



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Expresión y Actividad de la Esfingomielinasa neutral en el riñón de ratas diabéticas”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
PÉREZ VILLAVICENCIO ROXANA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ

ASESOR INTERNO
QFB. LILIA TEQUIANES BRAVO

Ciudad de México, 2019



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.



AGRADECIMIENTOS

A la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA** por brindarme la oportunidad de formar parte de la máxima casa de estudios, por darme el apoyo, conocimientos y todas las herramientas para formarme como profesionista.

Al **INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHAVEZ**, por el apoyo brindado al proyecto "Contribución de la ceramidasa, esfingosin cinasa y receptores a esfingosina 1-fosfato en la regulación del tono vascular renal y su posible uso como marcadores de disfunción endotelial en la diabetes". Proyecto de investigación del cual formo parte mi proyecto de tesis de licenciatura.

A la **Dra. María del Rocio Bautista Pérez del INC**, por la oportunidad brindada, la confianza, el apoyo, la paciencia, el tiempo, recursos, la crítica y el estímulo que depositó en mí que contribuyeron a mi formación académica.

Al **Dr. Oscar Pérez Mendez del INC**, por la oportunidad brindada, la confianza y el apoyo brindado durante este tiempo.

A **Daniela Rodríguez Montaña de la Unidad de Histología del Instituto De Fisiología Celular de la UNAM**, por su asistencia técnica en el trabajo de histología.



DEDICATORIAS

“El esfuerzo, la constancia y perseverancia son piezas importantes en el éxito de una persona. Sin embargo, el apoyo incondicional y las palabras de aliento de familiares y amigos en cada tramo del camino son fundamentales. Es por eso que esta Tesis quiero dedicarla a:

A mi madre María Teresa de Jesús Villavicencio, por su esfuerzo, su confianza en mi, su motivación, por escucharme, por su contribución en mi formación personal y académica, pero sobre todo por su amor y apoyo incondicional.

A mi padre José de Jesús Adolfo Pérez, por su esfuerzo, sus palabras de superación, sus ideales que contribuyeron en mi formación personal y sustentan gran parte de mis principios.

A mi novio Juan Tomás Cruz, por su motivación constante, su apoyo incondicional, comprensión, consejos, regaños, por escuchar y estar a mi lado en cada una de mis tristezas, alegrías, quejas y logros, por su cariño, paciencia y sobre todo por su amor.

A Monserrat Jaimes, Giovanna Martínez, Daniela Ovando y Karla Peredo por todos los momentos que han estado conmigo apoyandome, aconsejandome, escuchandome.

A mi familia y amigos por todo el apoyo incondicional.

Gracias”



*“Yo creo que la verdad es perfecta para
las matemáticas, la química, la filosofía,
pero no para la vida. En la vida, la
ilusión, la imaginación, el deseo y la
esperanza cuentan más”*

Anónimo



ÍNDICE

ÍNDICE	4
1. ABREVIATURAS	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1 ESFINGOLIPIDOS.....	8
3.2 DIABETES MELLITUS	10
3.2.1 Diabetes Mellitus Tipo I.....	10
3.2.2 Diabetes Mellitus Tipo II.....	13
3.2.3 Diabetes Mellitus debido a otros mecanismos específicos o enfermedades	14
3.2.4 Diabetes Mellitus Gestacional.....	15
3.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS.....	15
3.4 ETAPAS EVOLUTIVAS DE LA NEFROPATIA DIABETICA	16
3.5 PARTICIPACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA FISIOPATOLOGIA RENAL	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	23
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS	25
8.1 MODELO DE DIABETES	26
8.2 MÉTODO: MODELO DE DIABETES	27
8.3 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	28
8.4 DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA (SM).....	28
8.5 DETERMINACIÓN DE CERAMIDA (CER)	30
8.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	31
8.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ESFINGOMIELINASA (SMasa)	32
8.8 TINCIONES HISTOLÓGICAS	33
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
10. RESULTADOS	36
11. DISCUSIÓN	48
12. RESUMEN DE RESULTADOS.....	58
13. CONCLUSION	59
14. REFERENCIAS	60



1. ABREVIATURAS.

αGBM	Anticuerpos antimembrana basal glomerular
aCDasa	Ceramidasa ácida
ADA	Asociación Americana de Diabetes
aSMasa	Esfingomielinasa ácida
BSA	Albúmina de suero bovino
C1P	Ceramida-1-fosfato
CDasas	Ceramidasas
CER	Ceramida
CER sintasa	Ceramida sintasa
CMH	Ceramida Monohexosido
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo I
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMID	Diabetes Mellitus insulino dependiente
EUA	Excreción Urinaria de Albúmina
Glu-Cer	Glucosilceramida
Hcys	Homocisteina
hHcys	Hiperhomocisteinemia
H&E	Hematoxilina & Eosina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Insuficiencia Renal
I/R	Isquemia/reperfusión



MALDI-MSI	Imágenes de Espectrometría de Masas de Desorción/Ionización por Láser Asistidas por Matriz
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de monocitos 1
MODY	Diabetes del adulto de inicio juvenil
nCDasa	Ceramidasa neutral
ND	Nefropatía Diabética
NO	Óxido Nítrico
nSMasa	Esfingomielinasa neutral
PAS	Peryódico de Schiff
PBS	Amortiguador de fosfatos
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SM	Esfingomielina
SMasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa
Sp	Esfingosina
SphK	Esfingosina cinasa
SPT	Serina Palmitol Tranferasa
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad



2. INTRODUCCIÓN.

Durante muchos años, los esfingolípidos fueron considerados componentes de las membranas biológicas con función exclusivamente estructural. Sin embargo, actualmente se han caracterizado como componentes funcionales y dinámicos que intervienen en la transducción de señales y regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas llamados “lipidrafts”. Consecuentemente, la biología de los esfingolípidos se ha convertido en un blanco importante para la investigación en la señalización celular.

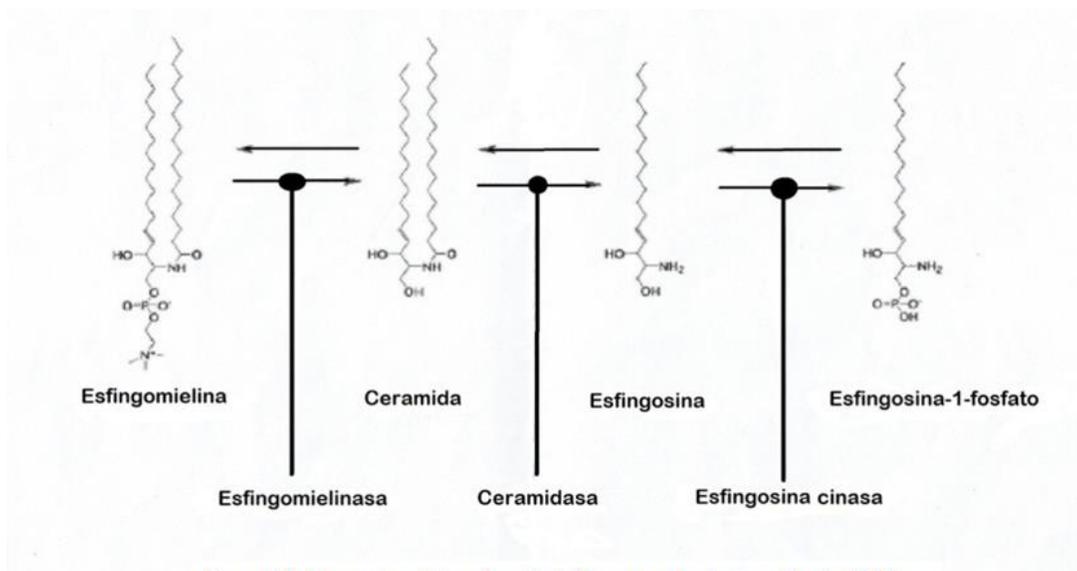
Los esfingolípidos también actúan como segundos mensajeros intracelulares implicados en la regulación de procesos celulares como: la diferenciación, crecimiento, la apoptosis o la inmunidad innata y adquirida. Estudios recientes sugieren que modificaciones en la concentración de ceramida en diferentes tejidos, contribuye en la fisiopatología de enfermedades como la diabetes mellitus. La ceramida es formada a través de diferentes vías metabólicas: la 1) síntesis de Novo; 2) acilación de la esfingosina y 3) hidrólisis de esfingomielina (SM). En cada una de estas vías metabólicas, es necesaria la presencia de distintos sustratos y enzimas, de ambos se desconoce su contribución fisiopatológica. La esfingomielinasa neutral (nSMasa) es una enzima que participa en la hidrólisis de SM y contribuye con la formación de ceramida en condiciones fisiológicas, sin embargo, no se ha estudiado su actividad así como su expresión en el riñón en condiciones fisiopatológicas. Por lo anterior, es importante estudiar si la nSMasa contribuye con la formación de ceramida durante la diabetes, lo cual permitirá

proponer alternativas en el tratamiento de esta patología y a su vez retardar el desarrollo de las complicaciones en la diabetes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ESFINGOLÍPIDOS

Las principales moléculas derivadas de los esfingolípidos que intervienen en la transducción de señales son: ceramida (CER), ceramida-1-fosfato (C1P), esfingosina (Sp) y esfingosina-1-fosfato (S1P). La vía catabólica para la formación de estas moléculas bioactivas se lleva a cabo como se describe a continuación: La esfingomielinasa (SMasa) hidroliza a los esfingolípidos y libera CER. La CER puede ser fosforilada por la ceramida cinasa o puede ser hidrolizada por la ceramidasa (CDasa), para formar C1P y Sp respectivamente. A su vez, la Sp es fosforilada por la esfingosina cinasa (SphK) para formar S1P¹ (figura 1).





En el catabolismo de los esfingolípidos, las SMasas, son enzimas clave para que se desencadene la ruta metabólica. Hay cinco tipos de SMasas: la esfingomielinasa ácida (aSMasa) lisosomal, la aSMasa dependiente de Zn^{+2} presente en el suero, la esfingomielinasa neutral (nSMasa) dependiente de Mg^{+2} que se encuentra unida a la membrana, la nSMasa independiente de Mg^{+2} y la SMasa alcalina.^{2,3} Entre las SMasas, las más estudiadas son las aSMasas y las nSMasas. Ambas pueden ser activadas por el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF- α).

La aSMasa actúa a un pH óptimo de 4.5 y 5.5, sin embargo, el aumento en el pH parece afectar solo la afinidad del sustrato y no la actividad de la enzima.⁴ Además de la SM de membrana, puede hidrolizar la SM de las lipoproteínas aterogénicas, a pH neutro o ligeramente ácido.^{5,6}

Respecto a la nSMasa dependiente de Mg^{+2} actúa a un pH óptimo de 7.4, específicamente hidroliza SM. La actividad de la enzima puede depender de Mg^{+2} o Mn^{+2} .⁷

Las alteraciones en el catabolismo de los esfingolípidos tienen implicaciones patológicas. Con respecto a esto, se ha estudiado que si disminuye la actividad de las enzimas y aumenta la concentración de los sustratos esto afecta el metabolismo de los esfingolípidos y contribuye en la fisiopatología de enfermedades como la diabetes.⁸



3.2 DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos, cuya característica principal es la hiperglucemia de manera persistente o crónica, debido, a un defecto en la producción de insulina, a una resistencia a la acción de ella para utilizar la glucosa, a un aumento en la producción de glucosa o a una combinación de estas causas. También se acompaña de anomalías en el metabolismo de los lípidos, proteínas, sales minerales y electrolitos.⁹

La diabetes mellitus se clasifica en: 1) Diabetes mellitus tipo I; 2) Diabetes mellitus tipo II; 3) Diabetes mellitus debido a otros mecanismos específicos o enfermedades; 4) Diabetes mellitus gestacional.⁹

3.2.1 Diabetes Mellitus Tipo I

La Diabetes Mellitus tipo I (DM1), corresponde a la llamada antiguamente diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), diabetes de comienzo juvenil o diabetes infantojuvenil. En este tipo de diabetes no se observa producción de insulina, debido a la destrucción de las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas, (en la figura 2 se muestra el mecanismo de secreción de insulina en condiciones fisiológicas).

