico (Barbital Holland RX).

Losartán Cozaar 50 mg Pfizer.

Captopril Sigma Life Science C4042-5G.

TRIZOL® Reagent (Invitrogen Catálogo No. 15596-018, Lote no. 13701).

Kit para cuantificación de creatinina Linear Chemical, Joaquim Cost.

Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio Rad.

Anticuerpo AT1 (N-10) IgG Policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo AT<sub>2</sub> (H-143) IgG Policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo Mas pAb anti-MAS1 Novus Biologicals.

Anticuerpo  $\beta$ -actina(C-11) IgG Policlonal de cabra.

Anticuerpo anti-rabbit IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo donkey anti-goat IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology.

PD123,319 di(trifluoroacetate) sal hydrate Sigma.

Antagonista D-Ala-Ang-(1-7) Bachem Americas Inc.

#### **5.4 Equipo de laboratorio**

Glucómetro ACCU-CHEK Active, Roche

Agitador magnético Corning PC-353.

Micropipetas Gilson (10, 20, 100, 200 y 1000 µL).

Balanza digital BH EXCELL.

Balanza analítica Mettler H10 Hoffman-Pinther.

Ultracongelador REVCO Kendro Laboratory Products Modelo ULT1386-5-A36.

Centrífuga Clínica Modelo J-12 SOL-BAT Aparatos científicos.

Microcentrífuga Eppendorf 5418.

Espectrómetro Genesys 20.

Espectrómetro Ultrospec 3300pro UV/Visible Spectrophotometer Amersham Biosciences.

Microtomo Spencer 820.

Histoquinete LEYCA 2000.

Estufa bacteriológica Selecta.

Baño termostatzado para histología AISI 304.

Lector ELISA Thermo Labsystems Multiskan Ascent.

Densitómetro Sistema de documentación de geles BioSens, Bio Top Modelo SC 645.

Cámara para cultivo celular De Vecchi Ingenieros S.A. de C.V.

Incubadora de células Thermo Electron Corporation, Forma Senes II Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator HEPA Class 100.

Homogenizador IKA® T10 basic Ultra-Turrax.

Agitador Super-Mixer 1290 Lab-Line Instruments, Inc.

Sistema semi-seco de transferencia Trans-blot SD BioRad.

Cámaras para electroforesis Mini PROTEAN® Bio Rad.

Membranas de PVDF Amersham Hybond™-PGE Healthcare.

Fuente de poder Power Pac 200 Bio Rad.

## 5.5 Reproducción del modelo de diabetes mellitus

Los diversos modelos experimentales permiten el estudio de los eventos relacionados con la DM, uno de los más utilizados por su reproductibilidad es el que se obtiene por administración inyectada de estreptozotocina (STZ). La STZ se aísla del hongo *Streptomyces acromogenes* y se sabe que destruye de manera selectiva las células  $\beta$  del páncreas. La dosis de STZ necesaria para inducir DM varía entre 40-65 mg kg<sup>-1</sup> i.p. en dosis única (en rata). Su vida media en pH 4.5 es de 10-15 min y su excreción es renal.

La STZ entra a la célula  $\beta$  del páncreas a través del transportador de glucosa-2 (GLUT-2) y produce alquilación del Ácido Desoxirribonucleico (DNA) y del Trifosfato de Adenosina (ATP) (Szkudelski, 2000).

Para reproducir el modelo de DM, se utilizaron dos grupos de ratas (n=6). Al grupo 1 (control) se le administró el buffer de citrato pH 4.5 y al grupo 2 (diabéticas) STZ. Antes de administrar STZ o del buffer de citratos se midió la glucosa sanguínea (con ayuno de 12 h) mediante punción de la vena caudal, se obtuvo una gota de sangre que se colocó en la tira reactiva y ésta a su vez en el glucómetro, enseguida se administró, vía i.p. 65 mg kg<sup>-1</sup> de STZ (Szkudelski, 2000), preparada en buffer de citratos pH 4.5. La STZ se preparó al momento de su administración. Transcurridas 48 h de la administración, se midió nuevamente la glucemia; si los niveles de glucemia estaban por arriba de 260 mg dL<sup>-1</sup> (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2002) se consideró el día 1 de DM. Se pesó a las ratas en una balanza granataria (Dial-O-Gram 1600) cada día para observar la modificación que provoca la DM. El quinto día se colocó a cada rata en una jaula metabólica, se les dejó por 48 h dentro de ellas; las primeras 24 h para que se adaptaran y las siguientes 24 h para coleccionar la orina y medir el agua y alimento ingeridos en 24 h. La orina se utilizó para cuantificar proteinuria y creatinina. El día siete, se determinó la glucemia, se pesaron y se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg kg<sup>-1</sup>) para obtener las

muestras de sangre y los riñones, en seguida las ratas fueron sacrificadas por sobredosis con pentobarbital ( $65 \text{ mg Kg}^{-1}$ ).

## **5.6 Tratamiento con losartán o captopril**

Una vez caracterizado el modelo experimental de DM en ratas (a través de signos como: polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso) y la HR tomando como indicador el peso renal y el área del túbulo proximal se formaron nuevos grupos experimentales. Se formaron al azar 4 grupos de 6 ratas cada uno: ratas control (C), ratas diabéticas (D), ratas diabéticas tratadas con losartán (DL) y ratas diabéticas tratadas con captopril (DC). El tratamiento con losartán o captopril fue administrado a las 48 de la administración de STZ. La dosis administrada de losartán o de captopril fue  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , los cuales fueron disueltos en el agua de bebida diariamente hasta el día de extracción de los riñones.

## **5.7 Estudio de la hipertrofia renal (HR)**

Para estudiar la HR se tomaron en cuenta tres parámetros: a) El peso fresco de los riñones, b) El área del túbulo proximal, y c) El coeficiente proteínas/DNA. Las ratas anestesiadas se colocaron en la tabla de disección y con ayuda de pinzas y tijeras quirúrgicas se les hizo una incisión en la región abdominal para extraer los riñones que fueron puestos inmediatamente en PBS frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Ambos riñones fueron limpiados de tejido conectivo, se pesaron en una balanza analítica Mettler H10 y posteriormente se seccionaron longitudinalmente. Una de las mitades fue fijada en paraformaldehído al 4% para su análisis histológico. Con la mitad restante y el otro riñón se separaron la corteza renal y la médula renal y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **5.7.1 Técnica histológica**

Los riñones fueron fijados en paraformaldehído al 4% y posteriormente se colocaron en las rejillas de lavado; se secaron a temperatura ambiente y se deshidrataron en el tren de alcoholes, posteriormente se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes a  $5 \mu\text{m}$ ; se montaron los cortes en los portaobjetos y se realizó la tinción con Eosina-Hematoxilina para medir el área de las células del túbulo proximal (Apéndice 1).

### **5.7.2 Aislamiento de DNA por el método de TRIZOL® Reagent.**

Se pesaron 100 mg de corteza renal y se homogenizó con 1 mL de TRIZOL® Reagent, posteriormente se incubó a temperatura ambiente 5 min, se agregó 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s, después se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12000 x g por 15 min a 4°C. Se removió la fase acuosa y se precipitó el DNA con 0.3 mL de etanol (100%), se mezcló por inversión, se incubó 2-3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla (DNA) tres veces durante 30 min con citrato de sodio 0.1 M en etanol (10%), agitando periódicamente; entre cada lavado se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4°C. Después de centrifugar por última vez, se resuspendió la pastilla en 1.5 mL de etanol (75%) durante 15 min, mezclando periódicamente. Se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4°C y se removió el sobrenadante. Se agregaron 400 µL de NaOH 8 mM y se resuspendió de nuevo. Se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4°C y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Genesys 20.

## **5.8 Estudio de la función renal**

Se colocaron 3 mL de sangre en tubos Falcon de 5 mL con citrato de sodio (3.2%) en proporción 1:10 para evitar su coagulación y se centrifugó durante 5 min a 3500 rpm. El plasma se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL que se congelaron a -80 °C para posteriormente cuantificar la creatinina y calcular la depuración de creatinina.

### **5.8.1 Cuantificación de creatinina**

Para cuantificar la creatinina, las muestras de orina y de plasma se conservaron agregando a cada muestra 0.04 g de fluoruro-timol y conservándolas a 4°C para el ensayo. Las muestras de orina de las ratas control fueron diluidas 1:10 y las muestras de las ratas diabéticas no se diluyeron. Se utilizó el método cinético colorimétrico de tiempo fijo usando un estándar de 2 mg de creatinina.

### **5.8.2 Cuantificación de proteínas en orina.**

La cuantificación de proteínas en orina se determinó con el método modificado de Bradford (Bradford, 1976), se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de orina y se adicionaron 155  $\mu\text{L}$  de buffer PBS. A la curva de calibración y a las muestras se les agregaron 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, se mezcló y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector para ELISA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent). Se realizó la curva de calibración (0 a 10  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de albúmina) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de la muestra por regresión lineal (Apéndice 2).

## **5.9 Análisis por inmunoblot (Western blot) de la expresión de receptores $\text{AT}_1$ y $\text{AT}_2$ .**

### **5.9.1 Homogenización de médula**

Se pesaron 100 mg de médula renal y se colocaron en tubos de ensaye con 1 mL de solución Tris HCl (pH 7.4) con una mezcla de inhibidores de proteasas (Pastillas Mini complete, Roche) a 4°C. Posteriormente se homogenizó con un homogenizador (IKA® T10 basic Ultra-Turrax) a 4°C con tres pulsos a 10 000 rpm (10 s cada pulso).

El homogenado se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron en la microcentrifuga Eppendorf 5418 durante 10 min a 10 000 rpm y a 4°C. Del sobrenadante se hicieron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ , para la cuantificación de proteínas y la inmunodetección de las proteínas de interés.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford. Las alícuotas de los homogenados no se diluyeron (Apéndice 2).

### **5.9.2 Homogenización de corteza**

Se pesaron 100 mg de corteza renal y se colocaron en tubos de ensaye con 1mL de solución amortiguadora enfriada en hielo (KCl 0.08%,  $\text{MgCl}_2$  0.02%, HEPES 0.3%, Tween 20 0.06% y EDTA 0.05%) con inhibidores de proteasas

(Pastillas Mini complete). Se homogenizaron a 4 °C con tres pulsos a 10 000 rpm (10 seg cada pulso). El homogenado se incubó en hielo por 15 min, se agitó y se centrifugó a 3 000 x g 5 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se colocó en el buffer de lavado (KCl 0.08%, MgCl<sub>2</sub> 0.02%, HEPES 0.3% y EDTA 0.005%) e inhibidores de proteasas, y se incubó en hielo durante 30 min agitando cada 10 min. Posteriormente se centrifugó a 3 000 x g 5 min a 4° C. Se desechó el sobrenadante y finalmente se centrifugó con Buffer de extracción de membranas (NaCl 0.08%, Tris HCl 1M pH 8.0; 0.6%, Tween 1.3%, desoxicolato de sodio 0.6% y SDS 0.2%).

Con el sobrenadante se hicieron alícuotas de 200 µL y se utilizaron para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (Apéndice 3).

### **5.9.3 Homogenización de los cultivos celulares**

Se realizaron experimentos en las células LLC-PK1 para conocer las alteraciones causadas por la exposición a elevada concentración de glucosa, así como para determinar el efecto de los antagonistas de receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y Mas ya que las células LLC-PK1 tienen sistemas de transporte glucosa similares a los del túbulo proximal y se usan para el estudio de la fisiología renal (Handler *et al.*, 1980). Estas células permiten un control más preciso del ambiente y brindan mayor homogeneidad en los resultados; y también porque se usan cantidades menores de los antagonistas respecto al animal íntegro.

Las células LLC-PK1 fueron mantenidas en nitrógeno líquido y se descongelaron ( $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>), y colocadas en una caja de petri con medio de cultivo Dulbecco 199 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% + mezcla de antibióticos (estreptomina y penicilina y un antimicótico), y se incubaron a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Se hicieron dos cambios de medio de cultivo y cuando las células llegaron a confluencia se les retiró el medio de cultivo, se les agregó 1 mL de tripsina al 0.2% y se desprendieron cuidadosamente de la caja, enseguida se tomaron alícuotas de 0.25 mL y se colocaron en nuevas cajas de petri con medio de cultivo enriquecido especial para ésta línea celular (DMEM/F-12 [Gibco™, Invitrogen corporation]), también

suplementado con SBF al 10% y la mezcla de antibióticos. Una vez que se tuvieron suficientes cajas con células por expansión del cultivo, se pasaron  $1 \times 10^5$  células a cajas de cultivo de 2.5 cm de diámetro con 2.5 mL de medio de cultivo y una vez que llegaron a confluencia se les cambió el medio con sólo SBF al 0.5% para ponerlas en quiescencia e iniciar los experimentos: se incuban las células con medio DMEM/F-12 + 0.5% de SBF + antibiótico y glucosa normal (GN) (5.5 mM) o glucosa alta (GA) (25 mM) y GN o GA con el antagonista D-Ala Ang-(1-7) a  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$  M, por 2, 4 y 6 h, transcurrido este tiempo se llevaron al laboratorio para cuantificar proteínas y hacer los inmunoblots. También se incubaron las células con GN+ losartán  $1 \times 10^{-6}$  M y captopril  $1 \times 10^{-6}$  M y las células con GA+ losartán  $1 \times 10^{-6}$  M y captopril  $1 \times 10^{-6}$  M a los tiempos mencionados.

Transcurridos los tiempos de incubación se retiraron las cajas de cultivo con las células LLC-PK1 de la incubadora, se quitó el medio de cultivo y se lavaron las células con 0.5 mL de PBS a 4 °C, pH 7.4. Se añadió 0.3 mL de buffer RIPA (pH 7.4) con inhibidores de proteasas y orto-vanadato de sodio 1 mM, y con una espátula de plástico, se desprendieron del fondo de la caja. Las células fueron homogenizadas pasándolas 15-25 veces a través de la aguja número 22 G X 32 mm de una jeringa de 3 mL. Se hicieron alícuotas de 100  $\mu$ L y se guardaron a -80 °C.

Los homogenados se centrifugaron a 8 000 rpm por 5 min a 4°C; se hicieron diluciones 1:50 para cuantificar proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) (Apéndice 3) y determinar la expresión de receptores por inmunoblot.

### **5.10. Inmunoblots de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>.**

Para las pruebas moleculares, a las alícuotas de 200  $\mu$ L (tejido) y de 100  $\mu$ L (células) se adicionó 10  $\mu$ L de buffer Laemli (de carga) con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%, se agitaron en un agitador (Super-Mixer 1290 Lab-Line Instruments, Inc.), se hirvieron por 10 min en una placa térmica para desnaturalizar las proteínas y se almacenaron a -80° hasta su uso.

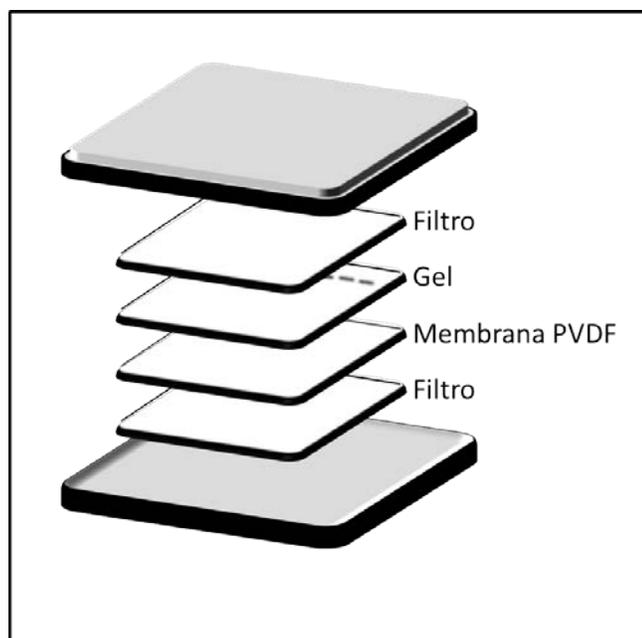
### **5.10.1 Electroforesis**

Las proteínas se separaron por electroforesis con geles de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS). Se preparó el gel de poliacrilamida colocando los reactivos en el orden de la tabla (apéndice 4) en un tubo Falcon, se mezcló con agitador y se colocó en medio de los cristales MiniPROTEAN® de 1.0 mm con ayuda de una pipeta de 10 mL, se alineó con isopropanol y ya gelificado se enjuagó tres veces con agua destilada y se secó con papel filtro. Se preparó el gel de concentración agregando los reactivos en otro tubo Falcon en el orden de la tabla (apéndice 4), se mezcló con el agitador y se colocó sobre el gel de electroforesis con una pipeta de 5 mL, se colocó el peine evitando formar burbujas hasta que gelificó. Se retiró el peine, se enjuagó nuevamente y se puso en la cámara de electroforesis (BioRad). Se llenó la cámara con buffer de corrida 1X y se llenaron los pozos: el primero con 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular y el resto con las muestras de los tubos hervidos anteriormente; colocando los microlitros requeridos para adicionar 50  $\mu$ g de proteína. Así, se separaron a 88 voltios durante 135 min con la fuente de poder Power Pac™ HC BioRad.