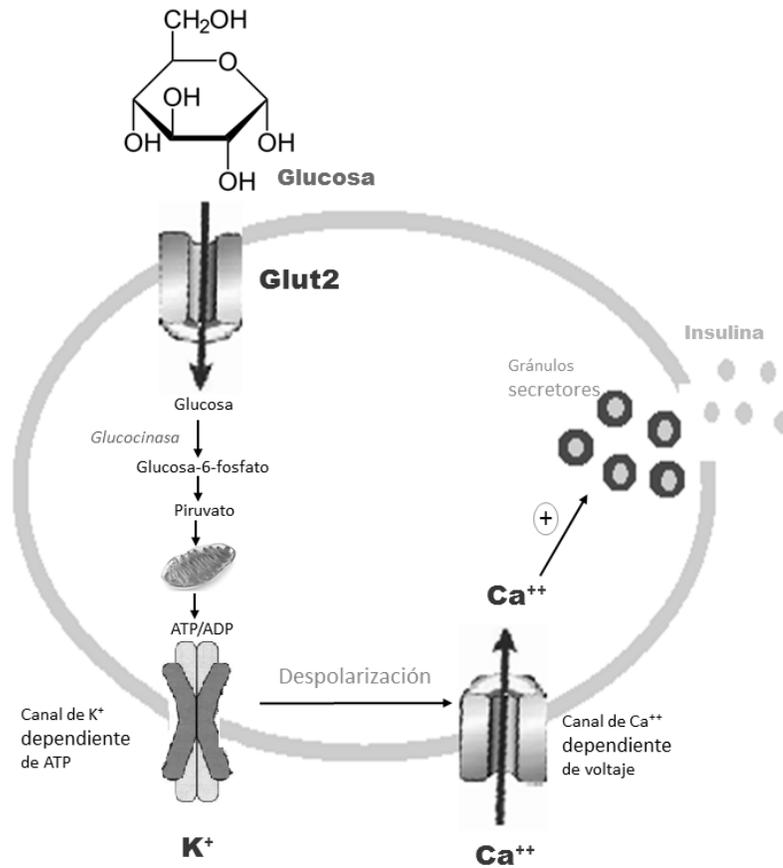


Figura 2. Mecanismo de secreción de Insulina. La glucosa entra al interior de las células β a través del transportador GLUT2, la glucosa es fosforilada por la enzima Glucocinasa a Glucosa-6-P, ésta es oxidada por el proceso de glucólisis a piruvato. El piruvato es el sustrato para la síntesis de Acetil CoA. El Acetil CoA es transportado a la matriz mitocondrial, donde es utilizado en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria asociada a la fosforilación oxidativa impulsando la síntesis de ATP. El ATP inhibe los canales K^+ dependientes de ATP, lo que ocasiona la despolarización de la membrana y apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Las altas concentraciones de ATP y Ca^{2+} intracelular activan al citoesqueleto, promoviendo la formación de los cilios contráctiles que permiten la traslocación de los gránulos secretores de insulina desde el aparato de Golgi hasta la membrana celular donde se fusionan a ésta y mediante exocitosis liberan la hormona hacia la circulación.

En los pacientes con DMI, las células α del páncreas son funcionales, ellos pueden producir glucagón y por lo tanto realizan la glucogenólisis. Los pacientes no presentan problemas para sintetizar glucosa por medio de la gluconeogénesis. Sin embargo, la baja producción de insulina trae como consecuencia una disminución del número de transportadores de glucosa Glut 4 en el músculo esquelético



y en las células adiposas. El resultado es una hiperglucemia persistente después de la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos. Es decir, el organismo del diabético responde ante los bajos niveles de glucosa en las células dependientes de insulina, como si estuviera en un estado de ayuno prolongado o inanición, movilizándolo sus reservas de lípidos y proteínas para obtener la glucosa, lo cual agrava la hiperglucemia. En el caso del tejido adiposo, se promueve una rápida movilización de triglicéridos, lo cual incrementa su hidrólisis en ácidos grasos libres y glicerol que son transportados por lipoproteínas plasmáticas hacia varios tejidos, incluyendo al hígado. En el hígado, una gran cantidad de ácidos grasos se emplean para la síntesis de lipoproteínas (hiperlipidemia) y el resto se degradan hasta acetil-CoA. El exceso de acetil-CoA que no puede ser incorporada al ciclo del Krebs (ácido cítrico), es utilizado para síntesis de cuerpos cetónicos: ácido β -Hidroxi-butírico, acetoacetato y acetona. Las altas concentraciones de cuerpos cetónicos consumen progresivamente las reservas alcalinas, desencadenando una acidosis metabólica. Debido a que la insulina interviene en la captación de los triglicéridos en las células, una secreción deficiente de esta hormona se relaciona con la hipertrigliceridemia característica en estos pacientes. La ausencia de insulina disminuye la entrada de los aminoácidos a las células musculares, lo que incrementa el catabolismo de sus proteínas. Los aminoácidos glucogénicos liberados por la proteólisis quedan disponibles para la gluconeogénesis hepática lo que genera un balance



negativo del nitrógeno, que conduce al agotamiento de las proteínas y al desgaste tisular.⁹

3.2.2 Diabetes Mellitus Tipo II

La Diabetes Mellitus tipo II (DM2) representa entre un 90 a un 95% de las diabetes. En la DM2, el paciente sintetiza la insulina en forma normal, sin embargo, no puede utilizarla para la regulación del metabolismo de la glucosa, aminoácidos y lípidos. Esta situación puede ser consecuencia de:

- A. Defectos en la estructura de la insulina.
- B. Disminución en el número de receptores de la insulina o en su afinidad por la hormona.
- C. Producción insuficiente de insulina por las células β que pueda superar la resistencia.

La resistencia a la insulina es muy común en individuos obesos; se ha demostrado que el número de receptores para la insulina está disminuido en personas obesas. Por otra parte, el aumento de la grasa visceral se ha relacionado con el aumento de la producción de la resistina y de citocinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), estos pueden bloquear la cascada de señalización de la insulina, disminuyendo el número de transportadores de la glucosa Glut 4. La respuesta del organismo frente a estos eventos es aumentar la secreción de la insulina, es por esto que los pacientes suelen



presentar hiperinsulinemia. La glucosa proveniente de la glucogenólisis hepática, no puede ser utilizada por las células musculares y adiposas, esto debido a la resistencia a la insulina. El metabolismo hepático favorece la síntesis de lípidos a partir del glicerol y de los ácidos grasos que provienen de la dieta o de las reservas del tejido adiposo, lo que favorece el desarrollo de un hígado graso. Los triglicéridos, que son liberados a la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), se van acumulando, lo que favorece la hipertrigliceridemia.⁹

3.2.3 Diabetes Mellitus debido a otros mecanismos específicos o enfermedades

Esta categoría se divide en:

A) Diabetes Mellitus con anormalidades genéticas identificadas: con el reciente progreso en tecnología genética, varias anormalidades genéticas han sido identificadas como causa de diabetes mellitus. Se dividen en:

- 1) Anormalidades genéticas relacionadas a la función de células β -pancreáticas.
- 2) Anormalidades genéticas relacionadas a mecanismos de acción de la insulina.¹⁰⁻¹⁵

B) Varios tipos de diabetes asociados con otras enfermedades y condiciones: algunas enfermedades, síndromes y condiciones pueden ser acompañados de un estado diabético y han sido llamadas “diabetes secundarias”.¹⁶



3.2.4 Diabetes Mellitus Gestacional.

La etiología probablemente es como el mecanismo en la DM1 y DM2, desencadenando la manifestación de una alteración en el metabolismo de la glucosa debido al embarazo. Por su importancia clínica, la necesidad de una consideración especial y características diferentes de la diabetes en ausencia de embarazo, es tratada en una categoría diferente.

Un trastorno en el metabolismo de la glucosa durante el embarazo puede ejercer una influencia significativa en el bebé y la madre, además, los trastornos son reversibles después del parto, pero el riesgo para la madre de desarrollar diabetes mellitus tipo II en el futuro aumenta.¹⁶

3.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Con el paso del tiempo, quienes tienen diabetes presentan complicaciones que pueden ser **macrovasculares** (lesiones de vasos sanguíneos grandes) y **microvasculares** (lesiones de los vasos sanguíneos pequeños). En las macrovasculares se encuentran enfermedades cardiovasculares como los ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores. En las **microvasculares** se encuentran las lesiones oculares (**retinopatía**) que desembocan en la ceguera, lesiones de los nervios (**neuropatías**), pie diabético que puede llegar a la amputación como consecuencia de infecciones graves, y lesiones renales como la **nefropatía diabética** (ND) que desencadenan insuficiencia renal.



La insuficiencia renal (IR) se produce cuando los riñones no son capaces de filtrar adecuadamente las toxinas y otras sustancias de desecho de la sangre. Fisiológicamente, la insuficiencia renal se describe como una disminución en el flujo plasmático renal, lo que se manifiesta en una presencia elevada de productos nitrogenados en la sangre como la urea y la creatinina, que puede acompañarse o no de oliguria. Actualmente en nuestro país la etiología más frecuente es la diabetes mellitus, siendo responsable del 50% de los casos de enfermedad renal, seguida por la hipertensión arterial y las glomerulonefritis.¹⁷⁻¹⁹

3.4 ETAPAS EVOLUTIVAS DE LA NEFROPATIA DIABETICA

Se han desarrollado muchas clasificaciones de las etapas evolutivas de la ND. De todas ellas la más aceptada es la de Mongenssen, destinada a la DM1, en la que se presentan cambios estructurales y funcionales (figura 3). En la clasificación de Mongenssen se distinguen 5 etapas:^{20,21}

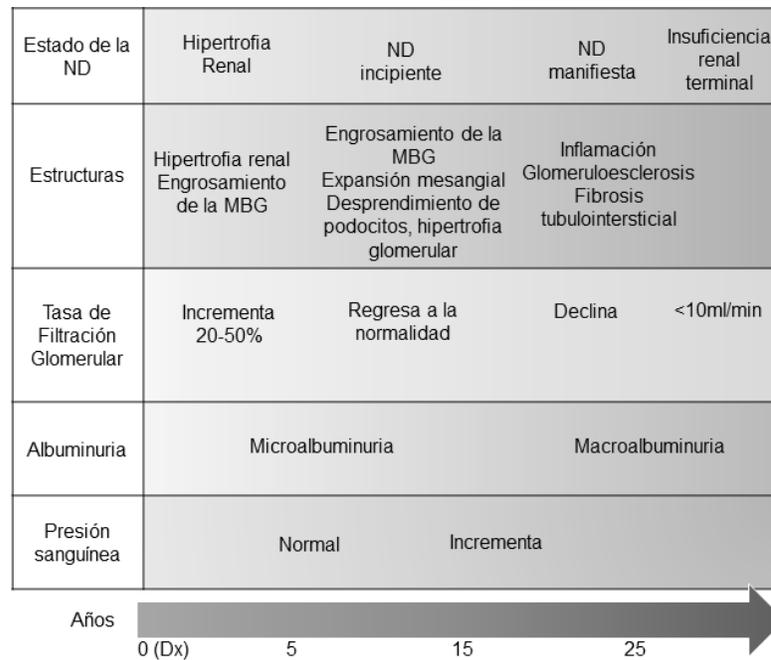


Figura 3: Evolución de la Nefropatía Diabética y cambios renales en la diabetes tipo 1. La diabetes tipo 2 puede no seguir este curso.

Etapa I: No provoca síntomas. Existe hipertrofia e hiperfiltración glomerular. Los análisis de orina y creatinina son normales. Tampoco hay alteraciones histológicas.

Etapa II: Lesiones estructurales con excreción urinaria de albúmina (EUA) normal. Esta etapa es silenciosa, se caracteriza por normoalbuminuria independientemente de la duración de la diabetes. Histológicamente se aprecian alteraciones mínimas en el glomérulo como inicio de engrosamiento de membranas basales o ligero aumento de la matriz mesangial.

Etapa III: Nefropatía diabética incipiente. Esta etapa se caracteriza por microalbuminuria (30 a 300 mg/dL) persistente. Se van desarrollando lesiones estructurales (expansión mesangial y de las membranas basales), con filtrado glomerular conservado, aunque al final comienza a declinar. La creatinina en



sangre es normal. La hipertensión arterial asociada puede empeorar la lesión renal.

Etapa IV: Proteinuria persistente (más de 300 mg/dL), disminución de la función renal. Creatinina sérica en límites altos de lo normal o elevados. La hipertensión es frecuente y aumenta con el tiempo que declina el filtrado glomerular. La proteinuria es creciente y cuando supera los 3 g/día aparece el síndrome nefrótico con hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia. Histológicamente se aprecia glomerulosclerosis parcheada, engrosamiento de membranas basales y expansión mesangial. La nefropatía manifiesta se asocia frecuentemente a retinopatía severa, neuropatía y vasculopatía periférica y coronaria.

Etapa V: Insuficiencia renal terminal. Se caracteriza por la caída del filtrado glomerular, hipertensión arterial con renina baja, disminución de la proteinuria y deterioro progresivo de la función renal hasta la insuficiencia renal terminal. Creatinina mayor de 200 $\mu\text{mol/L}$ o 2.2 mg/dl. Histológicamente puede existir glomerulosclerosis nodular, difusa y exudativa que desembocan en hialinosis con el cierre glomerular total, fibrosis intersticial, atrofia tubular.^{20,21}

3.5 PARTICIPACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA FISIOPATOLOGÍA RENAL

Estudios experimentales y clínicos han descrito que cambios en la actividad enzimática o en la concentración de los metabolitos involucrados en el



metabolismo de los esfingolípidos contribuyen en la fisiopatología de la obesidad, hipertensión, diabetes mellitus e insuficiencia renal.²²

En condiciones fisiológicas, se ha reportado que la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de los esfingolípidos se modifica con respecto a la edad. Así, en la corteza renal aumenta la actividad de las enzimas catabólicas (aSMasa, nSMasa, aCDasa y nCDasa) así como la actividad de las enzimas anabólicas (CER sintasa y SMS). De las enzimas catabólicas, la actividad de las isoformas neutrales (nSMasa y nCDasa) es mayor en comparación con la actividad de las isoformas ácidas (aSMasa y aCDasa). Además, la actividad de las enzimas catabólicas es mayor que la actividad de las enzimas anabólicas, lo cual posiblemente contribuye en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares.²³

Se ha reportado que en el tejido adiposo de ratones obesos disminuye la concentración de SM y CER pero aumenta la concentración de Sp; mientras que en el plasma aumenta la concentración de SM, CER, Sp y S1P.²⁴ En el plasma de ratas hipertensas, aumenta la concentración de CER y Sp, sin embargo, la concentración de SM, C1P y S1P no se modifica, mientras que en el plasma de pacientes hipertensos solo aumenta la concentración de CER.²⁵

Por otro lado, se ha reportado que en el plasma de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) así como en ratones Ins2^{AKITA} (presentan una mutación en el gen 2 de la insulina) aumenta la concentración de S1P, este aumento fue más evidente en el modelo con STZ. Un resultado similar se observó en el corazón de ratones Ins2^{AKITA}. El tratamiento con insulina, disminuye la concentración de S1P. En el mismo estudio, se reportó que en el plasma de ratas



diabéticas inducidas con STZ aumenta la concentración de ceramida 16, ceramida 22 y ceramida 24, mientras que en el plasma de ratones *Ins2^{AKITA}* únicamente aumenta la concentración de ceramida 16, es posible que la diferencia esté relacionada con las características de cada modelo, las ratas diabéticas inducidas con STZ presentan hiperlipidemia, mientras que los ratones *Ins2^{AKITA}* tienen alto nivel de insulina en estado basal.²⁶

También se ha reportado que en la corteza renal de ratas diabéticas inducidas con STZ, aumenta la actividad de la enzima Serina Palmitoil Transferasa (SPT), sin embargo, la actividad de la aSMasa así como de la esfingomielina sintasa (SMS) no se modifica, el tratamiento con rapamicina disminuye sólo la actividad de la SPT. En el mismo estudio reportan que en la corteza renal de ratas diabéticas inducidas con STZ, aumenta la concentración de CER, CER monohexosido y SM, el tratamiento con rapamicina (inmunosupresor del sistema inmune) las disminuye, estos resultados sugieren que en el riñón de animales diabéticos la concentración de CER aumenta por la vía de novo y no por la vía catabólica.²⁷ De manera similar se ha reportado que en la corteza renal de ratas con hiperhomocisteinemia (hHcys), aumenta la concentración de ceramida, y el tratamiento con miriocina (inhibidor de la enzima SPT) la disminuye.²⁸

Además, en modelos experimentales de insuficiencia renal como: isquemia reperusión, miohemoglobinuria y nefritis, se han reportado cambios en la actividad enzimática, así como en la concentración de los metabolitos del metabolismo de los esfingolípidos, como a continuación se describe.

En la corteza renal de ratones a los que se les indujo 30 minutos, 90 minutos o 24 horas de isquemia seguida de reperusión (I/R), disminuye la actividad de la



aSMasa, así como de la nSMasa. Además, en túbulos proximales aislados de la corteza renal de ratones con I/R, disminuye la actividad de las SMasas. En la corteza renal de ratones con miohemoglobinuria también disminuye la actividad de las SMasas. Tanto en la I/R como en la miohemoglobinuria, la actividad de la aSMasa es mayor en comparación con la actividad de la nSMasa.

En contraste, en la corteza renal de ratas con nefritis (ocasionada por anticuerpos antimembrana basal glomerular (α GBM)) aumenta la actividad de las SMasas.²⁹

Tanto en la corteza renal de ratas con I/R, miohemoglobinuria así como en la nefritis aumenta la concentración de ceramida.^{26,29}

Sin embargo, se desconoce si en el riñón se modifica la expresión o actividad de la nSMasa, lo cual explicaría los cambios en la concentración de ceramida en patologías como la hipertensión, obesidad, insuficiencia renal y diabetes.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque México ha avanzado en la atención a la salud, aún falta mucho por hacer, en particular en el caso de las enfermedades crónicas, que son de las principales causas de muerte en el país. En el ámbito nacional, las cinco principales causas de muerte de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) son: tumores malignos, accidentes, enfermedades de hígado, enfermedades del corazón y diabetes mellitus. La diabetes, que es una enfermedad crónica de causas múltiples, en su etapa inicial no produce síntomas que cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto al corazón, ceguera, amputación de extremidades inferiores, insuficiencia renal y muerte prematura. La prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, esto con base a un diagnóstico previo de la enfermedad. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años.

De los órganos afectados por la diabetes, los riñones son los más perjudicados.

Actualmente, se desconoce si en el riñón se modifica la expresión o actividad de la nSMasa, lo cual explicaría los cambios en la concentración de ceramida en la diabetes.

Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta: ¿La actividad de la nSMasa se altera en el riñón de ratas diabéticas?



5. HIPÓTESIS

Considerando las evidencias científicas que demuestran que en el riñón de modelos diabéticos se modifica la concentración de ceramida, podemos suponer que si cambia la actividad o expresión de la nSMasa entonces también se modificará la concentración de esfingomielina (SM) y ceramida en la corteza y médula de riñón de ratas diabéticas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

- 6.1.1 Determinar la actividad de la esfingomielinasa neutral (nSMasa) en el riñón de ratas diabéticas.

6.2 Objetivos Específicos:

- 6.2.1 Determinar la concentración de esfingomielina (SM) en la corteza y médula renal de ratas diabéticas.
- 6.2.2 Determinar la concentración de ceramida (CER) en la corteza y médula renal de ratas diabéticas.
- 6.2.3 Determinar la actividad de la esfingomielinasa neutral (nSMasa) en la corteza y médula renal de ratas diabéticas.



7. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Tipo de estudio: Experimental

B. Población de estudio: Ratas wistar macho

C. Criterios de inclusión: Ratas wistar macho, peso de 250g a 300g, Ratas diabéticas con una concentración de glucosa en sangre ≥ 20 mmol/L (350mg/dL).

D. Criterios de exclusión: Alteraciones en la concentración de creatinina, urea y glucosa elevada en la medición basal.

E. Criterios de eliminación: Enfermedades respiratorias, gastrointestinales (parásitos) o alteraciones renales

F. Variables:

Dependiente: Cambios en la actividad de la nSMasa.

Independiente: Ratas sanas (control) y ratas con diabetes mellitus tipo 1.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

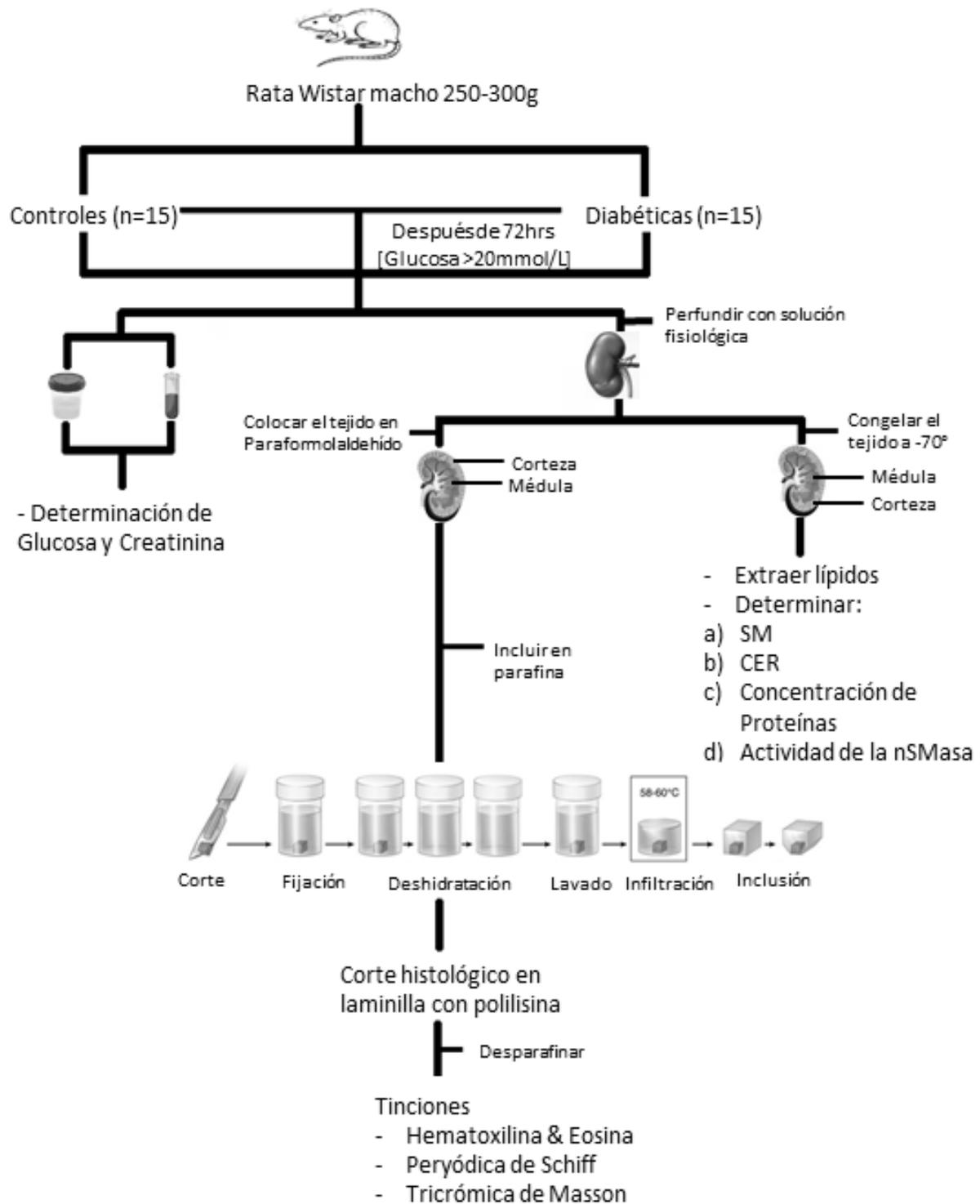


Figura 4. Diseño experimental

8.1 MODELO DE DIABETES

8.1.1 FUNDAMENTO DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE DIABETES CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