Una vez terminada la electroforesis, se retiró la parte correspondiente al gel de concentración y con el resto se hizo la transferencia.

### **5.10.2 Transferencia a membranas.**

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas (Amersham Hybond™-P GE Healthcare) utilizando un sistema semiseco (Trans-blot SD BioRad) durante 60 min a 18 voltios. Para este paso se prehumedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto por 5 min y posteriormente se sumergió en buffer de transferencia junto con los papeles filtro; todos estos procedimientos se realizaron con guantes y pinzas. Las membranas de PVDF, el gel y los papeles se dispusieron en forma de sándwich en la cámara de transferencia (Fig. 4).



**Fig. 4. Disposición de los filtros, la membrana PVDF y el gel de electroforesis en la cámara de transferencia.**

Los geles fueron desechados y las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBST durante 2 h y posteriormente se incubaron en el anticuerpo primario en dilución 1:400 durante 15 h, después las membranas se enjuagaron con TBST tres veces, cada vez 10 min y fueron incubadas con el respectivo anticuerpo secundario en dilución 1:1000 durante 2 h; nuevamente se enjuagaron con TBST tres veces, cada vez 10 min (las incubaciones y los enjuagues se realizaron con el agitador Labnet Orbit LS). Las membranas se llevaron a un cuarto oscuro donde se tomaron cuidadosamente con pinzas y se colocaron en un hypercassette, protegidas por un acetato; se les agregó luminol, y se colocó una película encima de cada una. Se cerró el cassette durante 5 min. Transcurrido el tiempo se sacó la película y se colocó en una solución reveladora, durante 3 min, se enjuagó en agua desionizada y se colocó en solución fijadora durante 1 min; nuevamente se enjuagó y se dejó secar. Se comparó con el marcador de peso molecular para identificar a la proteína de interés y se llevó a analizar con un densitómetro de geles BioSens SC 645.

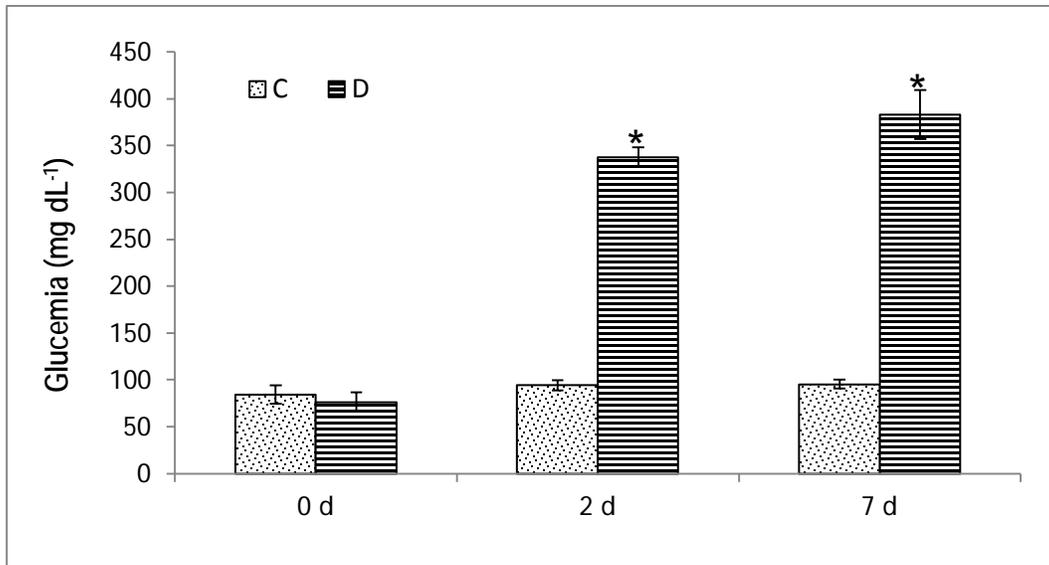
### **5.11 Análisis estadístico**

Se calculó la media  $\pm$  el Error Estándar de la Media (EEM). Para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) complementada con pruebas de Tukey, considerando una diferencia significativa si  $p < 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**

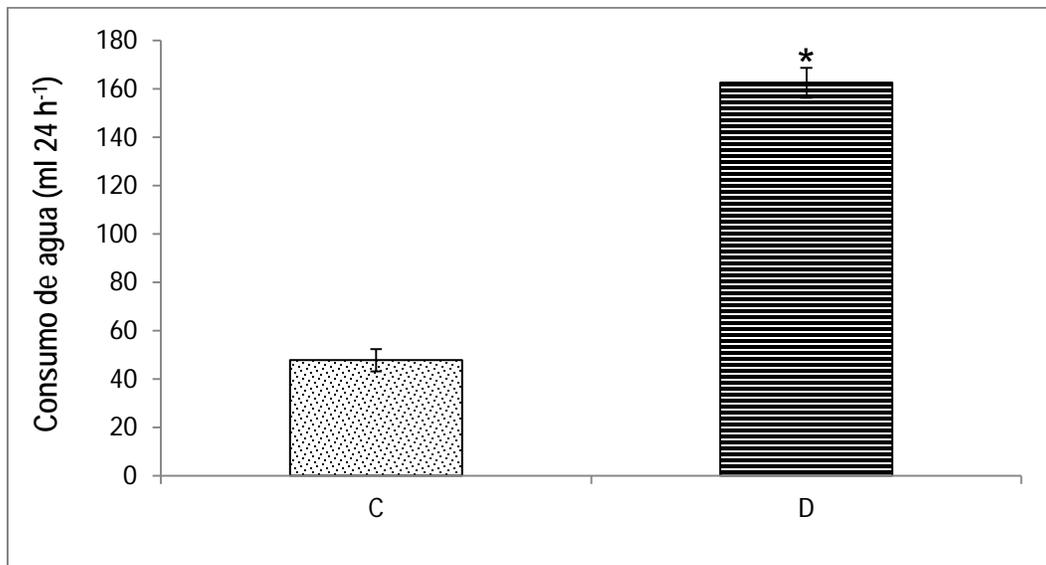
### **6.1 Reproducción del modelo de diabetes mellitus (DM)**

Se cuantificó la glucemia de las ratas a diferentes tiempos, observando que antes de administrar STZ no había diferencia significativa ( $80.4 \pm 10.02 \text{ mg dL}^{-1}$ ). La glucemia aumento en el grupo D a las 48 h ( $338 \pm 10.3 \text{ mg dL}^{-1}$ ), respecto al grupo C ( $94.5 \pm 5.5 \text{ mg dL}^{-1}$ ), ese aumento se mantuvo hasta el séptimo día en que se extrajeron los riñones (Fig. 5).

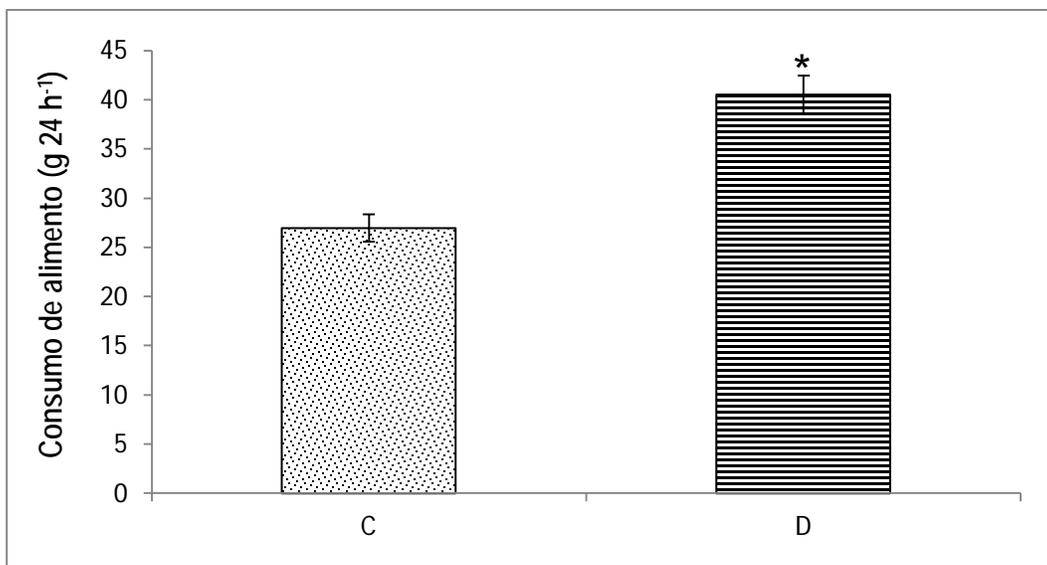


**Fig. 5. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre la glucosa sanguínea.** Glucemia registrada antes de administrar STZ (0 d), glucemia a las 48 h post STZ (2 d) y glucemia registrada el séptimo día (7 d). C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=6$ .

En cuanto a la ingesta de agua y alimento en 24 h para el grupo D fue  $162.7 \pm 6.2 \text{ mL}$  y  $40.5 \pm 2 \text{ g}$ , respectivamente; ambos parámetros fueron mayores significativamente en relación al grupo C ( $47.8 \pm 4.6 \text{ mL}$  y  $27 \pm 1.4 \text{ g}$ ) (Figs. 6 y 7).

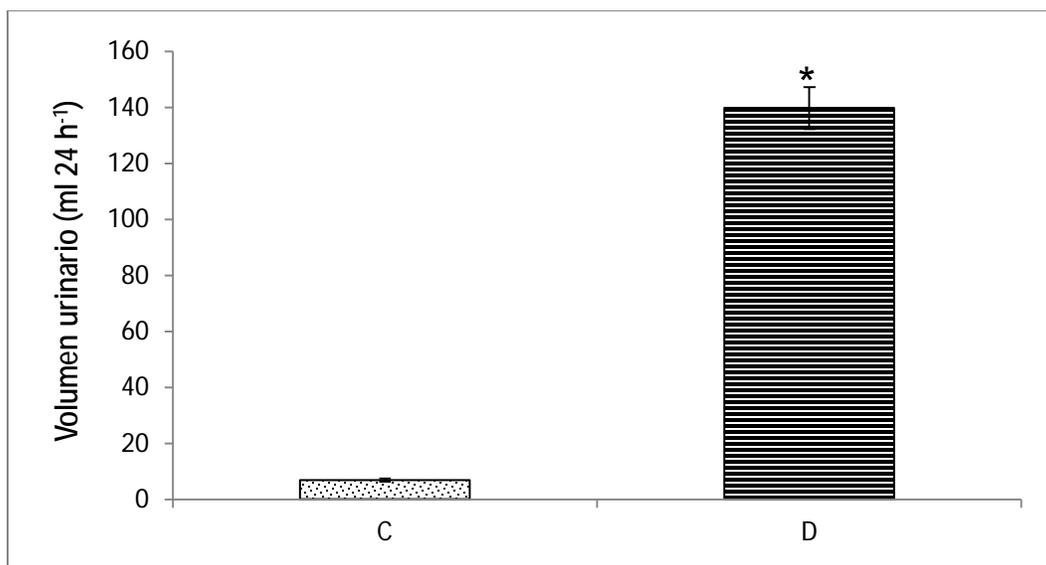


**Fig. 6. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre el consumo de agua durante 24 h.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.001$ ;  $n=6$ .



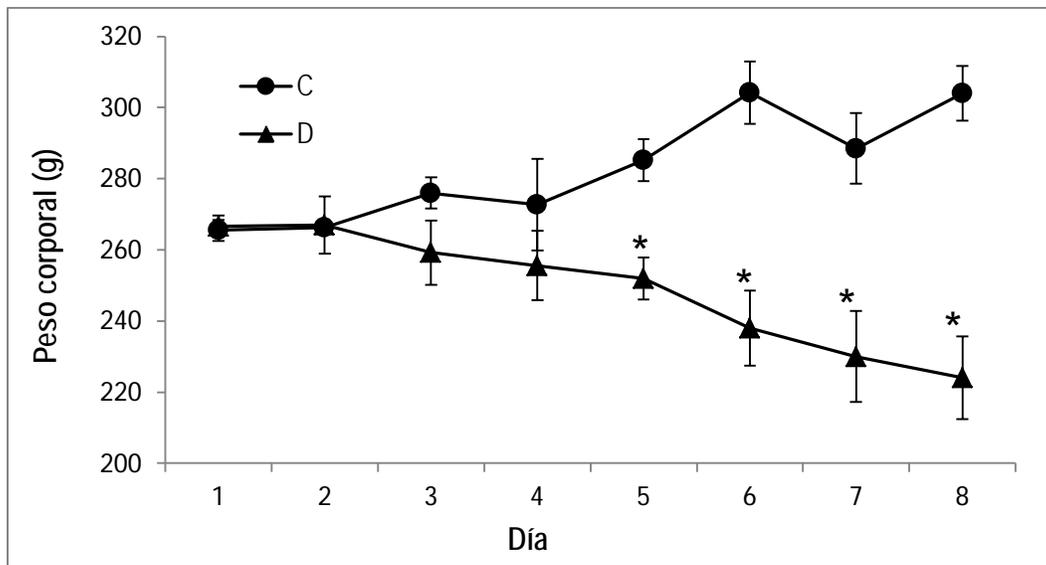
**Fig. 7. Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el consumo de alimento durante 24 h.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \*P< 0.001; n=4.

El volumen de orina en 24 h aumentó de manera significativa en el grupo D 140 ± 7.5 mL respecto al grupo C (6.8 ± 0.5 mL) (Fig. 8).



**Fig. 8. Efecto de la STZ (65 mg kg<sup>-1</sup>) sobre el volumen urinario en 24 h.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \*P< 0.001; n=4.

Las ratas se pesaron diariamente y al analizar los datos se observó que el grupo D disminuyó de peso conforme avanzó el experimento y el grupo C aumentó de peso, siendo el peso final de 248 ± 5.0 g para las ratas diabéticas y de 304 ± 7.6 g para las ratas control (Fig. 9).

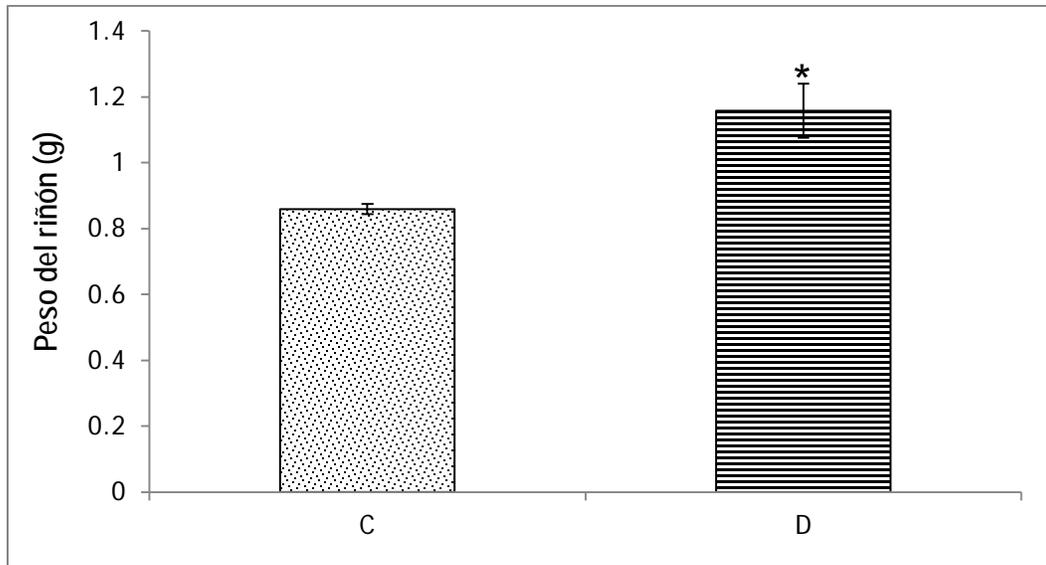


**Fig. 9. Curso temporal del peso de las ratas control y diabéticas, durante 7 d.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=6$ .