La STZ, entra en las células β por el transportador GLUT 2, la STZ es un donador de óxido nítrico (NO) el cual induce daño al DNA. El NO es liberado cuando la STZ es metabolizada dentro de la célula. La acción de la STZ dentro de la mitocondria provoca la formación de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la fragmentación del DNA y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria, provocando una disminución en la formación de ATP (figura 5).

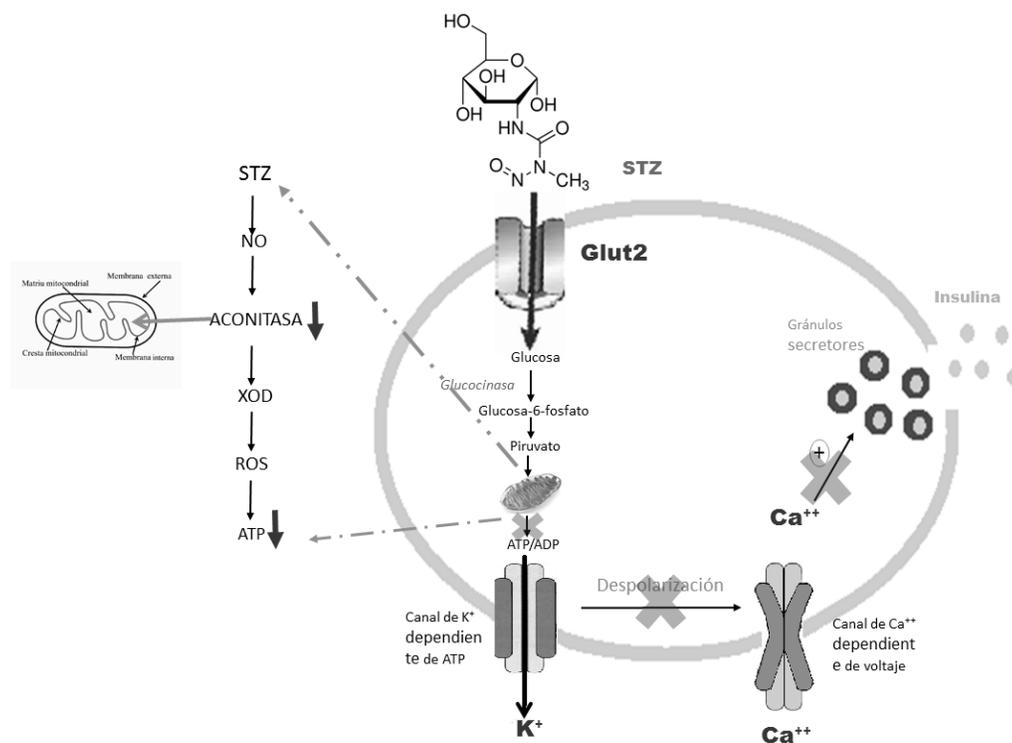


Figura 5. Mecanismo de acción de la STZ



8.2 MÉTODO: MODELO DE DIABETES

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 g de peso; se les administró 60 mg/Kg de STZ disuelta en buffer de citrato 0.1M pH 4.0 por vía intraperitoneal y a los animales del grupo control sólo se les administró buffer de citrato. Después de 72 horas se determinó la concentración de glucosa en sangre por el sistema Optimus Xceed (Abbott). Los animales con ≥ 20 mmol/L de glucosa se utilizaron para el estudio.³⁰ Después de 4 semanas se recolectó la orina de 24 horas y una muestra de sangre de las ratas para la determinación de glucosa y creatinina.

Posteriormente, se anestesiaron los animales de los grupos experimentales con pentobarbital sódico (35 mg/kg), se perfundieron los tejidos con 100 ml de solución fisiológica (2.5 mM CaCl_2 , 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4mM KCl, 116 mM NaCl, 26 mM NaHCO_3 , 1.2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y se removieron los riñones.

En un riñón, se realizó un corte longitudinal y se separó la médula de la corteza, ambos se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta que se usaron en las siguientes determinaciones:

- ✚ Extracción de lípidos.
- ✚ Determinación de Esfingomielina.
- ✚ Determinación de Ceramida.
- ✚ Determinación de Proteínas.
- ✚ Determinación de la actividad de la Esfingomielinasa neutral.



En el otro riñón también se realizó un corte longitudinal, se fijaron en paraformolaldehído al 4% y se llevó a cabo lo siguiente:

- ✚ Tinciones histológicas: Hematoxilina-Eosina, Ácido Peryódico de Schiff y Tricrómica de Masson.

8.3 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Para la extracción de lípidos se empleó el método descrito por Bligh y Dyer.³¹ Para 1 mL de muestra se adicionó 3.75 mL de cloroformo: metanol (CHCl_3 : MeOH) (1:2) y se homogenizo. Posteriormente se adicionó 1.25 mL de CHCl_3 y 1.25 mL de agua, se homogenizo, se centrifugo a 1000 rpm durante 5 minutos y se separó la fase orgánica en la que se determinó espectrofotométricamente la concentración de esfingomielina y de ceramida.³¹

8.4 DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA (SM)

Se preparó una disolución de esfingomielina (SM) a una concentración de 2 mg/mL en Tritón X-100 al 2% y se obtuvo una disolución Stock de SM. Se preparó una curva estándar de 0 a 5 mg/mL de SM. Se colocaron 10 μL de cada concentración de la curva estándar, así como 10 μL de las muestras en una microplaca. Para iniciar la reacción, se adicionaron 100 μL del amortiguador de reacción el cual contiene: Tris-HCl 5 mM, pH 8, CaCl_2 0.66 mM, 0.05 U de esfingomielinasa (SMasa), 1 U de fosfatasa alcalina, 0.05 U de colina oxidasa y 2 U de peroxidasa, DAOS y 4-aminoantipirina a una

concentración de 0.73 mM. La reacción se incubó durante 60 minutos y se determinó la concentración de SM mediante espectrofotometría. Se leyó la reacción a una longitud de onda de 595 nm³² (Figura 6).

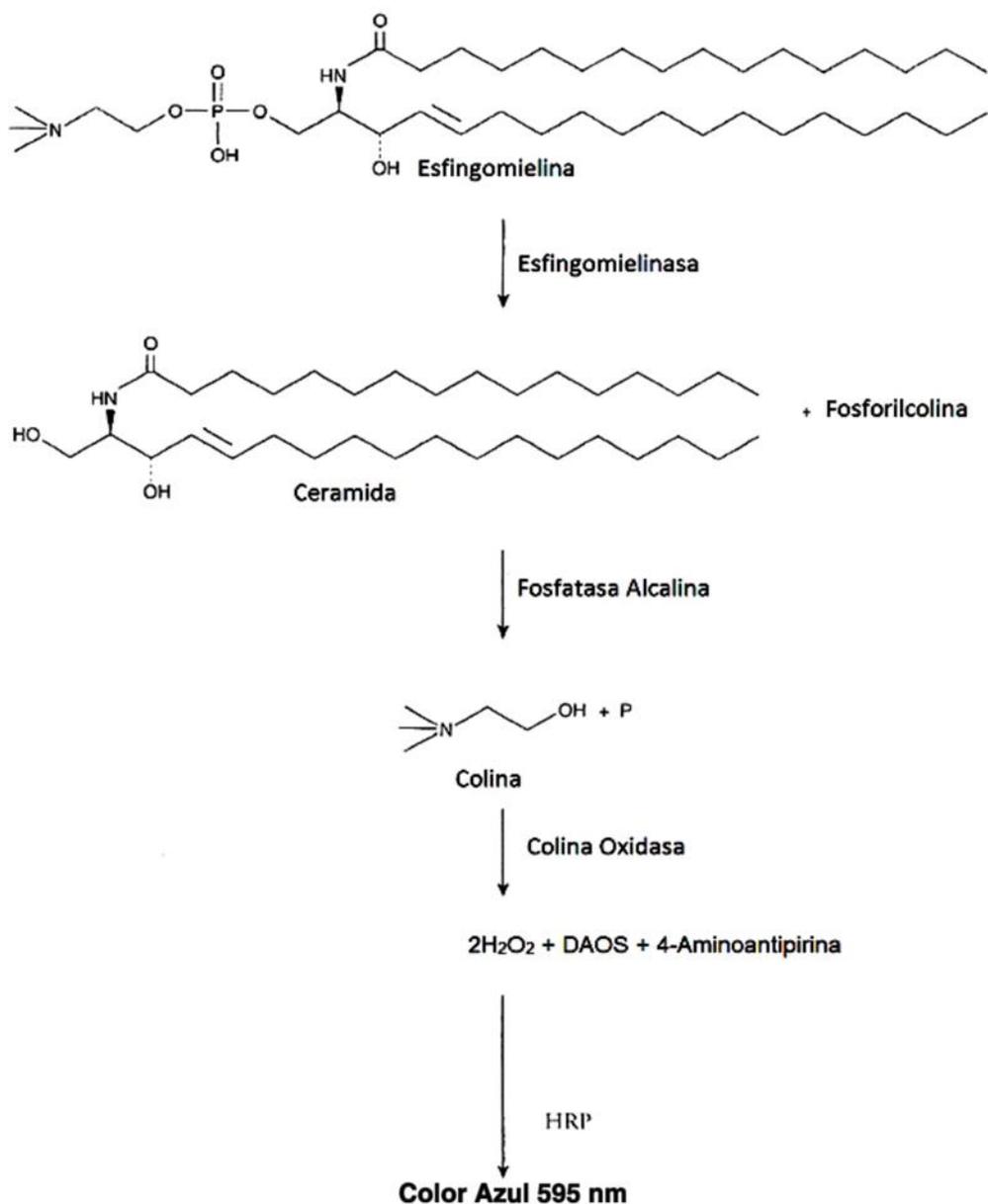


Figura 6. Determinación de Esfingomielina³²

8.5 DETERMINACIÓN DE CERAMIDA (CER)

Se colocaron 10 μL de la fase orgánica de la extracción de lípidos de cada muestra más 90 μL de metanol en una microplaca y se evaporó a 65°C . Posteriormente se bloqueó la reacción con albúmina de suero bovino al 3% (BSA) en amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.2 por 2 horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se incubó la muestra con el anticuerpo primario monoclonal contra ceramida (sigma) durante 1 hora y con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (goat anti-mouse IgG-HRP, santa cruz) por 1 hora más. Se adicionó 100 μL de TBM (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y se detuvo la reacción después de 10 minutos con H_2SO_4 4N. Se determinó la concentración de ceramida por espectrofotometría. Se leyó la reacción a una longitud de onda de 450 nm (Figura.7).