Estos resultados muestran que la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) produce un cuadro de DM ya que aumentó la glucemia y las ratas presentaron polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida del peso corporal, signos clínicos de la DM.

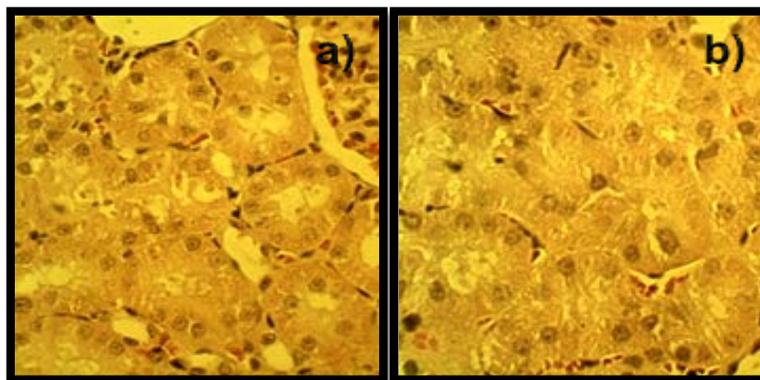
## 6.2. Estudio de la HR

Una vez que se caracterizó el modelo experimental de DM en las ratas, se empleó para estudiar las alteraciones renales, para lo cual se evaluaron otros parámetros que dieran información acerca de la hipertrofia, como son: el peso renal y el área de las células del túbulo proximal y se observó que el peso de los riñones de las ratas diabéticas fue mayor significativamente en relación a los riñones de las ratas control ( $1.15 \pm 0.08$  y  $0.85 \pm 0.01$  g) (Fig. 10).

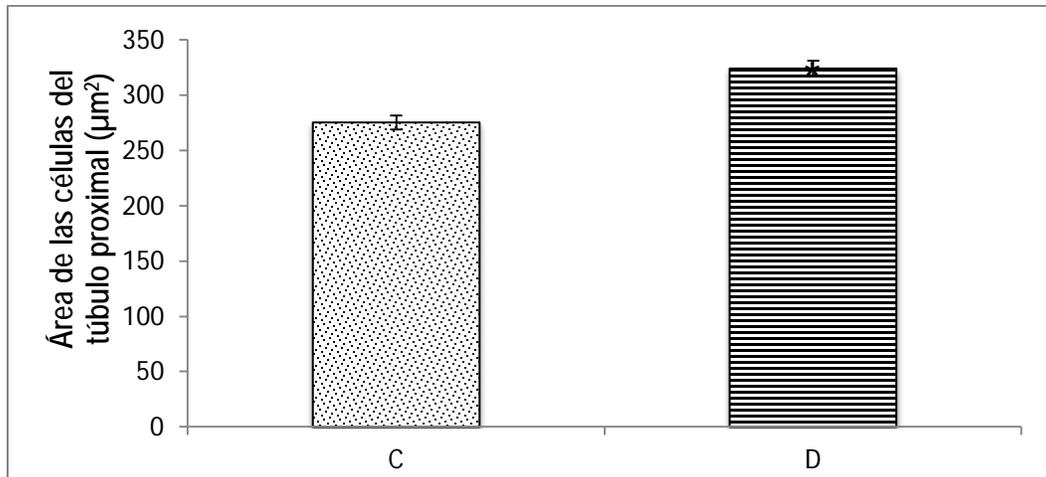


**Fig. 10. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre el peso del riñón en el séptimo día de DM.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.012$ ;  $n=4$ .

Se midió el área de las células del túbulo proximal observándose un aumento en el área celular del grupo D ( $116.0 \pm 8.1 \mu\text{m}^2$ ) con respecto a las ratas control ( $88.5 \pm 11.3 \mu\text{m}^2$ ) (Figs. 11 y 12).



**Fig. 11. Cortes histológicos teñidos con la técnica E-H de la corteza renal a los 7 días de la administración de STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ).** a) Rata control; b) Rata a la que se le administró STZ.

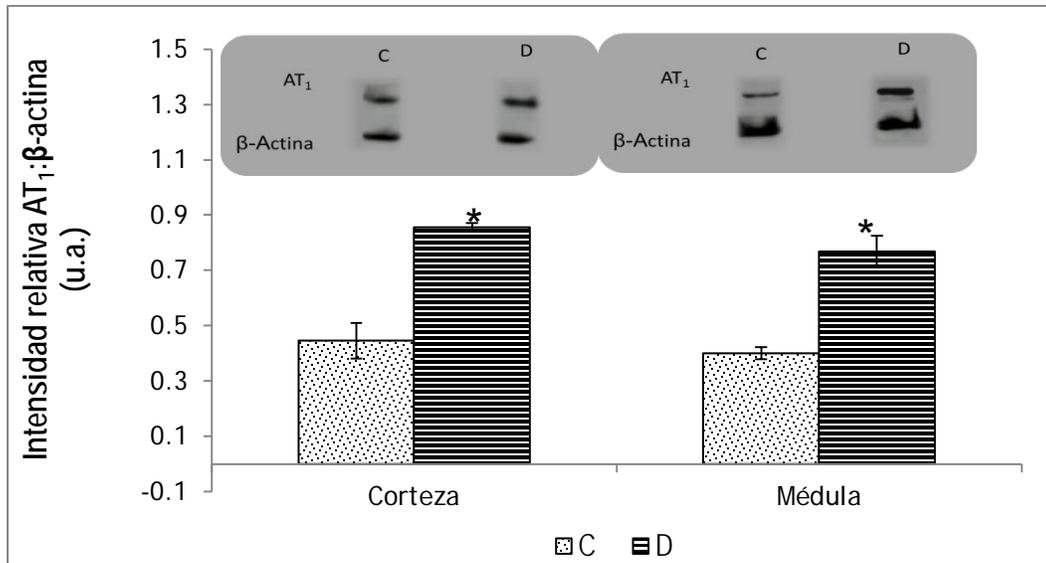


**Fig. 12. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre el área de las células del túbulo proximal.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=6$ .

### 6.3 Determinación de la presencia de los receptores $AT_1$ y $AT_2$ en el riñón de ratas control y diabéticas

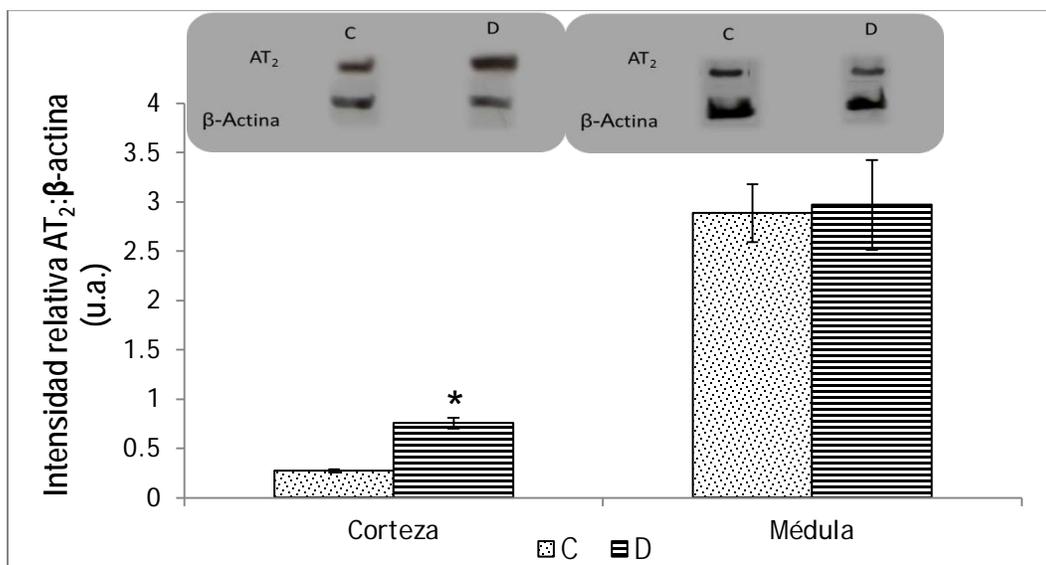
Para detectar la expresión proteica de los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$  en corteza y médula renal, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) seguida de transferencia e inmuno detección, empleando anticuerpos específicos contra los receptores y una reacción quimioluminiscente.

Se observó que el receptor  $AT_1$  fue mayor en la corteza y en la médula renal del grupo D ( $0.85 \pm 0.01$  u.a. (unidades arbitrarias) en la corteza y  $0.76 \pm 0.05$  u.a., en la médula) que en el grupo C ( $0.54 \pm 0.10$  u.a. y  $0.32 \pm 0.1$  u.a., respectivamente) (Fig. 13).



**Fig. 13. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre la expresión del receptor  $\text{AT}_1$  en corteza y médula renal.** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=3$ .

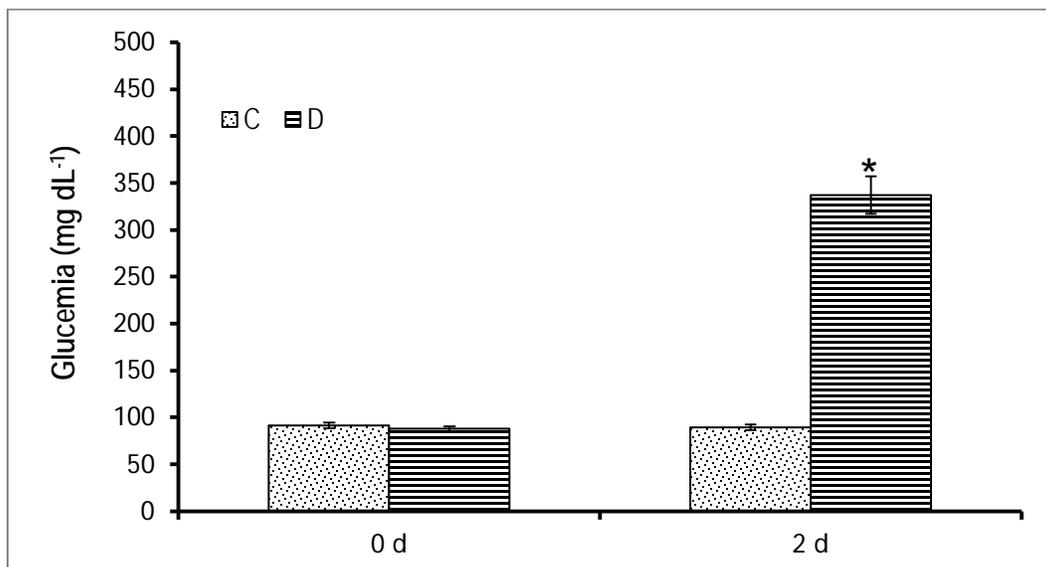
La expresión del receptor  $\text{AT}_2$  en la corteza renal fue de  $0.75 \pm 0.05$  u.a. en el grupo D y en el grupo C fue de  $0.27 \pm 0.01$  u.a. En la médula renal se determinó una expresión de  $2.96 \pm 0.45$  u.a. en el grupo D y  $2.88 \pm 0.29$  u.a. en las ratas C (Fig. 14).



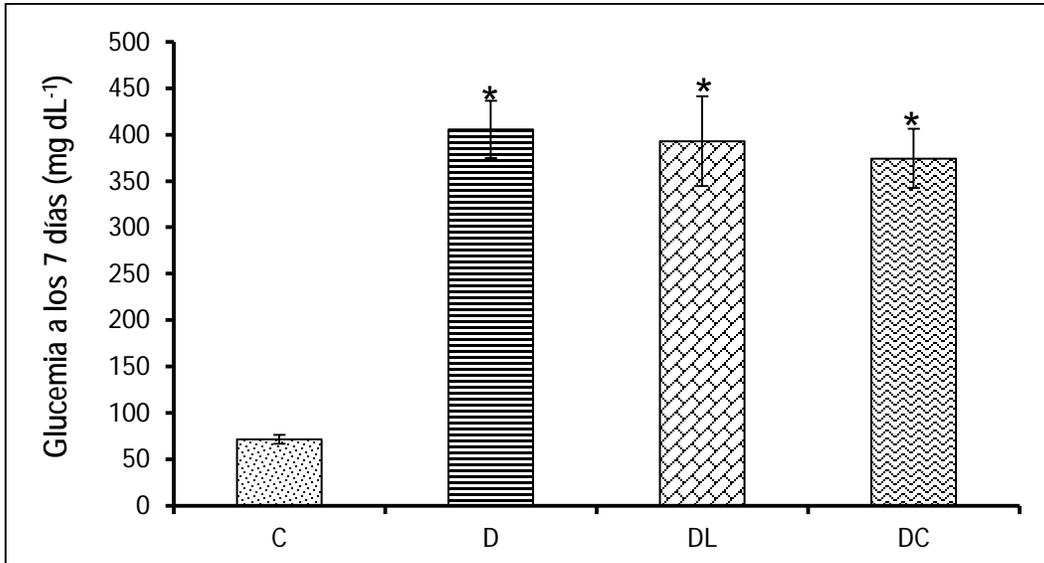
**Fig. 14. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre la expresión del receptor  $\text{AT}_2$ .** C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=6$ .

#### 6.4 Efecto de los tratamientos con losartán o captopril en las ratas diabéticas.

Basándonos en los resultados anteriores, se continuó con los experimentos para modificar al SRAA antagonizando al receptor  $AT_1$  con losartán o inhibiendo a la ECA con captopril. A estos grupos de ratas se les midieron los mismos parámetros como a los grupos anteriores (C y D). Se midió la glucemia de ratas C y D antes de la administración de STZ observándose que en ambos grupos fue similar la media conjunta fue de  $89.3 \pm 3.0 \text{ mg dL}^{-1}$ . A las 48 h post la glucemia aumentó significativamente  $337 \pm 19.8 \text{ mg dL}^{-1}$  (Fig.15). El día 7 post inducción de DM la glucemia para el grupo D fue  $405.8 \pm 30.8 \text{ mg dL}^{-1}$ , para el grupo DL fue  $393 \pm 48.3 \text{ mg dL}^{-1}$  y para el DC fue  $374.3 \pm 31.8 \text{ mg dL}^{-1}$  (Fig.16).

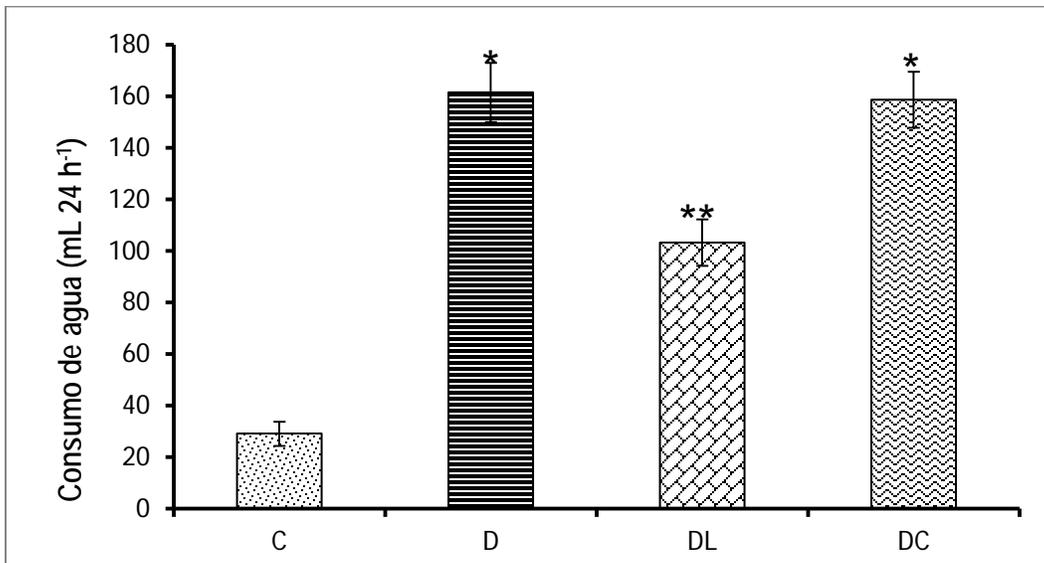


**Fig. 15. Efecto de la STZ ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre los niveles de glucosa sanguínea.** Glucemia registrada antes de administrar STZ (0 d), glucemia a las 48 h post STZ (2 d) C: Ratas control. D: Ratas a las que se les administró STZ. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ ;  $n=6$ .



**Fig. 16. Efecto de losartán o captopril sobre la hiperglucemia producida por STZ a los 7 días de su administración.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán 10 mg kg<sup>-1</sup> y DC=Diabéticas tratadas con captopril 10 mg kg<sup>-1</sup>. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \**p*<0.05 vs ratas control. n=6.

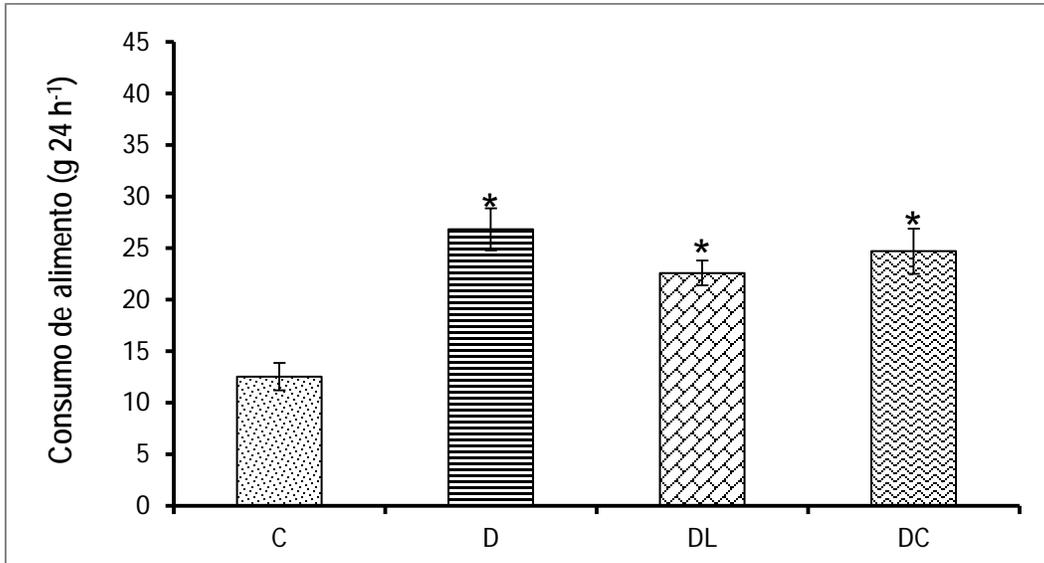
Al medir el consumo de agua se observó que las ratas D consumieron mayor volumen en relación al grupo C (161.5 ± 11.5 mL y 29 ± 4.7 mL, respectivamente) (Fig. 17). En el grupo DL se observó disminución significativa (103.1 ± 8.9 mL) respecto al grupo D y en el grupo DC no se observó disminución significativa del consumo de agua (158.6 ± 10.8 mL) (Fig. 17).



**Fig. 17. Efecto de losartán o captopril sobre el consumo de agua en ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y

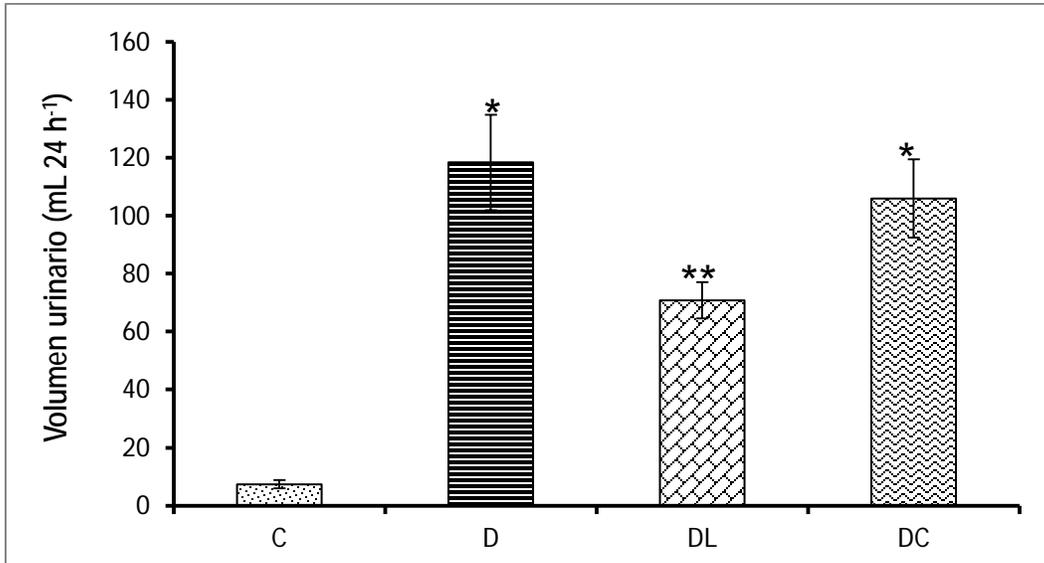
DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  
\* $p < 0.05$  vs ratas control; \*\* $p < 0.05$  vs ratas diabéticas.

En cuanto al consumo de alimento, se observó que las ratas D consumieron más alimento que las ratas C ( $27.1 \pm 2$  g y  $12.5 \pm 1.3$  g, respectivamente). Los tratamientos con losartán y/o captopril no modificaron significativamente el consumo de alimento ( $22.6 \pm 1.2$  g y  $24.7 \pm 2.1$  g, respectivamente) (Fig. 18).



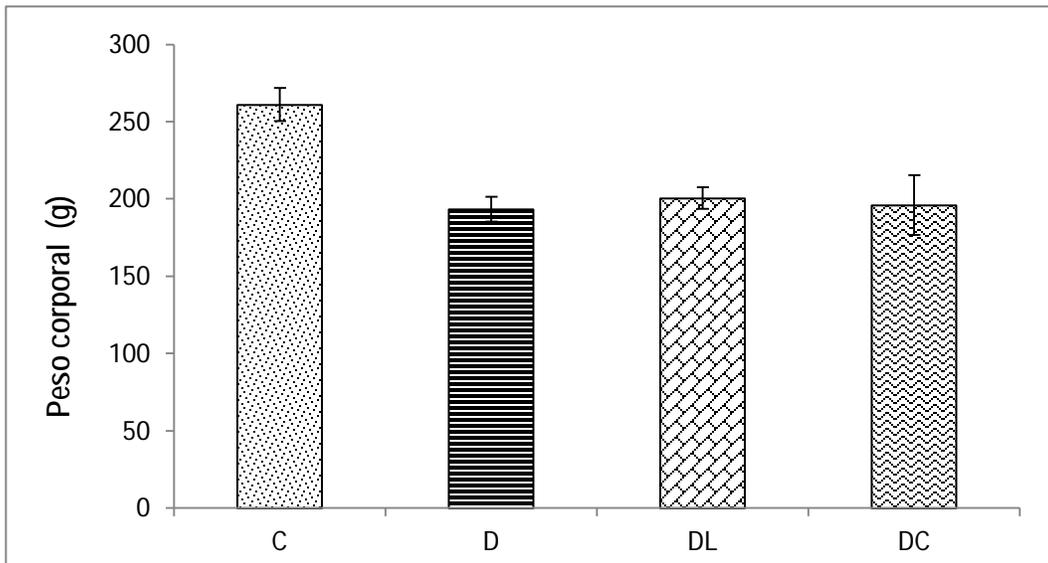
**Fig. 18. Efecto de losartán o captopril sobre el consumo de alimento de ratas diabéticas en 24 h.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. n=6.

El volumen urinario del grupo D fue mayor que el del grupo C ( $118.8 \pm 16.4$  mL y  $7.4 \pm 1.3$  mL, respectivamente) similar a lo observado en la serie experimental anterior. El tratamiento con captopril no mostró cambios significativos respecto al grupo D; sin embargo, las ratas tratadas con losartán disminuyeron significativamente el volumen urinario ( $70.9 \pm 6.3$  mL) (Fig. 19).



**Fig. 19. Efecto de losartán o captopril sobre el volumen urinario de ratas diabéticas en 24 h.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  $p < 0.05$  vs ratas control;  $**p < 0.05$  vs ratas diabéticas.  $n=6$ .

El peso corporal de las ratas D ( $193.4 \pm 9.7g$ ) disminuyó significativamente en relación al grupo C ( $261 \pm 11.4 g$ ) y los tratamientos con losartán o captopril no modificaron este parámetro ( $200.5 \pm 7 g$  y  $196 \pm 19.3 g$ , respectivamente) (Fig. 20).



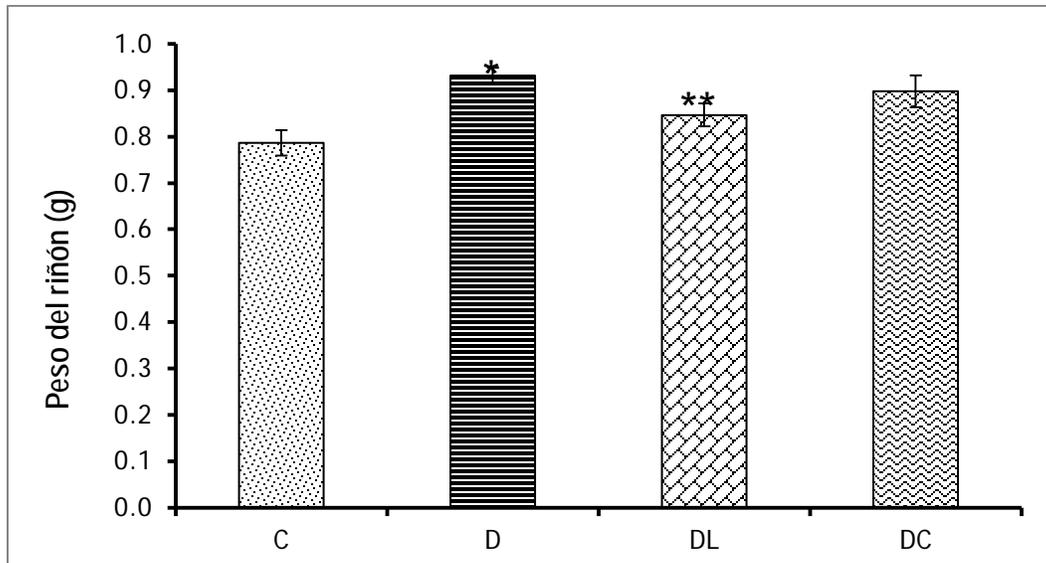
**Fig. 20. Efecto de losartán o captopril sobre el peso corporal de ratas diabéticas en 24 h.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  $p < 0.05$  vs ratas control;  $**p < 0.05$  vs ratas diabéticas.  $n=6$ .

Estos resultados muestran que los tratamientos con losartán o captopril ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no tuvieron efecto sobre el curso de la DM, ya que no modificaron la hiperglucemia, la polifagia ni la pérdida de peso.

### **6.5 Efecto del tratamiento del losartán o captopril sobre la HR.**

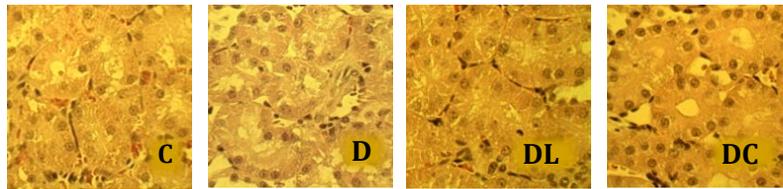
Una vez que se observó que los tratamientos no modificaron la mayoría de los signos de la DM, principalmente la hiperglucemia, se pesaron los riñones, se midió el área de las células del túbulo proximal, y se determinó el cociente proteínas/DNA para conocer los efectos del losartán y del captopril en la hipertrofia renal. Para determinar si el losartán y el captopril tienen efectos sobre las modificaciones funcionales se midió la proteinuria y se determinó la depuración de creatinina.

El peso del riñón de las ratas D ( $0.93 \pm 0.01 \text{ g}$ ) aumentó respecto al grupo C ( $0.78 \pm 0.2 \text{ g}$ ). El peso renal del grupo DL disminuyó significativamente ( $0.84 \pm 0.02 \text{ g}$ ) respecto al grupo D; mientras que el grupo DC ( $0.89 \pm 0.03 \text{ g}$ ) no modificó el peso del riñón significativamente respecto al D (Fig. 21).

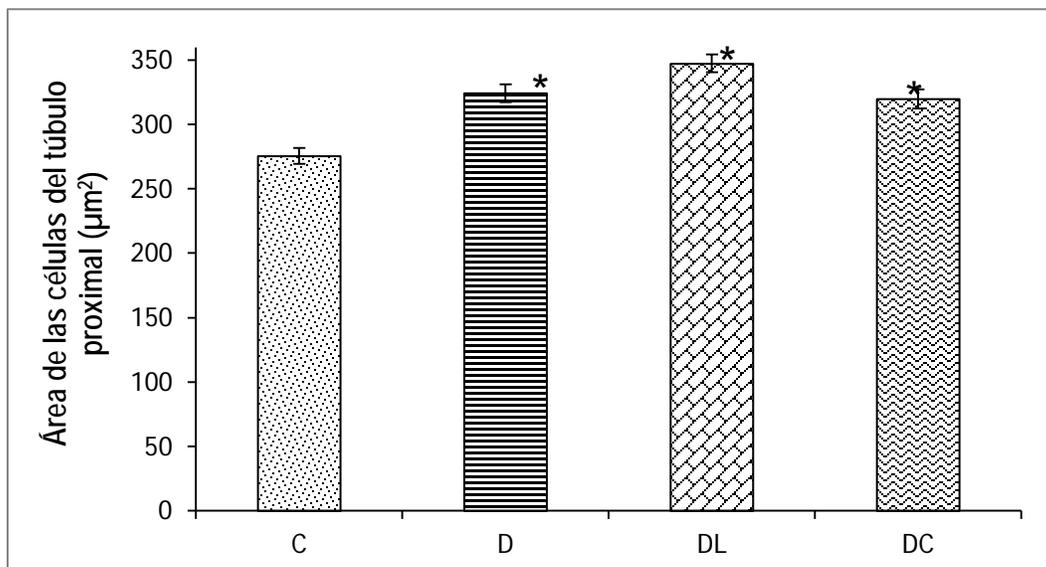


**Fig. 21. Efecto de losartán o captopril sobre el peso del riñón.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  $p < 0.05$  vs ratas control.  $n=4$ .

Para obtener el tamaño de las células renales se midieron 100 células de cada laminilla (es decir, 600 células de cada grupo). El área de las células del túbulo proximal incrementó significativamente en las ratas D ( $324.36 \pm 6.92 \mu\text{m}^2$ ) respecto a las ratas C ( $275.54 \pm 6.3 \mu\text{m}^2$ ). Los tratamientos con losartán o captopril ( $347.26 \pm 6.96 \mu\text{m}^2$  y  $319.86 \pm 7.3 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) no modificaron este parámetro respecto a las ratas D (Fig. 22 y 23).

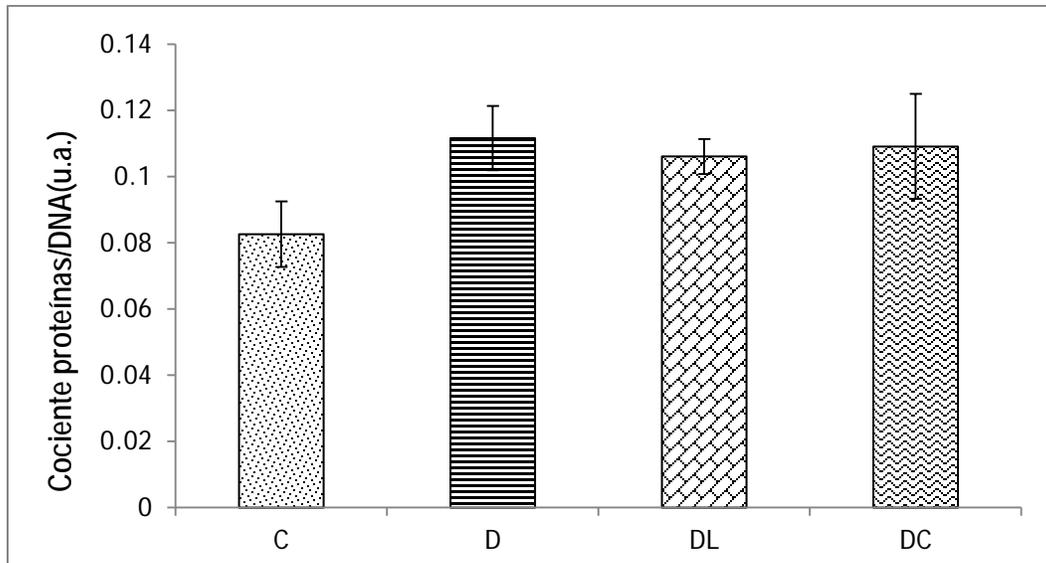


**Fig. 22. Cortes histológicos procesados con la técnica de Eosina-Hematoxilina.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Se observan las células del túbulo proximal, donde se puede notar que las células las ratas diabéticas son más grandes que en las controles.