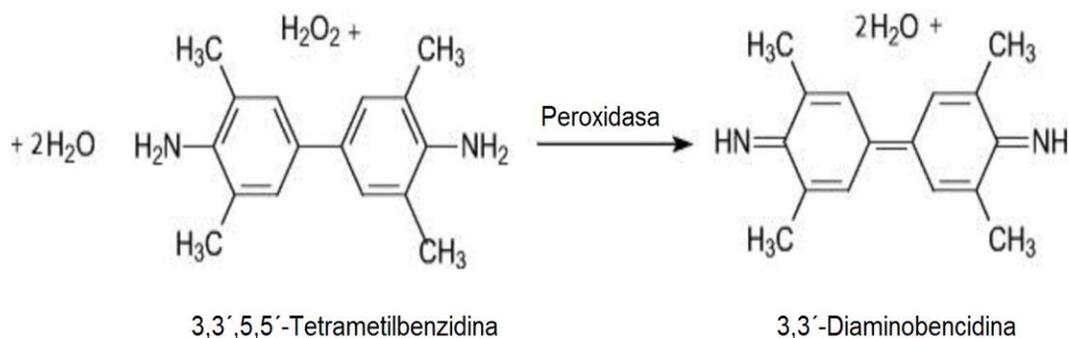


Figura 7. Determinación de ceramida

8.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se preparó una curva estándar de 0 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albúmina bovina. Se colocó en una microplaca 5 μL de cada concentración de la curva estándar así como de las muestras. Posteriormente se adicionó 250 μL de reactivo de Bradford. La reacción se incubó durante 10 minutos y se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría. Se leyó la reacción a una longitud de onda de 595 nm ³³ (Figura 8).

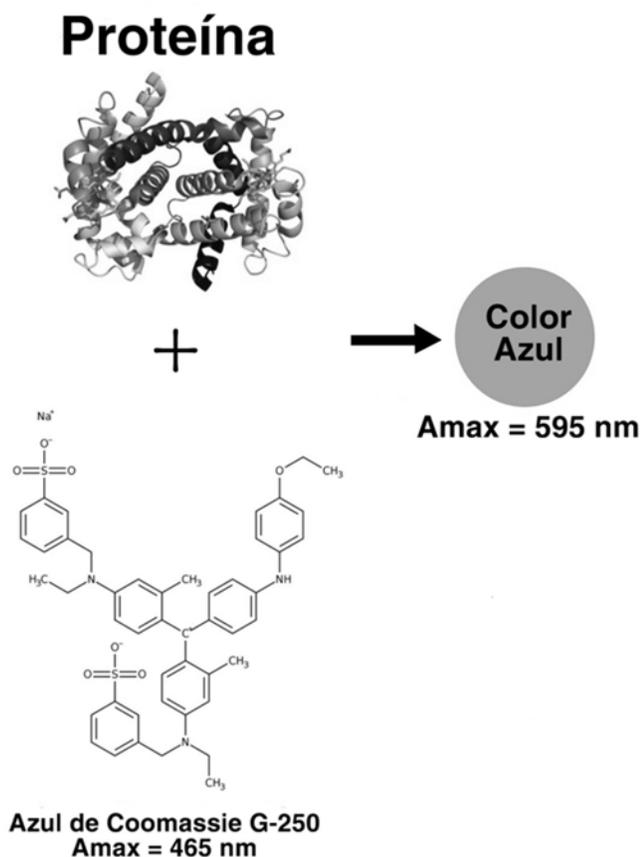


Figura 8. Determinación de Proteínas

8.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ESFINGOMIELINASA (SMasa)

En una microplaca, se colocaron 30 μg de proteína por muestra, 100 μL del amortiguador (Tris-HCl 0.5 M, MgCl_2 50 mM, pH 7.4), con 10 μM Amplex Red, 0.2 U peroxidasa, 0.02 U colina oxidasa, 0.8 U fosfatasa alcalina, 0.5 mM esfingomielina. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C protegiéndola de la luz. Se determinó la actividad de la SMasa por fluorescencia. Se leyó la reacción a una longitud de onda de 530 nm de excitación y 590 nm de emisión^{34,35} (figura 9).

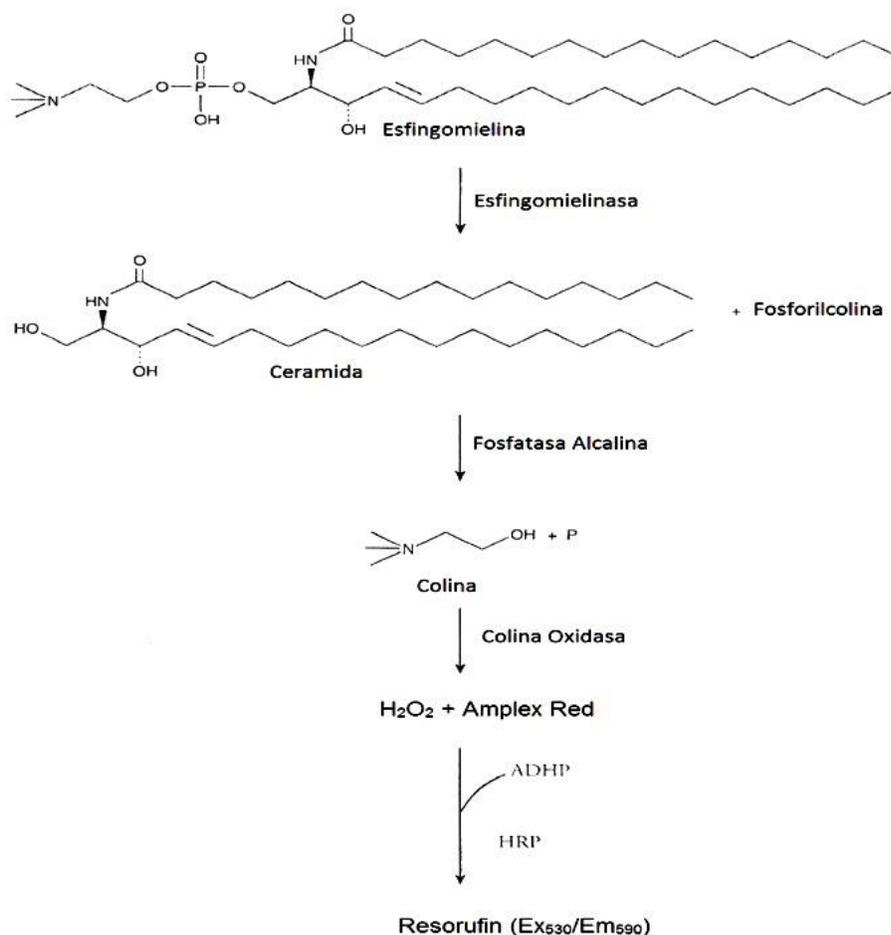


Figura 9. Determinación de la actividad de la SMasa³⁴



8.8 TINCIONES HISTOLÓGICAS.

Después de fijar los tejidos en paraformolaldehído al 4%, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3 μm de espesor y se colocaron en portaobjetos. Para desparafinar, los cortes se incubaron con xilol y se procedió a hidratar los tejidos con concentraciones decrecientes de etanol terminando con amortiguador de fosfatos. Posteriormente, se realizaron distintas tinciones: Hematoxilina & Eosina (H&E), Peryódico de Schiff (PAS) y Tricrómico de Masson.

8.8.1 Tinción de H&E

Después de desparafinar los tejidos, se procedió a lavar las laminillas con agua destilada durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en un recipiente con hematoxilina de Mayer (0.1 g de Hematoxilina cristalizada, 5 g de Sulfato aluminicopotásico, 0.02 g de Yodato de sodio, 0.1 g de Ácido cítrico, 5 g de Hidrato de cloral en 100 mL de agua destilada) por 10 minutos. Los tejidos se lavaron nuevamente con agua destilada durante 15 minutos y se colocaron en un recipiente con Eosina al 0.2% con agua destilada por 2 minutos, finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno. Las laminillas teñidas se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se sellaron con medio de montaje y se examinaron con un microscopio Nikon.



8.8.2 Tinción de PAS

Después de desparafinar los tejidos, se procedió a lavar las laminillas con agua destilada durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en un recipiente con ácido peryódico al 0.5% por 5 minutos, se realizaron varios lavados con agua destilada (4-7 lavados de 3 minutos cada uno), después se colocaron las laminillas en el reactivo de Schiff (1 g de Fucsina básica, 1.9 g de Metabisulfito sódico en 100 mL de Ácido clorhídrico 0.15 N y 24 hrs después se agregó 0.5 g de Carbón activado) durante 30 minutos en la oscuridad. Se procedió a lavar las laminillas con agua corriente durante 5 minutos y se hicieron varios lavados con agua destilada, posteriormente los tejidos se colocaron en hematoxilina de Mayer (0.1 g de Hematoxilina cristalizada, 5 g de Sulfato alumínico potásico, 0.02 g de Yodato de sodio, 0.1 g de Ácido cítrico, 5 g de Hidrato de cloral en 100 mL de agua destilada) por 5 minutos y se procedió a lavar las laminillas con agua corriente. Las laminillas teñidas se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se sellaron con medio de montaje y se examinaron con un microscopio Nikon.

8.8.3 Tinción de Tricrómico de Masson

Después de desparafinar los tejidos, se procedió a lavar las laminillas con agua destilada durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en un recipiente con Hematoxilina férrica de Weigert (0.5 g de Hematoxilina cristalizada, 0.58 g de Cloruro de hierro (III), 50 mL de etanol 96°, 0.5 mL de Ácido clorhídrico al 25% en 49.5 mL de agua destilada) por 5 minutos, los



tejidos se lavaron con agua destilada durante 30 minutos y se colocaron en un recipiente con Fucsina escarlata (1 mL de Ácido acético glacial, 9mL de Fucsina ácida al 2% en 90 mL de Escarlata de Biebrich al 0.1%) por 5 minutos, las laminillas se lavaron con agua destilada durante 2 minutos, se colocaron en ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada durante 15 minutos y se colocaron en Verde luz por 10 minutos (2 g de Verde luz, 2 mL de Ácido acético en 98 mL de agua destilada). Finalmente, los tejidos se lavaron con agua destilada durante 10 minutos y se colocaron en ácido acético al 1% con agua destilada por 3 minutos. Las laminillas teñidas se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se sellaron con medio de montaje y se examinaron con un microscopio Nikon.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales se procesaron en el programa Graph Pad Prism versión 5.00 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA). Se aplicó un análisis de medias con t de student.



10.RESULTADOS

10.1 MODELO DE DIABETES.

Para demostrar que el modelo de diabetes es viable, se evaluaron los siguientes parámetros: peso, concentración de glucosa en sangre y orina, concentración de creatinina en suero y orina, concentración de proteínas en la orina.

En la figura 10 se muestra el peso inicial y final del grupo control así como del grupo diabético. Se observa que el peso final de las ratas control aumenta con respecto a su peso inicial, mientras que el peso final de las ratas diabéticas disminuyó con respecto a su peso inicial. Cabe mencionar que el peso final del grupo diabético es menor con respecto al peso final del grupo control.