**Fig. 23. Efecto de losartán o captopril sobre el área de las células del túbulo proximal en ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán, y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  $p < 0.05$  vs ratas control.  $n = 6$ .

El cociente renal proteínas/DNA fue mayor en el grupo D ( $0.111 \pm 0.01$  u.a.) que en el grupo C ( $0.08 \pm 0.009$  u.a.). En los riñones de las DL y DC no hubo cambio significativo de este parámetro con respecto a las ratas D ( $0.106 \pm 0.005$  y  $0.109 \pm 0.015$  u.a., respectivamente) (Fig. 24).

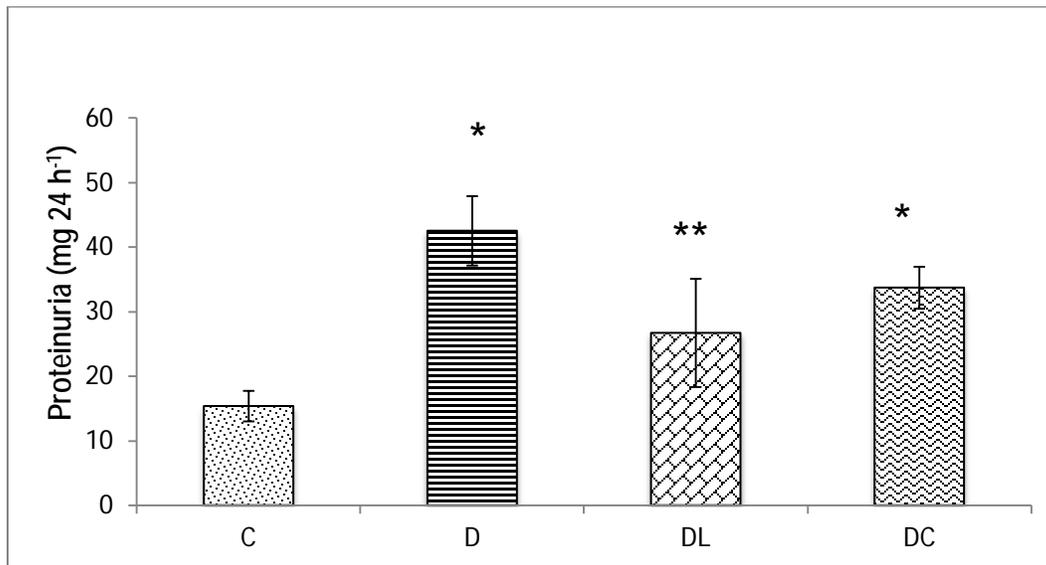


**Fig. 24. Efecto de losartán o captopril sobre el cociente renal proteínas/DNA en ratas control y diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs ratas control; \*\* $p < 0.05$  vs ratas diabéticas.  $n=6$ .

### 6.6 Efecto del tratamiento con losartán o captopril sobre la función renal.

Los resultados mostraron que los valores de proteinuria en las ratas C fueron de  $15.4 \pm 2.4 \text{ mg d}^{-1}$ , mientras que las ratas D mostraron mayor excreción de proteínas en orina ( $42.5 \pm 5.3 \text{ mg d}^{-1}$ ); los tratamientos con ambos fármacos

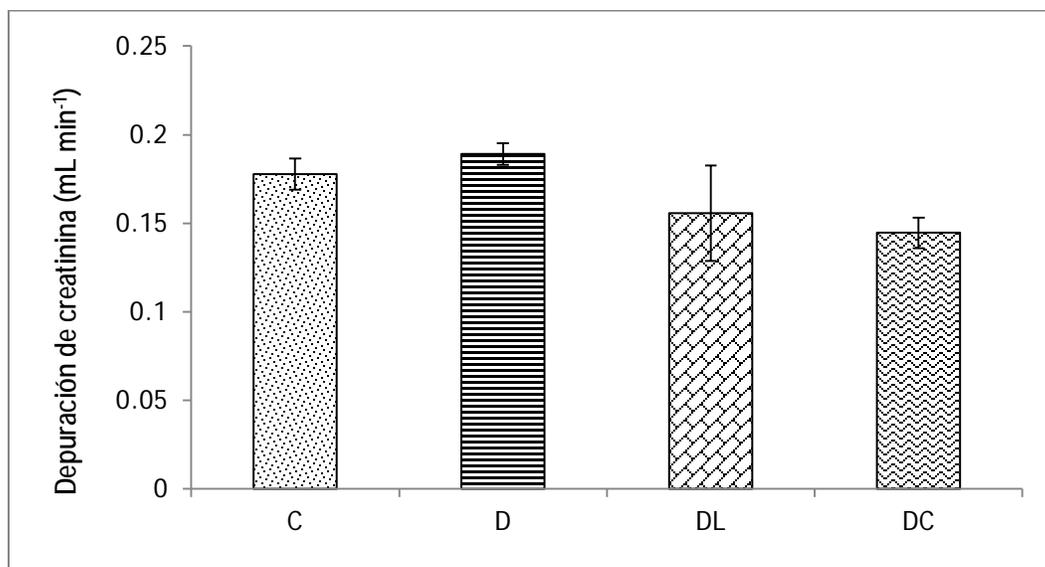
disminuyeron la excreción de proteínas, sin embargo, sólo el tratamiento con losartán mostró diferencias significativas ( $26.7 \pm 8.4 \text{ mg d}^{-1}$ ) (Fig. 25).



**Fig. 25. Efecto de losartán o captopril sobre la excreción de proteínas en orina de ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs ratas control; \*\* $p < 0.05$  vs ratas diabéticas.  $n=6$ .

La depuración de creatinina para las ratas C fue de  $0.18 \pm 0.008 \text{ mL min}^{-1}$  y para las ratas D se encontró la mayor depuración ( $0.19 \pm 0.006 \text{ mL min}^{-1}$ ) sin embargo, este cambio no fue significativo. Las ratas DL y DC obtuvieron valores

de depuración de creatinina de  $0.16 \pm 0.02$  y  $0.14 \pm 0.008$  mL min<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 26).

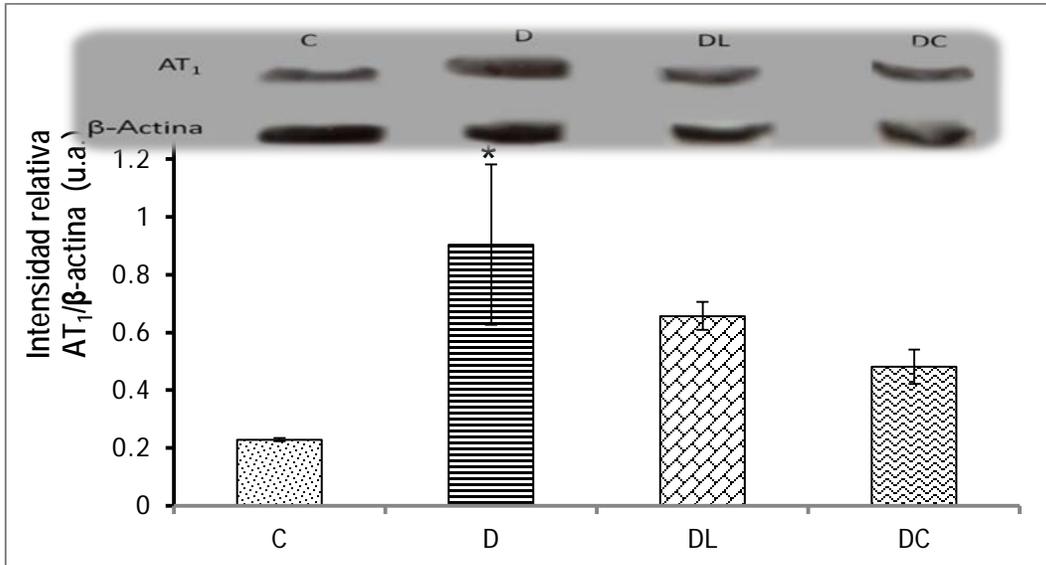


**Fig. 26. Efecto de losartán o captopril sobre la depuración de creatinina en ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. n=6.

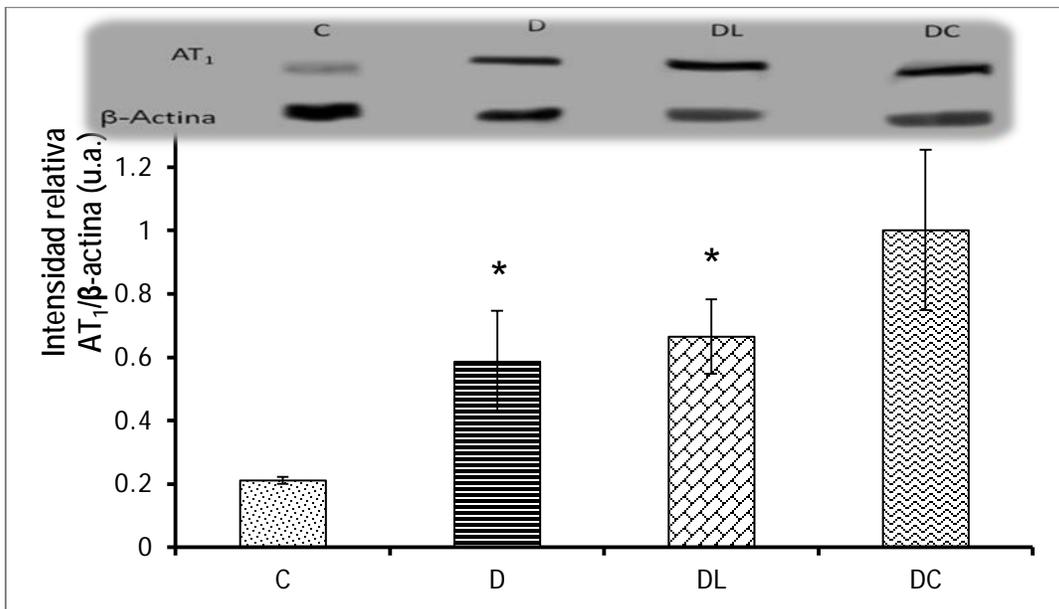
### 6.7 Expresión de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en corteza y médula renal.

La expresión de los receptores se determinó por Western Blot para evaluar si el losartán y el captopril pueden modificarla y de ese modo controlar los efectos de la Ang II.

En la corteza renal, la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en el grupo D incrementó respecto al grupo C. El grupo D tuvo  $0.9 \pm 0.27$  u.a. y el grupo C  $0.23 \pm 0.006$  u.a. Los tratamientos con losartán o captopril disminuyeron la expresión del receptor AT<sub>1</sub> ( $0.66 \pm 0.05$  y  $0.48 \pm 0.059$  u.a., respectivamente), sin embargo esta disminución no fue significativa (Fig. 27). En la médula, la expresión del receptor AT<sub>1</sub> fue de  $0.21 \pm 0.01$  u.a. en las ratas C y en las ratas D fue de  $0.58 \pm 0.16$  u.a. Las ratas diabéticas tratadas no disminuyeron la expresión de este receptor. Las ratas DL mostraron valores de  $0.7 \pm 0.12$  u.a. y los DC de  $1.0 \pm 0.25$  u.a. (Fig 28).



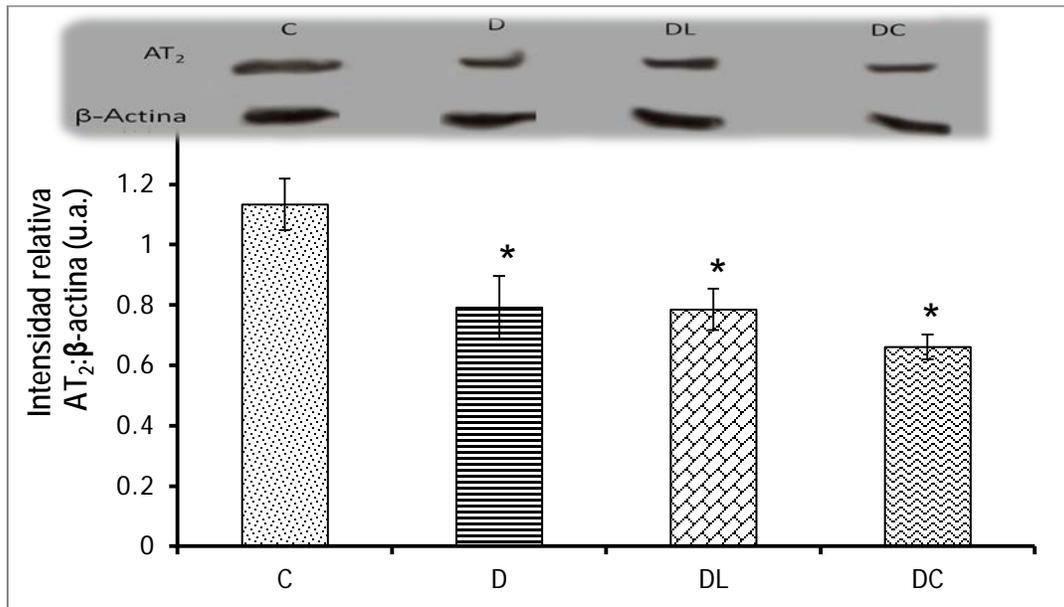
**Fig. 27. Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la corteza de ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \* $p < 0.05$  vs ratas control.  $n = 6$ .



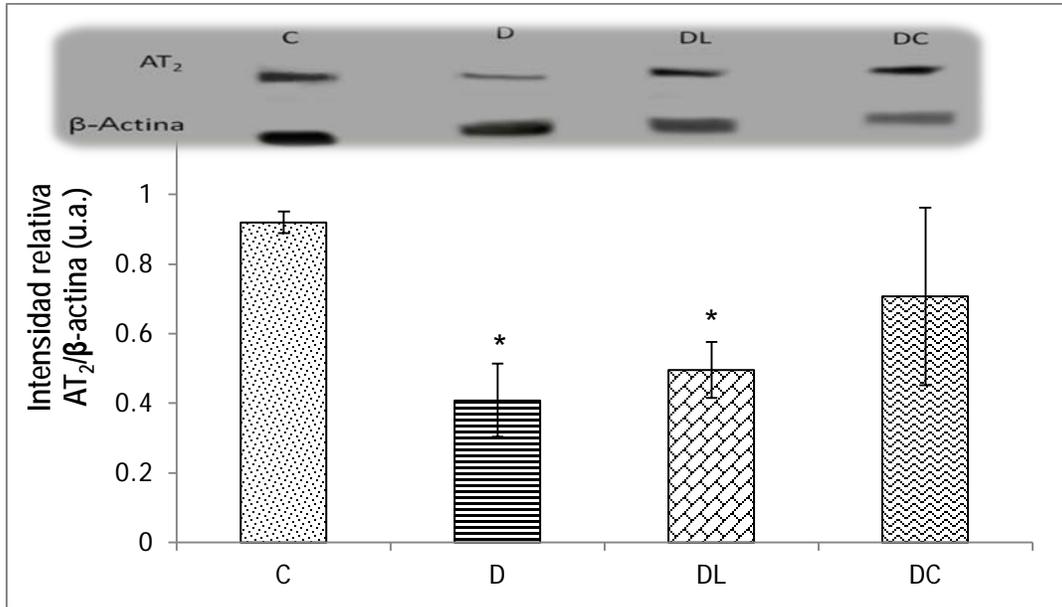
**Fig. 28. Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la médula de ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \* $p < 0.05$  vs ratas control.  $n = 6$ .

El receptor AT<sub>2</sub> en la corteza renal de ratas D ( $0.8 \pm 0.1$  u.a.) disminuyó respecto a las ratas C ( $1.13 \pm 0.08$  u.a.). Los tratamientos con losartán o captopril no modificaron significativamente la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en las ratas D ( $0.8 \pm 0.07$  u.a. y  $0.7 \pm 0.04$  u.a., respectivamente) (Fig. 29).

La expresión del receptor AT<sub>2</sub> en la médula renal de ratas D ( $0.4 \pm 0.1$  u.a.) disminuyó respecto a las ratas C ( $0.91 \pm 0.03$  u.a.), y hubo una tendencia a incrementar en las ratas DL y DC ( $0.49 \pm 0.08$  y  $0.7 \pm 0.25$  u.a., respectivamente) (Fig. 30).



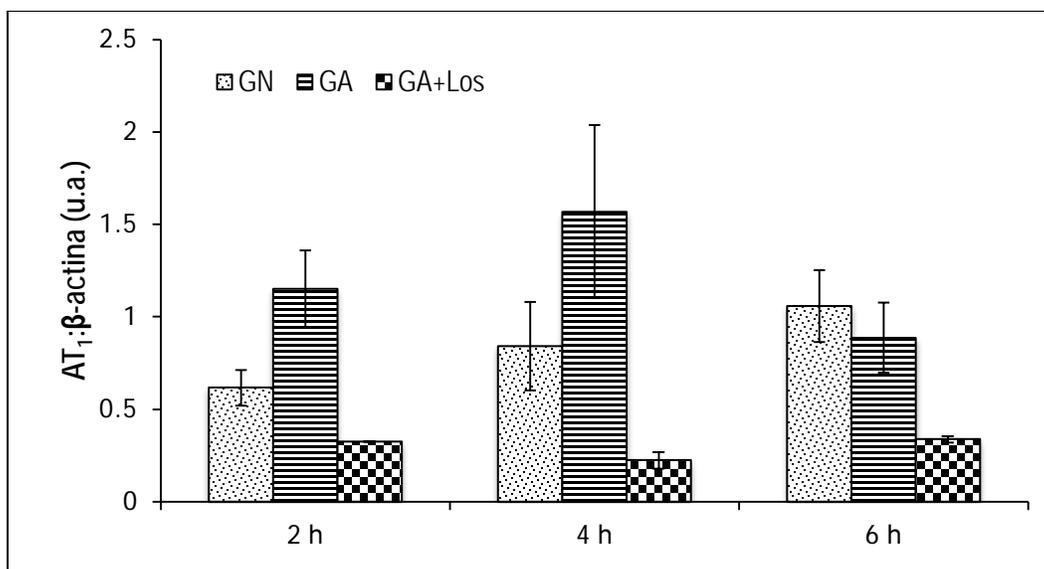
**Fig. 29. Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en la corteza de ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media ± EEM. \* $p < 0.05$  vs ratas control.  $n=6$ .



**Fig. 30. Efecto de losartán o captopril sobre la expresión del receptor  $AT_2$  en la médula de ratas diabéticas.** C=Control, D=Diabética, DL=Diabéticas tratadas con losartán y DC=Diabéticas tratadas con captopril. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM.  $p < 0.05$  vs ratas control.  $n=6$ .

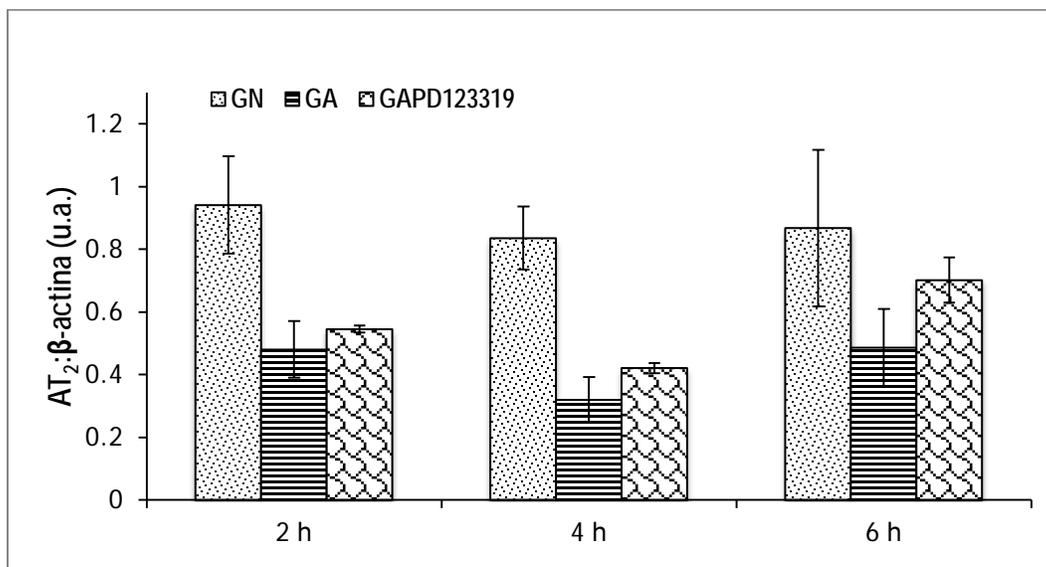
## 6.8 Expresión de receptores en las células tubulares proximales LLC-PK1.

La expresión del receptor  $AT_1$  de las células LLC-PK1 aumentó conforme transcurrió el tiempo de incubación en glucosa normal (5.5 mM) ( $0.61 \pm 0.1$  u.a. a las 2 h,  $0.84 \pm 0.2$  u.a. a las 4 h y  $1.05 \pm 0.2$  u.a. a las 6 h). La glucosa alta (25 mM) aumentó la expresión del receptor  $AT_1$ , alcanzando valores de  $1.56 \pm 0.5$  u.a. a las 4 h de incubación y el losartán revirtió dicho efecto ( $0.32 \pm 0.002$  u.a. a las 2 h,  $0.22 \pm 0.05$  u.a. a las 4 h y  $0.33 \pm 0.02$  u.a. a las 6 h) (Fig. 31).



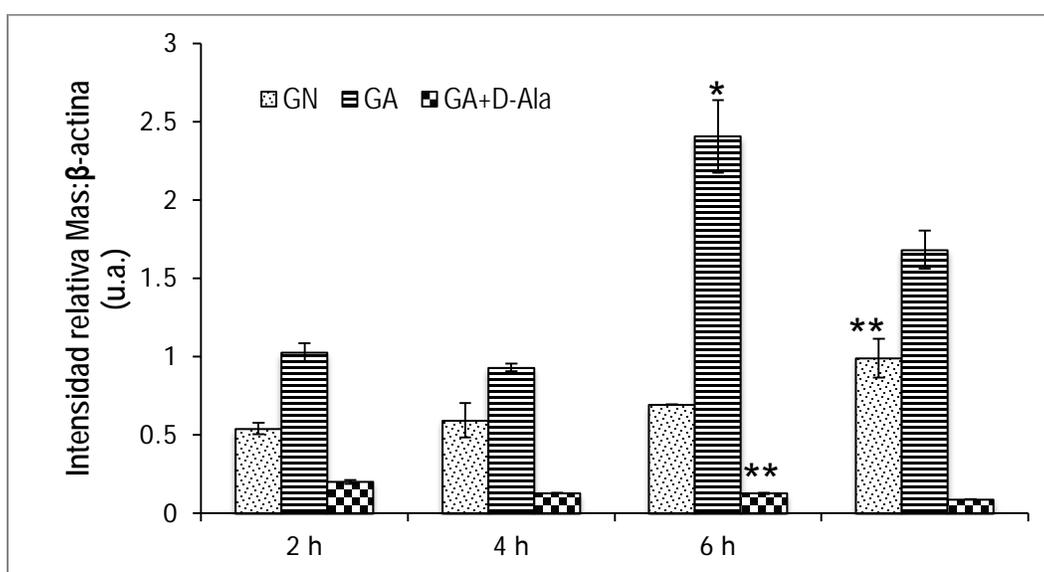
**Fig. 31. Efecto del losartán sobre la expresión del receptor  $AT_1$  en células incubadas en glucosa normal y glucosa alta.** GN=Glucosa normal, GA=Glucosa alta, GA + Los=Glucosa alta con el antagonista del receptor  $AT_1$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0.05$  vs células cultivadas en GA. n=3.

La expresión del receptor  $AT_2$  fue mayor en las células incubadas en GN en todos los tiempos de incubación ( $0.94 \pm 0.16$  u.a. a las 2 h,  $0.83 \pm 0.1$  u.a. a las 4 h y  $0.87 \pm 0.3$  u.a. a las 6 h). El medio con GA disminuye la expresión del receptor  $AT_2$  ( $0.48 \pm 0.1$  u.a. a las 2 h,  $0.32 \pm 0.1$  u.a. a las 4 h y  $0.48 \pm 0.12$  u.a. a las 6 h). La expresión del receptor fue menor cuando las células se expusieron a un medio alto de glucosa que cuando se incubaron con el antagonista del receptor  $AT_2$  (PD123,319) ( $0.54 \pm 0.01$  u.a. a las 2 h,  $0.42 \pm 0.03$  u.a. a las 4 h y  $0.7 \pm 0.03$  u.a. a las 6 h) (Fig. 32).



**Fig. 32. Efecto del PD123319 sobre la expresión del receptor  $AT_2$  en células incubadas en glucosa alta.** GN=Glucosa normal, GA=Glucosa alta, GA + PD123319=Glucosa alta con antagonista del receptor  $AT_2$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. n=3.

La expresión del receptor *Mas* en las células incubadas en GN fue de  $0.54 \pm 0.04$  u.a. a las 2 h,  $0.6 \pm 0.1$  u.a. a las 4 h,  $0.7 \pm 0.003$  u.a. a las 6 h y  $1.0 \pm 0.12$  u.a. a las 8 h. Cuando las células se incubaron en GA incrementó la expresión del receptor *Mas* en los diferentes tiempos de incubación, siendo de  $1.02 \pm 0.06$  u.a. a las 2 h,  $0.9 \pm 0.024$  u.a. a las 4 h,  $2.4 \pm 0.23$  u.a. a las 6 h y  $1.7 \pm 0.12$  u.a. a las 8 h. El antagonista del receptor *Mas* inhibió la expresión, ya que las células incubadas en GA+D-Ala Ang-(1-7) mostraron la menor expresión de este receptor en todos los tiempos de incubación,  $0.2 \pm 0.01$  u.a. a las 2 h,  $0.13 \pm 0.003$  u.a. a las 4 h,  $0.13 \pm 0.002$  u.a. a las 6 h y  $0.1 \pm 0.001$  u.a. a las 8 h (Fig. 33).



**Fig. 33. Efecto del D-Ala Ang-(1-7) sobre la expresión del receptor *Mas* en cultivos de células incubados en glucosa alta.** GN=Glucosa normal, GA=Glucosa alta, GA+D-Ala=Glucosa alta con antagonista. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$  vs células cultivadas en GN, \*\* $p < 0.05$  vs células cultivadas en GA.  $n=3$ .

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Reproducción del modelo de DM

La STZ ha sido ampliamente usada para inducir DM experimental, siendo eficaz en una sola dosis mayor de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  por vía i.p. La STZ produce varios efectos en el páncreas (Lenzen, 2008), el mecanismo por el cual causa muerte de las células  $\beta$  del páncreas es por alquilación de DNA (Szkudelski, 2000). Al ser las células  $\beta$  pancreáticas las encargadas de sintetizar, almacenar y liberar la insulina

(Goodman, 2003); la STZ disminuye o depleta por completo la hormona generando hiperglucemia y los demás signos de la DM como consecuencia.

Nuestros resultados nos permiten considerar a este un modelo de diabetes experimental que mimetiza DM tipo 1, debido a que presenta hiperglucemia, poliuria, polidipsia, polifagia y disminución de peso que se diferencia de los modelos de DM tipo 2 por la dependencia a la insulina (Kumar *et al.*, 2005).

Por otra parte, el tiempo que se dejó transcurrir la diabetes (siete días), nos permite considerarlo como un modelo de DM en estadio temprano (Thomson *et al.*, 2003).

La disminución en la captación de glucosa por las células musculares y adiposas provoca hiperglucemia que satura los sistemas de transporte renal y lleva a glucosuria (Mather y Pollock. 2011), que a su vez induce diuresis osmótica y aumento del volumen urinario (poliuria). La poliuria también implica pérdida de agua intracelular que origina deshidratación y desencadena la activación de osmorreceptores de los centros de la sed del hipotálamo produciendo polidipsia. La deficiencia insulínica, disminuye la entrada de glucosa a las células del tejido muscular, adiposo e hígado, estimula el catabolismo de grasas y proteínas, para la generación de glucosa lo que produce la pérdida de peso y desencadena la polifagia (Goodman, 2003).

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con losartán o captopril, a las dosis administradas, no modificaron el curso de la DM. Solo se observó que el losartán disminuyó de manera significativa la ingesta de agua, lo que se asocia con la disminución del volumen de orina. Esta disminución se debe a que la Ang II participa en la regulación de los mecanismos centrales de la sed de forma selectiva, modulando las etapas clave que determinan el inicio y el término de la ingesta de agua (Vlasenko y Kotov, 2007, De Arruda *et al.* 2010).

Los tratamientos con losartán o captopril no tuvieron efecto significativo sobre la ingesta de alimento y sobre el peso corporal.

Las ratas diabéticas mostraron aumento del peso de los riñones así como del área de las células del túbulo proximal, estos datos muestran que a los 7 días del curso de DM se produjo la HR. Estudios recientes sugieren que el aumento en el

peso del riñón y el tamaño de las células del túbulo proximal se debe a que las células renales son estimuladas por la hiperglucemia, y el flujo de glucosa a las células renales es modulado por el transportador GLUT-1; se ha demostrado que la expresión de este transportador aumenta por hiperglucemia, lo que incrementa la reabsorción de glucosa, y promueve la actividad de Ang II, estimulando la producción de factores de crecimiento y aumenta la resistencia de la arteriola eferente glomerular. La glucosa también puede estimular directamente la expresión de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  y el Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (CTGF), los cuales producen alteraciones estructurales que incrementan la permeabilidad de la membrana basal glomerular y participan en la hipertrofia (Carey y Siragy, 2003, Levin-Iaina *et al.*, 2011; Rocco *et al.* 1992, Satriano, 2007 y Schena y Gesualdo, 2005; Yuan *et al.*, 1990).

El crecimiento del riñón es una respuesta compensatoria a la hiperfiltración que llevaría al aumento de tamaño de las células del túbulo proximal, lo que aumentaría la reabsorción de agua y electrolitos de la luz del túbulo hacia el plasma. Una alternativa es que el crecimiento del riñón, principalmente, de las células del túbulo proximal altera el sistema de retroalimentación túbulo-glomerular, que consiste en que al disminuir el filtrado glomerular, se retrasa el paso del líquido tubular lo que promueve la reabsorción de NaCl en el asa ascendente de Henle, por lo que llega menos NaCl a la mácula densa, que disminuye la resistencia de la arteriola aferente y produce la liberación de renina del aparato yuxtaglomerular, aumentando la resistencia de la arteriola eferente y estimulando una cascada negativa donde las señales del sistema de retroalimentación incrementan la TFG, por lo que el crecimiento celular se produce primero que la hiperfiltración (Vallon *et al.*, 1995; Vallon, 2003; Satriano, 2007; Levey *et al.* 1999).

La administración de losartán disminuyó significativamente el peso de los riñones pero no disminuyó el tamaño del área de las células del túbulo proximal. El captopril no disminuyó el peso de los riñones ni el tamaño del área de las células del túbulo glomerular probablemente debido a la baja dosis que se administró (10 mg kg<sup>-1</sup>) y por el tiempo de evolución de la DM.

Los resultados obtenidos al medir el cociente proteínas/DNA muestran que en las ratas D no aumentó significativamente; sin embargo, tiende a aumentar, lo que indica que la células no se encuentran en división, sino en crecimiento (De Robertis y Hib, 2004).

Durante la hipertrofia aumenta la cantidad de RNA y de proteínas sin cambios concomitantes en la síntesis de DNA (Wolf *et al.*, 1993); debido a las modificaciones en la actividad de las ciclinas cinasas, ya que se ha reportado que la activación de las ciclinas cinasas D y la inactivación de las E, es seguida por un periodo de hipertrofia (Wolf y Ziyadeh, 1999). A pesar de que Lakshmanan, *et al.*, (2011) han demostrado que la Ang II inhibe proteasas que degradan proteínas y colágeno acumulados de la ECM, los tratamientos con losartán o captopril no modificaron el coeficiente proteínas/DNA; lo que sugiere que la Ang II no tiene una participación muy relevante y la HR observada en las ratas D probablemente se deba a que la hiperglucemia que modifica la actividad de las proteínas reguladoras (ciclinas) y los factores de crecimiento.

En las ratas D se observó un aumento en la proteinuria, la cual de acuerdo a los estudios de Mogensen *et al.* (1983) no se puede considerar que se presentó una microalbuminuria; en el grupo tratado con losartán disminuyó significativamente la proteinuria y con el tratamiento con captopril no se observaron cambios significativos. 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 de intercambio de líquidos a través de las paredes capilares. Aunque la albúmina es una proteína aniónica (585 residuos de aminoácidos, y con una masa molecular de 64.5 kDa), 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 *et al* 2003).