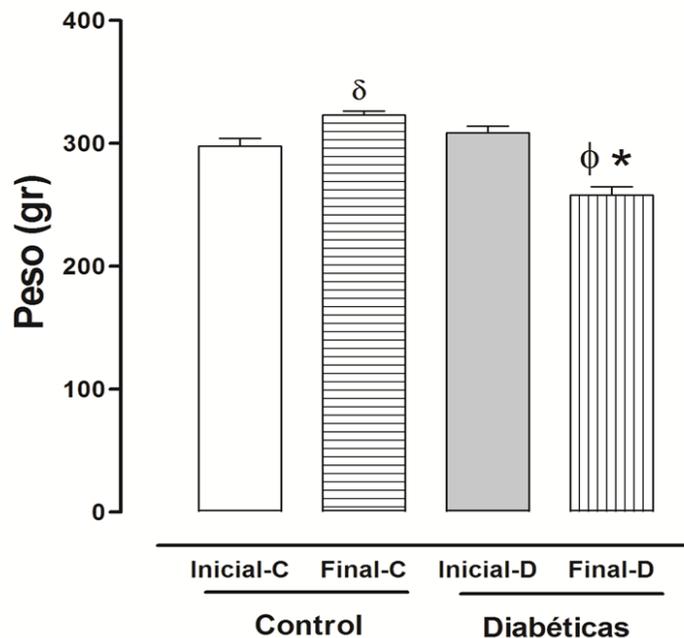


Figura 10. Peso del grupo control y del grupo diabético (n=15). El análisis estadístico se llevó a cabo por t de student (δ $P < 0.001$, $\phi * P < 0.001$).

En la figura 12 se muestra la concentración de glucosa en orina del grupo control así como del grupo diabético. Se observa en el grupo diabético la presencia de glucosa en orina, siendo ésta alrededor de 500 mg/dL, en comparación con el grupo control donde no hay presencia de glucosa.

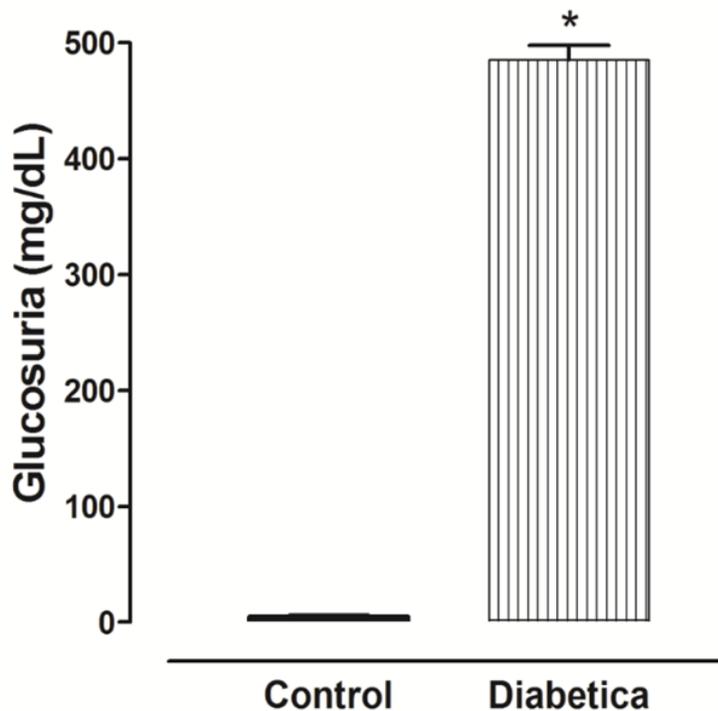


Figura 12. Concentración de glucosa en orina del grupo control y del grupo diabético (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.001).

En la figura 13 se muestra la concentración de creatinina en la orina del grupo control así como la del grupo diabético. No se observa diferencias al comparar los dos grupos.

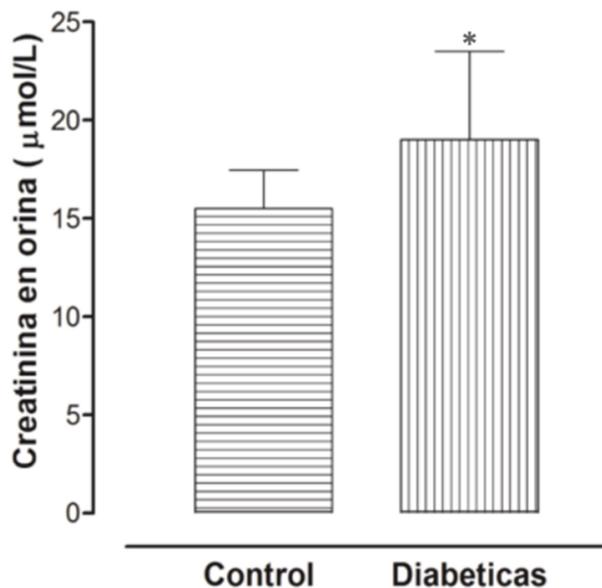


Figura 13. Concentración de creatinina en orina del grupo control y del grupo diabético (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.001).

En la figura 14 se muestra la concentración de creatinina en plasma del grupo control así como la del grupo diabético.No se observan diferencias al comparar los dos grupos.

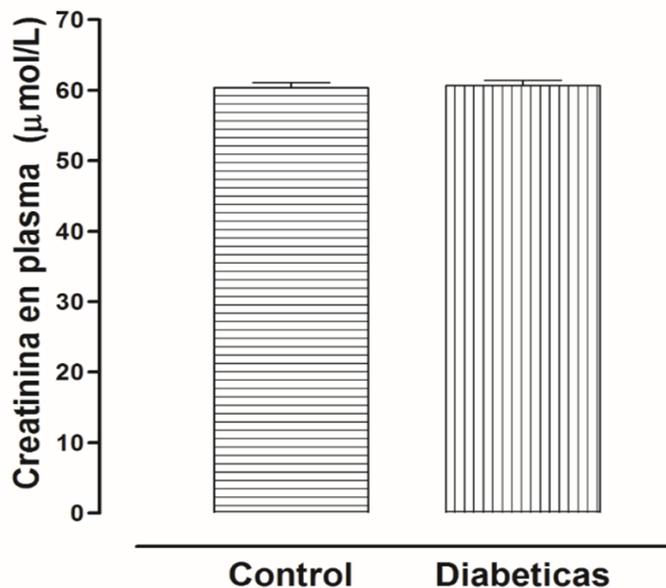


Figura 14. Concentración de creatinina en plasma del grupo control y del grupo diabético (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (P>0.001).

En la figura 15 se muestra la concentración de proteínas en la orina del grupo control así como la del grupo diabético. Se observa que la concentración de proteínas del grupo diabético aumenta aproximadamente 4 veces con respecto al grupo control.

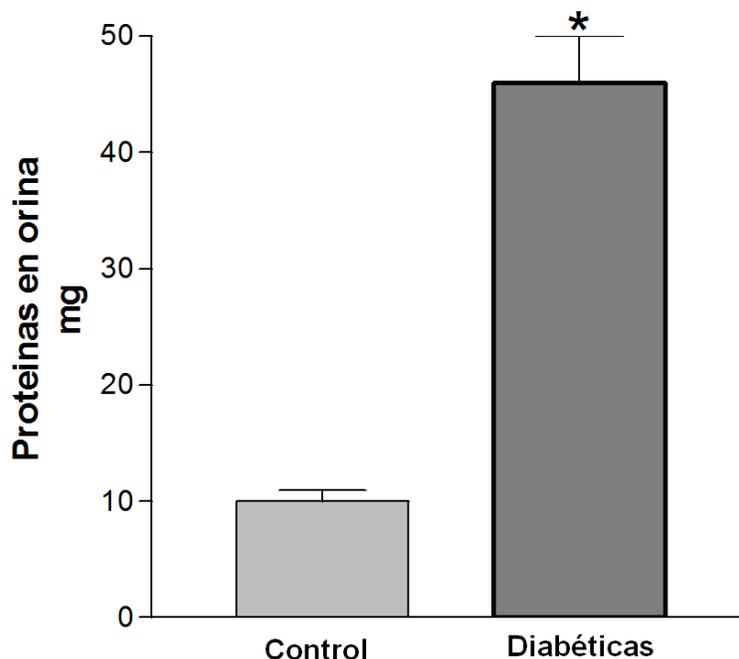


Figura 15. Concentración de proteínas en la orina del grupo control y del grupo diabético (n=15). El análisis estadístico se llevó a cabo por t de student (*P>0.001).

Para demostrar si hay diferencias morfológicas se realizaron cortes histológicos de riñón y se utilizaron tres tinciones: Hematoxilina & Eosina (H&E), Ácido peryódico de Schiff (PAS) y Tricómica de Masson.

En la tinción de H&E, la hematoxilina confiere un color morado-violeta a los núcleos, mientras que la eosina tiñe el citoplasma y material extracelular de diversos grados de color rosado. En la figura 16 A se observa la zona cortical y en ella se distinguen las estructuras glomerulares y tubulares de un riñón

control. Se distingue el glomérulo con el ovillo vascular, la cápsula de Bowman con un estrecho espacio de Bowman, células epiteliales, podocitos y se observa el mesangio intraglomerular. Entre los distintos glomérulos se observan secciones de los túbulos con pocas células en la superficie. En la figura 16 B se muestra un riñón de rata diabética, en esta figura se aprecian cambios en el parénquima renal, como cambios segmentarios en los glomérulos, se distingue un ligero engrosamiento de los túbulos, presencia de células inflamatorias en glomérulos y en el intersticio.

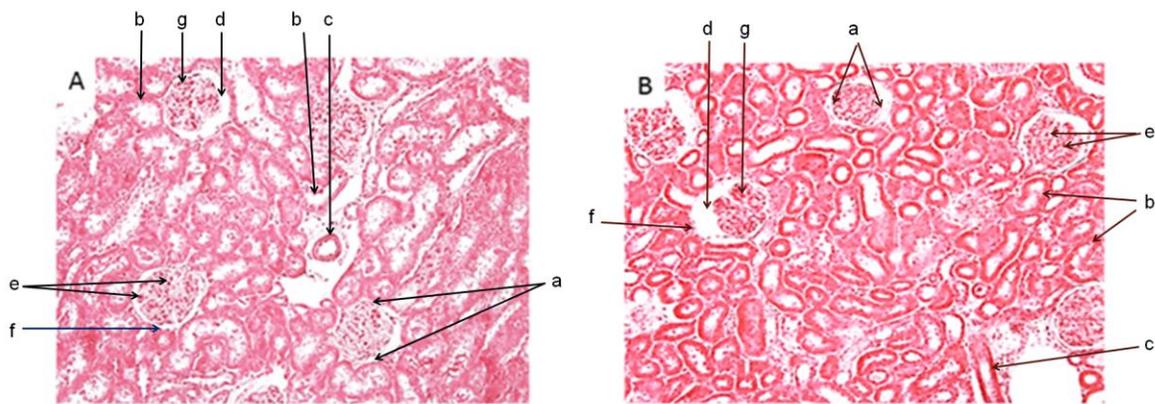


Figura 16. Tinción de H&E de riñón de rata control (A) y diabética (B). En ambos cortes observamos: Glomérulo (a), túbulos proximales (b), los vasos (c), espacio de Bowman (d), células mesangiales (e), células epiteliales (f) y el mesangio intraglomerular (g).

La tinción de PAS permite distinguir perfectamente las membranas basales de las estructuras glomerulares y tubulares al ser ricas en colágeno tipo IV, éstas se muestran teñidas de un color púrpura, mientras que los núcleos celulares se observan de un color violeta-negro (Fig. 17 A). En la figura 17 B se muestra un riñón de rata diabética, se distingue claramente el engrosamiento de las membranas basales de la cápsula de Bowman así como de los túbulos, el espacio de Bowman es más estrecho, pérdida de la membrana apical y pequeños nódulos mesangiales en el penacho.

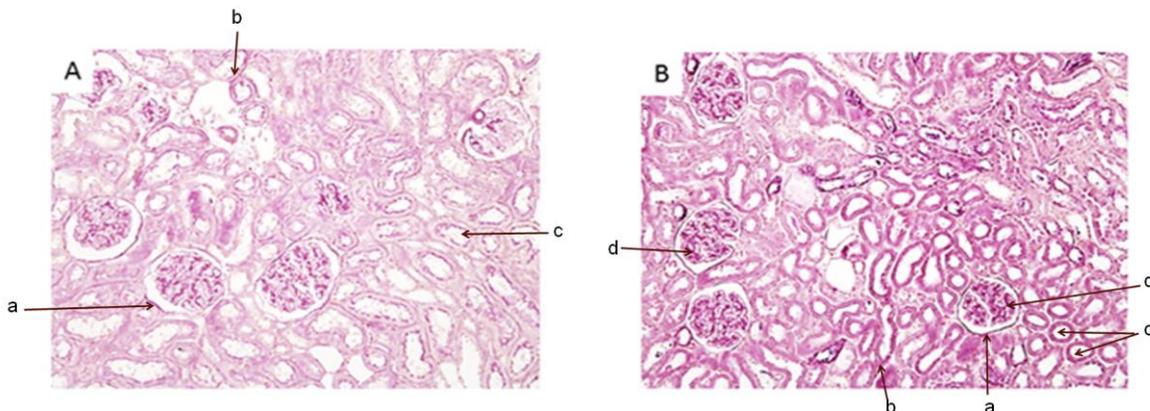


Figura 17. Tinción de PAS de riñón de rata control (A) y diabética (B). En ambos cortes observamos: la membrana basal glomerular (a), la membrana basal tubular (b), la membrana apical (c) y pequeños nódulos en el glomérulo de la figura 17 B (d).

En la figura 18 A se muestra un riñón de rata control teñido con tricrómico de Masson, se observan teñidos los núcleos celulares de lila, el citoplasma se observa de color rojo ladrillo y las fibras de colágeno de color azul. En la figura 18 B se muestra un riñón de rata diabética, se observa fibrosis en glomérulos, túbulos y vasos, expansión mesangial, pequeños nódulos intercapilares, disminuye la luz tubular, hay infiltrado celular en el espacio intersticial y glomérulos.

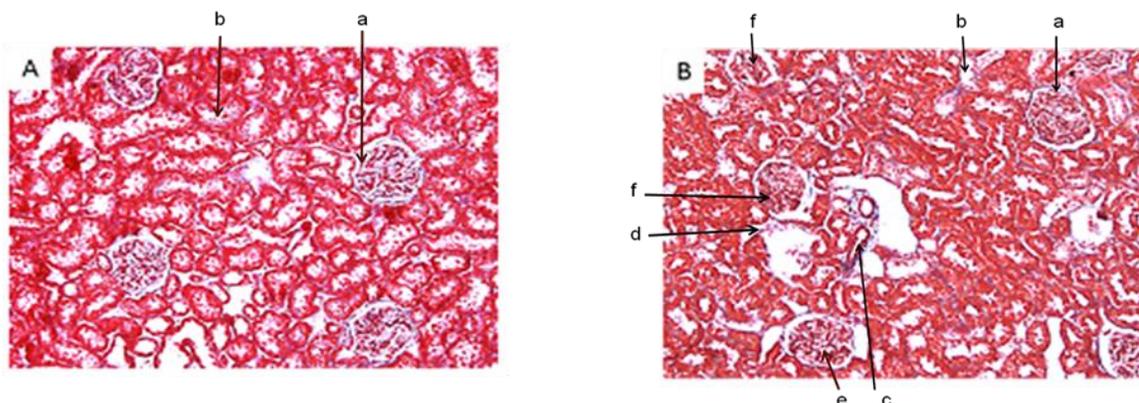


Figura 18. Tinción Tricromica de Masson de riñón de rata control (A) y diabética (B). En ambos cortes observamos: inicio de fibrosis en glomérulos (a), túbulos (b) y vasos (c), se muestra infiltración celular en el espacio intersticial (d) e intraglomerular en la figura 18 B (e) y se observan pequeños nódulos intercapilares de la figura 18 B (f)



Para demostrar los posibles cambios del metabolismo de los esfingolípidos en la corteza y en la médula de ratas control y diabéticas, se realizaron diferentes determinaciones: contenido de Esfingomielina, contenido de Ceramida, actividad de la Esfingomielinasa neutral, y la expresión de la Esfingomielinasa neutral.

10.2 CONCENTRACIÓN DE ESFINGOMIELINA (SM)

En la figura 19 y 20 se muestra la concentración de SM en la corteza y médula del grupo control y del grupo diabético respectivamente. En la figura 19 se observa que la concentración de SM del grupo diabético aumenta aproximadamente 3 veces con respecto al control. En tanto que en la médula (figura 20) se observa que el contenido de SM aumenta en las ratas diabéticas con respecto al control, cabe mencionar que la concentración de SM aumenta tanto en la corteza como en la médula del grupo diabético con respecto al grupo control.

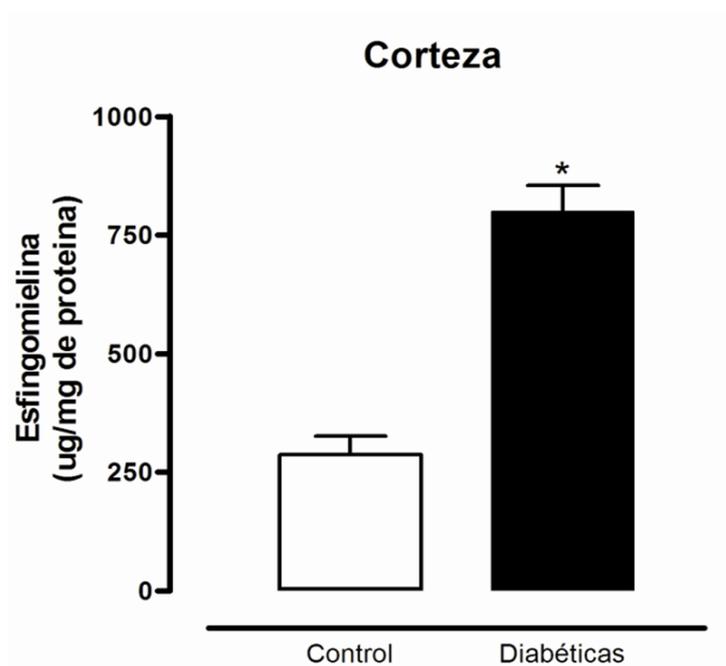


Figura 19. Concentración de esfingomielina (SM) en la corteza renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se lleva a cabo por t de student (*P<0.05).

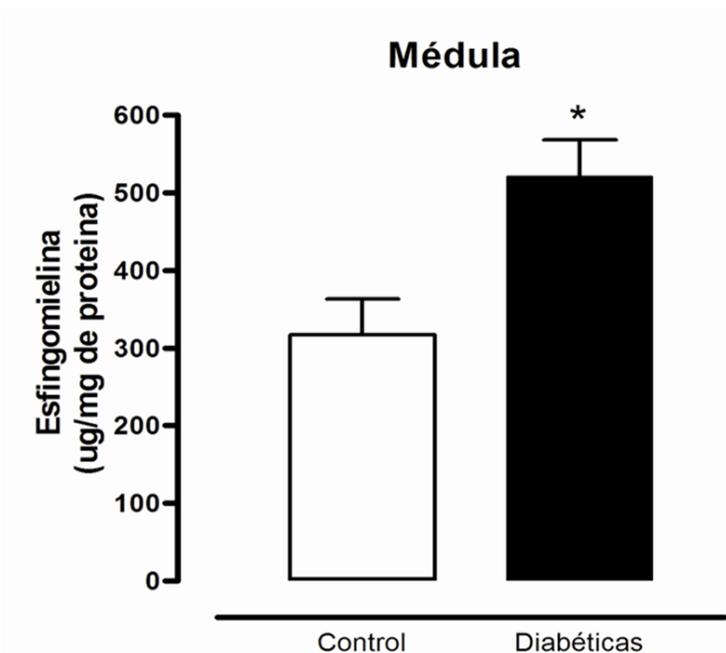


Figura 20. Concentración de esfingomielina (SM) en la médula renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se lleva a cabo por t de student (*P<0.05).

10.3 CONCENTRACIÓN DE CERAMIDA

En la figura 21 y 22 se muestra la concentración de Ceramida en la corteza y médula del grupo control y del grupo diabético respectivamente. En la figura 21 se observa que el contenido de Ceramida aumenta en las ratas diabéticas con respecto al control. En tanto que en la médula se observa que el contenido de Ceramida aumenta en el grupo diabético con respecto al grupo control, cabe mencionar que la concentración de Ceramida aumenta tanto en la corteza como en la médula del grupo diabético respecto al grupo control.

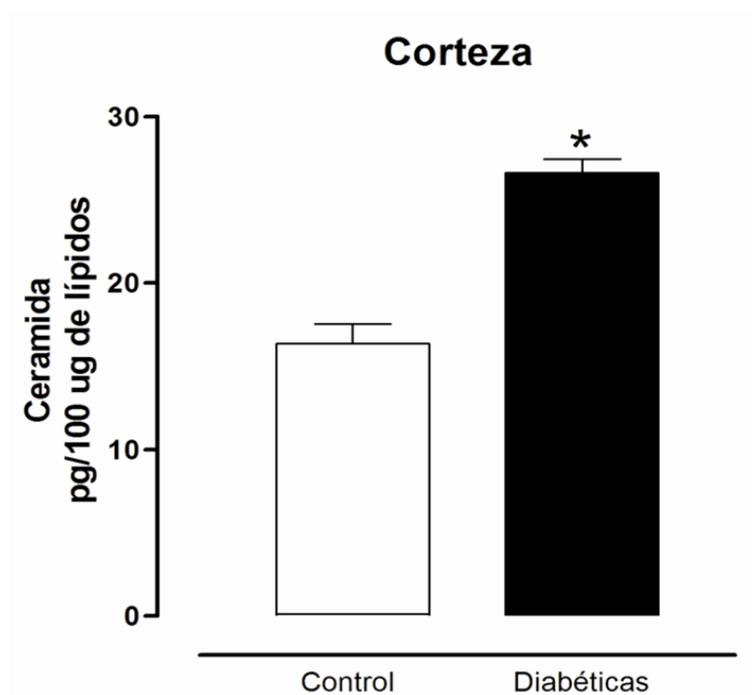


Figura 21. Concentración de Ceramida en la corteza renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.05)

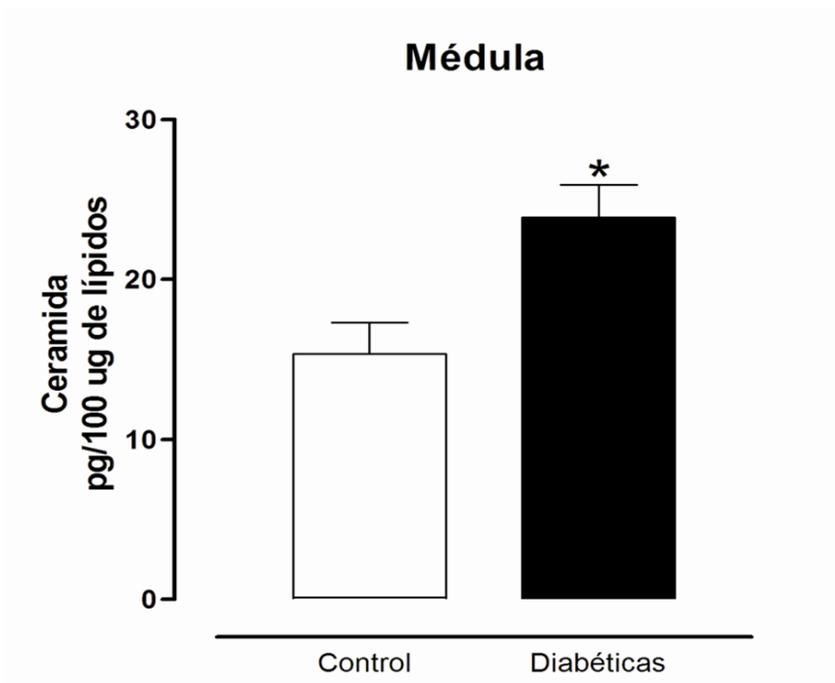


Figura 22. Concentración de Ceramida en la médula renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.05).