La albúmina filtrada actúa como un estímulo proinflamatorio y profibrótico siendo el inicio o promotor de enfermedades túbulo-intersticiales y su

cuantificación en la orina es un parámetro para el diagnóstico y la progresión de la nefropatía diabética. Nuestros resultados indican que a los 7 días de DM en las ratas D aumentó la proteinuria, sin embargo, según Gekle (2005) estos valores están dentro de los límites normales.

Por otro lado, el tratamiento con losartán disminuyó significativamente la proteinuria aunque no llegó a los valores del grupo C. Con el captopril también disminuyó la proteinuria aunque no de manera significativa, probablemente por la dosis o el tiempo de administración. Lo que sugiere la participación temprana de la Ang II-receptor  $AT_1$  no solamente en pacientes con ND diagnosticada.

Los resultados obtenidos al calcular la depuración de creatinina como indicador de la función renal mostraron que no hubo diferencia significativa entre los grupos C y D, lo cual indica que no hay daño grave al riñón y muestra una filtración glomerular aparentemente normal. Con la administración del losartán o el captopril se observó una tendencia a disminuir, sin embargo, no es significativa, lo que indica que es una DM en fase temprana.

La expresión de la proteína del receptor  $AT_1$  incrementó en la corteza y en la médula de las ratas D respecto a las ratas C, lo que se correlaciona con los estudios de Wehbi *et al.* (2001) quienes obtuvieron resultados similares en ratas con 2 semanas de DM; sin embargo en este trabajo observamos que desde una fase temprana (7 días) se da el aumento del receptor  $AT_1$ , dicho incremento se asocia al aumento de los efectos de poliuria, polidipsia y proteinuria. Como ya se ha mencionado los efectos de Ang II, en este modelo de DM, son mediados predominantemente por unión al receptor  $AT_1$  que como se pudo observar se encuentra en los riñones de ratas control y diabéticas, tanto en corteza como en médula renal, lo que se correlaciona con los estudios de Faggiotto y Paoletti, (1999). Según los estudios de Guo *et al.* (2011) el ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE), producto del metabolismo de la 12-lipooxigenasa (12-LO) regula de manera importante la expresión del receptor  $AT_1$ . Ellos observaron que al aumentar Ang II, aumenta la 12-LO lo que estimula la expresión del receptor  $AT_1$  en ratas diabéticas por administración de STZ y con dieta alta en grasa.

El tratamiento con captopril en las ratas D aumentó la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la médula, posiblemente por disminución de la síntesis de Ang II, ya que los estudios de Zimpelmann *et al.*, (2000) demuestran que cuando aumenta la renina, que lleva al incremento de Ang II, disminuye la expresión del receptor AT<sub>1</sub> lo que sugiere una retroalimentación negativa.

Con la administración del losartán disminuyó la expresión del receptor AT<sub>1</sub>, y se ha propuesto que la expresión del receptor AT<sub>1</sub> es controlada principalmente por mecanismos postranscripcionales, lo que involucraría la inducción de un gen o grupo de genes cuya función es desestabilizar el RNA del receptor AT<sub>1</sub>, es decir, modifican la estabilidad del transcrito o disminuyen la traducción de RNA a proteína (Nickenig y Murphy, 1994). También se ha demostrado que el telmisartán (fármaco análogo al losartán) produce la disminución de la expresión del receptor AT<sub>1</sub> (a nivel mRNA y proteína) a través de aumentar el receptor Mas que a su vez promueve PPAR-γ; y así suprime la actividad de la NADPH oxidasa, que se ha demostrado que es la principal fuente de ROS en células renales (Lakshmanan *et al.*, 2011).

En un trabajo realizado por Nickenig *et al.* (2000) se observó que el aumento de Ang II lleva a la generación de ROS y estas regulan negativamente la expresión del receptor AT<sub>1</sub> al activar MAPK-p38 y la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> por lo que es congruente encontrar que el tratamiento con captopril disminuyera la expresión del receptor AT<sub>1</sub> ya que habría una disminución de Ang II, consecuentemente, disminución de ROS y se bloquearía el control de la expresión del receptor AT<sub>1</sub>.

El receptor AT<sub>2</sub> se localiza en el glomérulo, en la corteza y médula y aunque inicialmente se reportó su presencia en tejidos fetales y se asociaba con la proliferación glomerular, actividad que desaparece después de la nefrogénesis (Carey y Siragy, 2003; Miyata *et al.*, 1999; Ozono *et al.*, 1997), actualmente se sabe que tanto la proteína como el mRNA del receptor se encuentran principalmente en células epiteliales de la mácula densa, en las células mesangiales del glomérulo maduro y en las células de la médula que se encuentran entre los túbulos (Paul *et al.*, 2006); sin embargo, también se sabe que

la expresión de los receptores varia dependiendo del tejido y el transcurso de la DM (Brown *et al.*, 1997), lo cual se correlaciona con nuestros resultados, ya que el receptor AT<sub>2</sub> se encontró en las ratas C y la DM disminuyó su expresión, esta disminución se correlaciona con los datos reportados por Wehbi *et al.*, (2001). Al disminuir la expresión del receptor AT<sub>2</sub> por la DM, se restringen los efectos de su interacción con la Ang II, como la liberación de NO, antifibrosis, antitrombosis y antiproliferación, efectos producidos también por la unión de la Ang-(1-7) a su receptor Mas (Nakajima *et al.*, 1995; Wehbi *et al.*, 2001), lo que nos permite proponer que los efectos de Ang-(1-7) podrían estar supliendo los de Ang II-receptor AT<sub>2</sub> y por ello en la primera semana de DM no se observan modificaciones significativas estructurales y funcionales en el riñón.

La expresión del receptor AT<sub>2</sub> no fue modificada significativamente por losartán ni por captopril respecto a las ratas D. Esto sugiere que la ruta de transcripción del receptor no se encuentra ligada a la síntesis de Ang II o al antagonismo del receptor AT<sub>1</sub>.

## **7.2. Cultivo celular.**

Al incubar a las células del túbulo contorneado proximal (LLC-PK1) en un medio de cultivo con GN se observó la expresión de los receptores a Ang II (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>); también se observó expresión del receptor a Ang-(1-7). La expresión de los tres receptores aumentó conforme transcurrió el tiempo de incubación, alcanzando un pico máximo de expresión a las 4 h a partir de las cuales se mantuvo y posterior a las 8 h de incubación comenzó a disminuir su expresión.

La incubación de las células en el medio de GA y con losartán ( $1 \times 10^{-6}$  M) disminuyó la expresión del receptor AT<sub>1</sub>, lo cual se correlaciona con la tendencia observada en la corteza renal de las ratas D y nos confirma la participación de la Ang II-receptor AT<sub>1</sub> en la DM.

Las células también se incubaron en un medio con GA (25 mM) para mimetizar un estado de hiperglucemia, observándose que el receptor AT<sub>1</sub> aumentó en relación a las células incubadas en GN. En relación a la expresión del receptor AT<sub>2</sub> se observó que este receptor se expresa en esta línea celular y que al ser

incubadas en GA disminuyó su expresión lo que indica que las células tienen el SRAA como ocurrió en médula y corteza renal de las ratas. Al incubar a las células en GA y PD123319 (antagonista específico del receptor AT<sub>2</sub>) (1X10<sup>-6</sup> M) disminuyó la expresión del receptor AT<sub>2</sub>; estos resultados confirman que tanto en el riñón de las ratas como en esta línea celular está presente el SRAA y que en ambos sistemas aumenta la expresión del receptor AT<sub>1</sub> y disminuye la del AT<sub>2</sub>.

El homogenado del inmunoblot reveló una banda de 37 kDa (peso del receptor *Mas*) (Gava, *et al.*, 2009) en las células incubadas en GN, lo cual sugiere que en esta línea celular se expresa el receptor *Mas* de Ang-(1-7); y cuando se incubó en un medio con GA la expresión del receptor aumentó. Cuando las células fueron incubadas en GA con D-Ala-Ang-(1-7) (antagonista específico del receptor *Mas*) la expresión del receptor *Mas* disminuyó incluso a niveles más bajos que los de las células incubadas en GN, lo que sugiere la participación de la Ang-(1-7) y su receptor *Mas* en la DM como un sistema que se contrapone a los efectos de la Ang II-receptor AT<sub>1</sub>.

Según estudios de Adams *et al.* (1999), los receptores acoplados a proteínas G (como el AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y *Mas*) se regulan por exposición persistente de sus ligandos; sin embargo también se sabe que dentro de los mecanismos generales celulares hay adaptación a las condiciones ambientales extracelulares, por ejemplo, se puede llevar a la célula a desensibilización que indica desacoplamiento rápido de los receptores de los sistemas de señalización; también puede darse internalización del receptor, la cual puede implicar el secuestro del receptor o su eliminación mediante endocitosis vesicular. Posiblemente por esta razón la expresión del receptor AT<sub>1</sub> y del receptor *Mas* disminuyó al exponerlos a sus respectivos antagonistas (SOLO CUANDO ES AGONISTA).

El receptor AT<sub>1</sub> también disminuyó en las células expuestas a GA incubadas con D-ala-ang-(1-7), lo que sugiere probablemente porque al antagonizar al receptor *Mas*, la Ang-(1-7) podría estar también interactuando con el receptor AT<sub>1</sub> causando su internalización.

En las células LLC-PK1 se ha observado que la exposición a GA promueve la expresión de MAPKs las cuales están asociadas con el daño a la nefrona.

También hay datos que muestran que la Ang-(1-7) al activar al receptor *Mas* inhibe la MAPK p38 estimulada por GA, efecto asociado con la activación de la proteína tirosin fosfatasa 1 contenedora de la homóloga 2 de Src (SHP-1); además la Ang-(1-7) también inhibe la producción de TGF- $\beta$  (Gava *et al.* 2009), por lo que posiblemente el receptor *Mas* incrementó en las células incubadas con GA, siendo un mecanismo homeostático para contrarrestar los efectos del receptor AT<sub>1</sub>. Otro de los mecanismos mencionados por los cuales la Ang-(1-7) protege de los daños renales producidos por la DM es evitando la disminución de los PPAR- $\gamma$ .

En resumen, la expresión de receptores en el cultivo celular y en la corteza renal se comportó de manera similar aumentando la expresión del receptor AT<sub>1</sub> y disminuyendo la de AT<sub>2</sub> en condiciones de hiperglucemia/GA y en las células LLC-PK1 el receptor AT<sub>1</sub> disminuyó con el losartán de manera significativa. La expresión del receptor *Mas* aumentó en las células incubadas con GA como un mecanismo para que la Ang-(1-7) produjera los efectos benéficos producidos por el receptor AT<sub>2</sub>; también se observó que al antagonizar al receptor *Mas* la expresión del receptor AT<sub>2</sub> aumenta.

## 8. CONCLUSIONES

La Ang II a través de su receptor AT<sub>1</sub> participa en el desarrollo de la HR en un modelo de DM temprana.

Antagonizar al receptor AT<sub>1</sub> con losartán tuvo un efecto renoprotector más evidente que inhibir la síntesis de Ang II con captopril en el transcurso de la DM.

La incubación de las células LLC-PK1 en GA aumenta la expresión del receptor *Mas*, lo que indica la participación de la Ang-(1-7) como mecanismo protector de los daños producidos por la DM.

**Perspectivas.**

Un aspecto importante es conocer la ubicación y su modificación de los diferentes péptidos del SRAA en el riñón durante la DM, por lo que se podría realizar la técnica de inmunohistoquímica.

Recientemente se ha demostrado que el receptor AT<sub>1</sub> se heterodimeriza con el receptor B<sub>2</sub> de bradicinina provocando incremento en la activación de las proteínas G (G<sub>aq</sub> y G<sub>ai</sub>) las dos proteínas G activadas por el receptor AT<sub>1</sub>. De esta forma, la formación del heterodímero puede provocar sinergismo funcional, incluso en ausencia del ligando agonista; sin embargo en vasos sanguíneos y en el riñón el efecto de estimular al receptor AT<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son opuestos, por lo tanto conocer cómo participa la heterodimerización es importante para saber cómo participa durante el transcurso de la DM.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Adams B, Obertone ST, Wang X y Murphy J. 1999. Relationship between internalization and mRNA Decay in Down-Regulation of Recombinant Type 1 Angiotensin II Receptor (AT<sub>1</sub>) Expression in Smooth Muscle Cells. *Molecular Pharmacology*. 55:1028-1036.

Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S y Deckert T. 1983. Diabetic Nephropathy in Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes: An Epidemiological Study. *Diabetologia* 25:496-501.

Arici M y Erdem Y. 2009. Dual blockade of the Renin-Angiotensin System for cardiorenal Protection: An Update. *American Journal of Kidney Diseases*. 53(2): 332-345.

Bak M, Thomsen C y Flyvbjerg A. 2000. Renal Enlargement Precedes Renal Hyperfiltration in Early Diabetes in Rats. *J Am Soc Nephrol*. 11:1287-1292.

Benter I F, Yousif HM, Cojocel C, Al-Maghrebi M y Diz DI. 2007. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: 666-672.

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

Braun-Menéndez E, Fasciolo JC, Leloir LF. 1946. Renal hypertension. 1ª Edición. Springfield Ill. Thomas. 451p.

Brenner BM, Cooper ME, De Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z y Shahinfar S. 2001. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with tipe 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 345(12): 861-869.

Brown L, Wall D, Marchant C y Sernia C. 1997. Tissue-specific changes in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol.* 154:355-362.

Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865):813-820.

Carey RM y Siragy HM. 2003. The intrarenal renin–angiotensin system and diabetic nephropathy. *Elsevier.* 14(6):274-82

Chappell MC, Diz DI, Yunis C, Ferrario CM. 1998. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney. Int Suppl* 68:S3-6.

Chen S, Cohen M y Ziyadeh N. 2000. Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy Pathophysiologic connections. *Kidney International.* 77(58): S40-S44.

De Arruda CGMP, De Arruda CLA y Abrão SW. 2010. Medial septal área Ang II receptor subtypes in the regulation of urine and sodium excretion induced by vasopressin. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 12(1):23-28.

De Robertis E. y Hib J. 2004. Fundamentos de biología celular y molecular de De Robertis. 4ª Edición. El ateno. Pp. 322-330.

Donath MY y Halban PA. 2004. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia.* 47:581-589.

Donnelly R. 1992. Angiotensin converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 20(11):S38-S44.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res.*

Dunlop M. 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *kidney International.* 58(77):S3-S12.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados de nutrición de la ENSANUT 2006. [Consultado 2010 Febrero 27] Disponible en [http://www.insp.mx/ensanut/resultados\\_ensanut.pdf](http://www.insp.mx/ensanut/resultados_ensanut.pdf)

Faggiotto A y Paoletti R. 1999. Statins and blockers of the renin-angiotensin system: vascular protection beyond their primary mode of action. *Hypertension*. 34:987-996.

Fyhrquist y Saijonmaa, 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 264: 224–236.

Gava E, Samad-Zadeh A, Zimpelmann J. 2009. Angiotensin-(1–7) activates a tyrosine phosphatase and inhibits glucose-induced signalling in proximal tubular cells. *Nephrology Dialysis* 24:1766-1773.

Gekle M, Knous P, Nielsen R, Mildenerger S, Freudinger R, Wohlfarth V, Sauvant C y Cristensen EI. 2003. Transforming growth factor- $\beta$ 1 reduces megalin- and cubilin- endocytosis of albumin in proximal –tubule-derived opossum kidney cells. *J Physiol*. 552(2):471-481.

Gekle M. 2005. Renal Tubule Albumin Transport. *Annu. Rev. Physiol*. 67: 573-94.

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.

Goodman AG. 2003. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. Vol. 1. McGraw-Hill Interamericana.

Grobe JL, Meca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK y Katovich MC. 2006. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: H736-H742.

Guo QY, Miao LN, Li B, Ma FZ, Liu N, Cai L y Xu ZG. 2011. Role of 12-lipoxygenase in decreasing P-cadherin and increasing angiotensin II type 1 receptor expression according to glomerular size in type 2 diabetic rats *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 300(4): E708-E716.

Gwathmey TM, Westwood BM, Pirro NT, Tang L, Rose JC, Diz DI y Chappell MC. 2010. Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 299:F983-F990.

Handler JS, Perkins FM y Johnson JP. 1980. Studies of renal cell function using cell culture techniques. *Am J Physiol Renal Physiol*. 238(1): F1-F9.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. 2001. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* 37(1):72-76.

Hilgers KF y Mann JFE. 2002. ACE inhibitors versus AT<sub>1</sub> receptors antagonist in patients with Chronic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 13:1100-1108.

Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. 1981. Glomerular hemodynamics in experimental DM. *Kidney Int.* 19:410-415.

Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. 2001. Progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 59(2):702-709.

Huang HC y Preisig PA. 2000. G1 kinases and transforming growth factor beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes induced renal growth. *Kidney Int* 58: 162–172.

Iwata M, Cowling TR, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX y Greenberg BH. 2005. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptor on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H2356-H2363.

Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S y MacIsaac RJ. 2010. The clinical significance of hyperfiltration in diabetes. *Diabetologia* 53:2093–2104

Khan KN, Stanfield KM, Harris RK, Baron DA. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy. *Ren Fail.* 23(3-4):321-330.

Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S y Danesh FR. 2008. Diabetic nephropathy: Mechanisms of Renal disease Progression. *Exp. Biol. Med.* 233:4-11

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Seston PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP y Walther T. 2005. G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation.* 111:1806-1813.

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D y Buczko W. 2002. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 40:774-779.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2005. Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. Elsevier, 7° Ed. Pp. 975-1043.

Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, Sari FR, Harima VG, Soetikno V, Kodama M, y Aizawa Y. 2011. Telmisartan attenuates oxidative stress and renal fibrosis in streptozotocin induced diabetic mice with the alteration of angiotensin-(1-7) mas receptor expression associated with its PPAR-γ agonist action. *Free Radical Research.* 45(5):575-584.

Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Watanabe K, Sari FR, Meilei H, Girigharan VV, Sukumaran V, Soetikno V, Arumugan S, Suzuki K y Kodama M. 2012. Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Molecular and cellular endocrinology*. 348:104-111

Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H y King GL. 1989. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci*. 86:5141-5145.

Lenzen S. 2008. The mechanism of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetología*. 51:216-226.

Levey A., Bosch J., Breyer J., Greene T., Rogers N. y Roth D. 1999. A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation. *Ann Intern Med*. 130(6): 461-470.

Levin-laina N, Iaina A y Raz I. 2011. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 27:235-243.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. 1993. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 329:1456-62.

Li B, Yao J, Kawamura K, *et al.* 2004. Real-time observation of glomerular hemodynamic changes in diabetic rats: effects of insulin and ARB. *Kidney Int*. 66(5):1939-1948.

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

Makino H. Tanaka I. Mukoyama M. Sugawara A, Mori K. MUuro S. Suganami T. Yahata K. Ishibashi R. Ohuchida S. Maruyama T. Narumiya S y Nakao K. 2002. Prevention of Diabetic Nephropathy in Rats by Prostaglandin E Receptor EP1-Selective Antagonist. *J Am Soc Nephrol*. 13: 1757–1765

Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JFE, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E y Zucchelli P. 1996. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med*. 334(15): 939-45.

Mather A y Pollock C. 2011. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int*. 79: S1-S6

Mathis D, Vence L, Benoist C. 2001. Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 414(6865):792-798.

Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. 1984. Structural-Functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74:1143-1155.

Miyata N, Park F, Li XF y Cowley AW. 1999. Distribution of angiotensin AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 277: 437-446.

Miyazaki M, Takai S. 2006. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci*. 100:391-7.

Mogensen CE. 1982. Long-term antihypertensive treatment inhibiting progression of diabetic nephropathy. *British Medical Journal*. 285: 685-688.

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.

Nakajima M, Hutchinson HY, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE y Dzau VJ. 1995. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor antagonizes the growth effects of the AT<sub>1</sub> receptor: Gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 10663-10667.

Nguyen G. Delarue F. Burcklé C. Bouzahir L. Giller T y Sraer JD. 2002. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest*. 109 (11):1417-1427.

Nickenig G y Murphy J. 1994. Down-regulation by Growth Factors of Vascular Smooth Muscle Angiotensin Receptor gene Expression. *Molecular Pharmacology*. 46y:653-659.

Nickenig G, Strehlow K, Bäumer AT, Baudler S, Waßmann S, Sauer H y Böhm M. 2000. Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT<sub>1</sub> receptor gene expression. *British Journal of Pharmacology*. 131: 795-803.

Okada S, Ichiki K, Tanokuchi S, Ishii K, Hamada H, Ota Z. 1993. Effect of prostaglandin E1 on the renin-aldosterone system in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res*. 21(3):126-32.

Organización Mundial de la Salud, 2011. Diabetes. [Consultado 2010 diciembre 27]. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.

Ozono R, Wang Z, Moore A, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. 1997. Expression of the Subtype 2 Angiotensin (AT<sub>2</sub>) Receptor Protein in Rat Kidney. *Hypertension*. 30:1238-1246.

Parving H H, Lehnert H, Mortensen JB, Gomis R, Andersen S, Arner P. 2001. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 345(12): 870-878.

Paul M, Mehr AP, Kreutz R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747–803.

Peach M. 1977. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiological Reviews.* 57(2): 313-370.

Perazella MA y Eras J. 2000. Are selective COX-2 inhibitors nephrotoxic?. *American Journal of Kidney Diseases.* 35(5):937-940.

Remuzzi A, Perico N, Amuchastegui CS, Malanchini B, Mazerska C, Bataglia C, Bertani G y Remuzzi G. 1993. Short- and Long-Term Effect of Angiotensin II Receptor Blockade in Rats with Experimental Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 4:40-49

Ribeiro-Oliveira A, Impelziere NA, Pereira RM, Vilas BWW, Souza RA, Simões SAC. 2008. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vascular Health and Risk Management* 4(4) 787–803.

Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S y Ziyadeh FN. 1992. Elevated glucose stimulates TGF- $\beta$  gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney international.* 41:107-114.

Rodby RA. 1997. Type II diabetic nephropathy: its clinical course and therapeutic implications. *Semin Nephrol* 17(2):132-147.

Rossing K, Christensen PK, Jensen BR y Parving HH. 2002. Dual Blockade of the Renin-Angiotensin System in Diabetic Nephropathy. A randomized double-blind crossover study. *Diabetes Care* 25: 95–100.

Santos RAS, Ferreira AJ y Simoes e Silva AC. 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93:519-527.

Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Pillar RM, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Soares VL, Campagnole-Santos MJ, Heinz-Peter S, Speth R, Walther, T. 2003. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor *Mas*. *Proc Natl Acad Sci* 100(14):8258-8263.

Satriano J, 2007. Kidney growth, hypertrophy and the unifying mechanism of diabetic complications. *Amino Acids* 33:331-339.

Schena FP y Gesualdo L. 2005. Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy. *J Am.Soc Nephrol.* 16:S30-S33.

Seyer-Hansen K. 1983. Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 23: 643-646.

Schambelan M, Blake S, Sraer J, Bens M, Nivez MP, Wahbe F. 1985. Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 75(2):404-412.

Schleicher y Weigert, 2000. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international.* 58(77): S13-S18.

Sheetz MJ y King JL. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288(2):2579-2588.

Siragy H y Carey R. 2010. Role of the Intrarenal Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 31:541–550

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

Stanton RC y King GL. 2011. A complex interplay of factors causes diabetic nephropathy. *Metabolism.* 1-3

Su Z, Zimpelmann J y Burns KD. 2006. Angiotensin-(1–7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 69: 2212–2218.

Suzuki L. 1993. Rat angiotensin II Type (1A) Receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy.

Tabatabaie T, Vasquez-Weldon A, Moore DR, Kotake Y. 2003. Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes: beta-cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes.* 52(8):1994-1999.

Taniwaki H, Ishimura E, Kawagishi T, Matsumoto N, Hosoi M, Emoto E, Shoji T, Shoji S, Nakatani T, Inaba M, Nishizawa Y. 2003. Intrarenal Hemodynamic Changes After Captopril Test in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care,* 26:132-137.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. 2002. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care.* 25:S5-S20.

Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC, Vallon V. 2002. Ornithine decarboxylase, kidney size and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.*13:2611-2613.

Thomson SC, Vallon V y Blantz RC. 2003. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286: F8-F15.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson J, Valle T, Hämäläinen H, Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. 2001. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 344(18): 1343-1350.

Vallon V, Blantz RC, Thomson S. 1995. Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol*. 269:F876-F883.

Vallon V. 2003. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News physiol Sci*. 18:169-174.

Vlasenko RY y Kovot AV. 2007. Effector peptides of the renin-angiotensin system in the central mechanisms of acquired and innate behavior in thirst rats. *Neuroscience and behavioral physiology*. 37(3): 263-270.

Wang GG, Lu XH, Li W, Zhao X, Zhang C. 2011. Protective effects of Luteolin on Diabetic Nephropathy in STZ-Induced diabetic rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1-7.

Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD. 2001. Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT<sub>2</sub> receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 280: 254-265.

Wolf G. 2002. Molecular Mechanism of Diabetic Mesangial Cell Hypertrophy: A Proliferation of Novel Factors. *J. Am. Soc. Nephrol*. 13:2611-2613.

Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN. 1993. Angiotensin II-induced Hypertrophy of Culture Murine Proximal Tubular Cells Is Mediated By Endogenous Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J Clin Invest*. 92:1366-1372.

Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RAK, Thaiss F. 2002. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B through AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Kidney International*. 61:1986-1995

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

Xu F, Mao C, Liu Y, Wu L, Xu Z y Zhang L. 2009. Losartan Chemistry and its effects via AT<sub>1</sub> Mechanisms in the Kidney. *Curr Med Chem*. 16(28):3701

Yarger WE, Schocken DD y Harris RH. 1980. Obstructive Nephropathy in the Rat. Possible roles for the Renin-Angiotensin System, prostaglandins and thromboxanes in postobstructive renal function. *J. Clin. Invest.* 65: 400-412.

Yuan BH, Robinette JB y Conger JD. 1990. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 258: F741-F750.

Zimpelmann J. Kumar D, Levine D, Wehbi G, Imig J, Navar L y Burns K. 2000. *Kidney international.* 58:2320-2330.

Ziyadeh FN. 1993. The extracelular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 22:736-744.

Promedio $\pm$ error estandar de los parametros medidos							
Parámetro	Control	Diabética	C+Losartán	D+Losartán	C+Captopril	D+Captopril	
<b>Glucemia 0</b>	81 $\pm$ 10.56	85.67 $\pm$ 6.43	90.66 $\pm$ 5.14	79.8 $\pm$ 2.13	81.4 $\pm$ 5.57	83.8 $\pm$ 5.27	
<b>Glucemia 48</b>	76 $\pm$ 6.96	422.3 $\pm$ 33.14	76.6 $\pm$ 2.42	295.2 $\pm$ 37	100.8 $\pm$ 2.41	357.6 $\pm$ 30.93	
<b>Glucemia 7</b>	68.4 $\pm$ 4.27	463.4 $\pm$ 9.14	81.6 $\pm$ 5.2	426.4 $\pm$ 45.6	98.2 $\pm$ 3.73	347.8 $\pm$ 28.8	
<b>Consumo de agua</b>	29 $\pm$ 4.7	161.45 $\pm$ 11.53	72.9 $\pm$ 5.7	103.14 $\pm$ 8.95	41.3 $\pm$ 1.98	158.6 $\pm$ 10.82	
<b>Consumo de alimento</b>	12.52 $\pm$ 1.3	27.11 $\pm$ 2.02	19.97 $\pm$ 2.64	22.57 $\pm$ 1.22	15.46 $\pm$ 1.4	24.71 $\pm$ 2.19	
<b>Volumen urinario</b>	7.35 $\pm$ 1.4	118.5 $\pm$ 16.5	6.96 $\pm$ 1.14	70.86 $\pm$ 6.27	9.16 $\pm$ 2.63	106 $\pm$ 13.55	
<b>Peso 0</b>	293.66 $\pm$ 5.2	244.67 $\pm$ 3.13	228.3 $\pm$ 4.44	218.5 $\pm$ 3.27	246.16 $\pm$ 3.81	247 $\pm$ 4.68	
<b>Peso 48</b>	242.16 $\pm$ 8.38	229.5 $\pm$ 3.82	234 $\pm$ 4.66	239.83 $\pm$ 3.65	260.67 $\pm$ 2.67	239 $\pm$ 7.86	
<b>Peso 7</b>	260.3 $\pm$ 10.78	204.8 $\pm$ 8.15	244.3 $\pm$ 10.55	233.67 $\pm$ 7	272.67 $\pm$ 4.7	196 $\pm$ 19.3	
<b>Peso renal</b>	0.32 $\pm$ 0.01	0.394 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.009	0.39 $\pm$ 0.01	0.308 $\pm$ 0.007	0.46 $\pm$ 0.03	
<b>Proteinuria</b>	15.36 $\pm$ 2.36	42.52 $\pm$ 5.34	15.39 $\pm$ 1.48	26.7 $\pm$ 8.36	11.17 $\pm$ 2.48	33.71 $\pm$ 3.28	
<b>Cociente DNA/Proteínas</b>	0.08 $\pm$ 0.009	0.111 $\pm$ 0.01	0.109 $\pm$ 0.014	0.106 $\pm$ 0.005	0.075 $\pm$ 0.013	0.151 $\pm$ 0.013	
<b>Creatinina</b>	0.054 $\pm$ 0.0012	1.52 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.1	0.16 $\pm$ 0.013	0.17 $\pm$ 0.023	0.11 $\pm$ 0.008	

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1. Técnica histológica

Posterior a la fijación en paraformaldehído (4%), los riñones fueron almacenados hasta su procesamiento. Las muestras fueron lavadas y deshidratadas con histoquinete a temperatura ambiente de la siguiente manera: 1) Dos cambios de una hora en etanol al 70%, 2) Una hora en etanol al 80%, 3) Dos cambios de una hora en etanol al 90%, 4) Dos cambios de una hora en etanol al 96%, 5) Dos cambios de una hora en alcohol absoluto, 6) Dos cambios de una hora en una mezcla etanol-xileno (50:50), 7) Dos cambios de una hora en xileno. Posteriormente la muestra fue impregnada de parafina en una estufa bacteriológica, después de lo cual la pieza fue incluida en parafina utilizando para ello las escuadras de Leuckat. Una vez hechos los bloques se enfriaron rápidamente y se cortaron con un micrótopo, dándoles forma de trapecio. Se expuso totalmente la pieza y se realizaron los cortes de 5  $\mu\text{m}$  cuidando que las cuchillas estuvieran limpias, aceitadas y bien afiladas. Para montar los cortes se usó un baño circular con control termostático a una temperatura de entre 40 y 50  $^{\circ}\text{C}$ . Los cortes fueron depositados en el portaobjetos agregándoles unas gotas de etanol al 70% para extenderlos. Los portaobjetos fueron secados en una estufa bacteriológica y se procedió a la aplicación de la técnica de tinción Eosina-Hematoxina. Para su conservación se fijó el cubreobjetos con una resina sintética. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico y el área de las células del túbulo proximal fue medida con el software Motic Images Plus 2.0 ML.

### APÉNDICE 2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la curva de calibración se utilizaron las siguientes concentraciones:

Pozo	PBS (1X)	Albúmina	Reactivo
------	----------	----------	----------

		(0.1 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ ) 1)	Bradford
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 $\mu\text{l}$ de muestra	40

Una vez agregado el reactivo Bradford se mezclaron y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Los datos obtenidos de la curva de calibración se graficaron contra la concentración de la misma y se hizo la regresión lineal y así se determinó la concentración de proteína en la médula y corteza de los diferentes organismos.

### **APÉNDICE 3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.**

Para la curva de calibración se utilizaron las siguientes concentraciones:

Número de tubo	$\mu\text{g}$ de proteína	$\mu\text{L}$ de albúmina (1mg mL <sup>-1</sup> )	Volumen de agua	Volumen final
1	0	0	200	200
2	5	10	190	200
3	10	20	180	200
4	15	30	170	200
5	20	40	160	200
6	30	60	140	200
7	35	70	130	200
8	40	80	120	200

9	45	90	110	200
10	50	100	100	200

Las muestras fueron diluidas 1:50 y se realizaron por duplicado. A cada tubo se le agregó 1 mL de solución C y se incubaron 10 min. Posteriormente se les agregó 100µL de la solución Folin 1N se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Se leyó la absorbancia a 750nm.

Los datos obtenidos de la curva de calibración se graficaron contra la concentración de la misma y se hizo la regresión lineal y así se determinó la concentración de proteína en corteza.

#### **APÉNDICE 4. Preparación de geles para electroforesis**

(Para dos geles)

1) Gel de electroforesis (Gel de separación)

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

2) Gel de concentración

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