10.4 ACTIVIDAD DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRAL (nSMasa)

En la figura 23 y 24 se muestra la actividad de la nSMasa en la corteza y de la médula del grupo control y del grupo diabético respectivamente. En la figura 23 se observa que la actividad disminuye en el grupo diabético con respecto al grupo control. En tanto que en la médula (figura 24) se observa que la actividad disminuye aproximadamente 3 veces en el grupo diabético con respecto al grupo control, cabe mencionar que aunque la actividad de la nSMasa disminuye tanto en la corteza como la médula, el cambio es más evidente en la médula renal de ratas diabéticas con respecto a las ratas control.

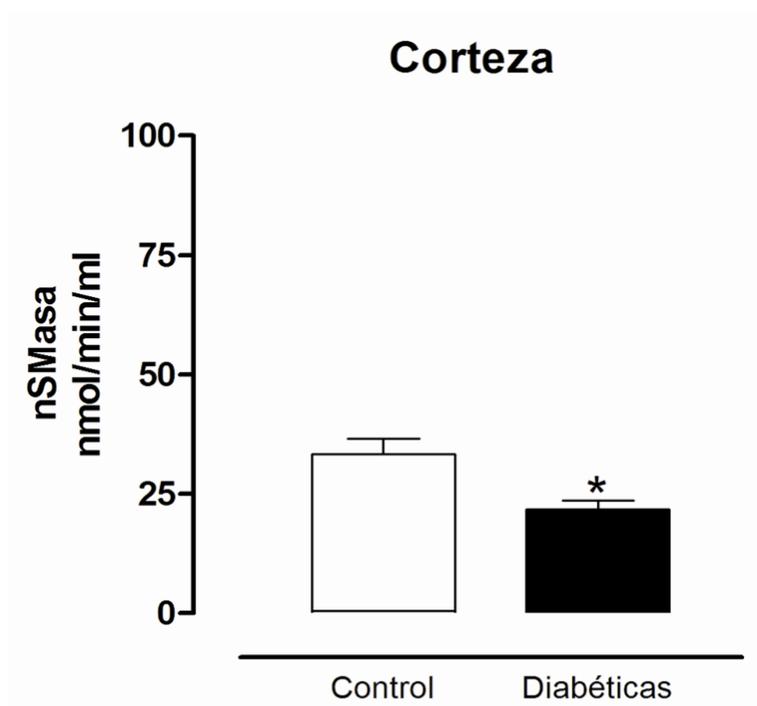


Figura 23. Actividad de la esfingomielinasa neutral (nSMasa) en la corteza renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.05).

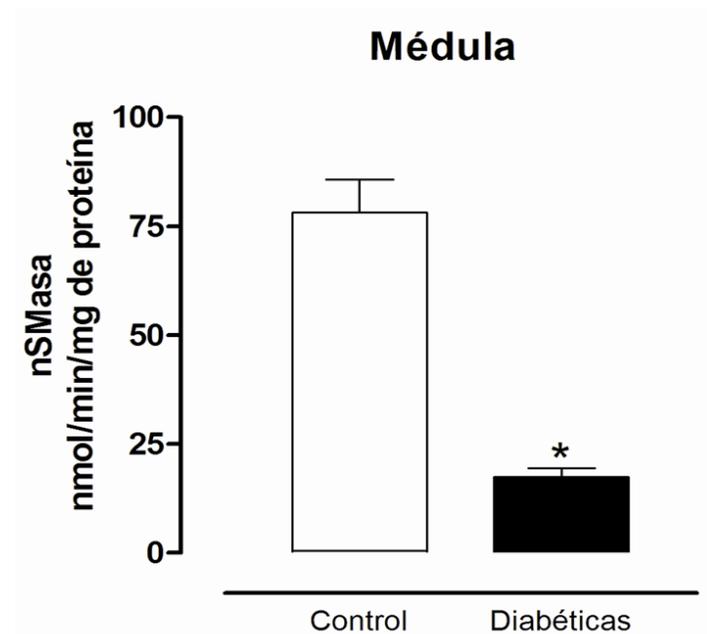


Figura 24. Actividad de la esfingomielinasa neutral (nSMasa) en la médula renal de ratas control y diabéticas (n=15). El análisis estadístico se llevo a cabo por t de student (*P<0.05).



11. DISCUSIÓN

La diabetes es una alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, caracterizada por mantener niveles elevados de glucosa en la sangre debido a fallas o defectos en la acción de la insulina, secretada por las células β del páncreas.

Durante la diabetes se desarrollan diferentes complicaciones como: retinopatías, neuropatías y nefropatía diabética (ND). La Asociación Americana de Diabetes (ADA), indica que la ND la presenta del 20-40% de los pacientes diabéticos. La ND es una complicación microvascular de la DM, tanto de la de tipo 1 como de la de tipo 2.³⁶

Para aclarar la patogénesis y la progresión de la diabetes se han propuesto estudios en modelos experimentales, lo cual permite el estudio de los factores interactivos que contribuyen a la enfermedad y provee información para el desarrollo de nuevos tratamientos. La mayoría de los experimentos de diabetes se llevan a cabo en roedores, aunque algunos estudios todavía se realizan en animales más grandes. La diabetes mellitus experimental generalmente se induce en animales de laboratorio por varios métodos que incluyen: manipulaciones quirúrgicas (pancreatectomía en perros), genéticas y químicas (diabetes inducida por aloxana o estreptozotocina (STZ)).³⁷

La STZ es una sustancia relativamente selectiva para las células β , que en ciertas especies causa diabetes permanente. Brondum y col., (2005)³⁸ reportan que el método más utilizado en ratas, es administrar una dosis de 40-70 mg/Kg de STZ a la edad de 8-10 semanas, después de eso, la rata desarrolla diabetes tipo 1



en un intervalo de 2 a 3 semanas. En el presente trabajo se muestra que el grupo diabético presenta pérdida de peso e hiperglucemia durante 4 semanas, tiempo en el cual se mantuvieron las ratas después de la administración de STZ. GuangYi Liu y col., (2010)²⁷ observaron durante 4 semanas pérdida de peso, hiperglucemia y poliuria en ratas Sprague-Dawley después de la administración de STZ. Brian Furman (2015)³⁹ en ratones C57BL/6 y CD-1 observó pérdida de peso e hiperglucemia durante 3 semanas, tiempo en el que se mantuvieron los animales después de la administración de STZ; en ratas Wistar y Sprague-Dawley macho solo muestran hiperglucemia a partir del segundo día después de la administración de la STZ, las ratas Wistar hembra son poco sensibles a la STZ. Esto sugiere que es importante tomar en cuenta, la dosis de STZ, la especie y el sexo del grupo experimental.

En nuestro modelo experimental además de la pérdida de peso e hiperglucemia, no observamos cambios en la concentración de creatinina en el plasma de ambos grupos experimentales. En muestras de orina se determinó la presencia de glucosa y proteínas en el grupo diabético con respecto al grupo control, sin cambios en la concentración de creatinina. TU Qing-nian y col., (2011)⁴⁰ reportaron hiperglucemia y poliuria, así como microalbuminuria y aumento de la concentración de creatinina en plasma de ratas Wistar macho a las 4 semanas después de la administración de STZ. Wenxin Xu y col., (2012)⁴¹ también observaron glucosuria a partir del día 2 después de la administración de STZ y hasta el día del sacrificio (día 12) en ratas Wistar macho. Alina Scridon y col., (2015)⁴² reportaron hiperglucemia, poliuria y polifagia en ratas Wistar macho una semana después de la administración de STZ, a partir de la segunda semana



y por 27 semanas presentaron pérdida de peso sin cambios en la concentración de creatinina en el plasma. Ho-Shan Niu y col., (2016)⁴³ durante 2 semanas, tiempo en el que se mantuvieron las ratas Wistar macho después de la administración de STZ, observaron hiperglucemia, poliuria, aumento de la concentración de proteínas en la orina y aumento de la concentración de creatinina en el plasma.

Considerando los antecedentes antes descritos y nuestros resultados, podemos sugerir que nuestro modelo experimental se encuentra en etapas tempranas de la nefropatía diabética con las siguientes características: hiperglucemia, glucosuria, proteinuria y no presenta cambios en la concentración de creatinina que es considerada un biomarcador de lesión renal.

Las alteraciones estructurales del riñón se relacionan con la función renal en pacientes con DM1. Desde el punto de vista de la anatomía patológica, las características más tempranas de la nefropatía diabética son el engrosamiento de la membrana basal glomerular, sigue el aumento de volumen tanto de la matriz mesangial como de los glomérulos y desprendimiento podocitario. La matriz adquiere un patrón laminado y nodular que fue descrito en 1936 por los doctores Paul Kimmelstiel y Clifford Wilson. La ND también presenta engrosamiento de las membranas de los túbulos. En los estados más avanzados se observan lesiones arteriales (hialinosis), esclerosis glomerular de grado variable y fibrosis túbulointersticial con atrofia tubular.⁴⁴⁻⁴⁶

En el presente trabajo, al evaluar en cortes histológicos, observamos con la tinción de H&E infiltración de células inflamatorias en el grupo diabético con respecto al grupo control. Con la tinción de PAS observamos un ligero



engrosamiento de la membrana basal de los glomérulos y de los túbulos, disminución de la membrana apical en los túbulos proximales, expansión mesangial y pequeños nódulos intercapilares en el penacho. Además, con la tinción de Masson observamos un grado de fibrosis intersticial no avanzado tanto en los glomérulos como en los túbulos y también observamos el mismo grado de fibrosis perivascular.

Karen Geoffroy y col., (2005)⁴⁷ después de 4 días de la administración de STZ, observaron en el riñón de ratas Wistar macho proliferación de células mesangiales. Yi Yang y col., (2007)⁴⁸ después de 4 semanas de la administración de STZ, observaron en el riñón de ratas Sprague-Dawley engrosamiento difuso de la MBG sin hiperplasia prominente, hipertrofia glomerular, expansión mesangial, infiltración de macrófagos en glomérulos e intersticio y aumento de la expresión a nivel de ARNm de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). Slava Malatiali y col., (2008)⁴⁹ reportaron que en ratas Fisher diabéticas, que recibieron tratamiento con florizina por una semana, disminuye la hiperglucemia, se revierte la albuminuria y la tasa de filtración glomerular, pero persiste la hipertrofia glomerular. Xiao-Qiang Li y col., (2016)⁵⁰ observaron en el riñón de ratones db/db de 8 semanas, daño en las células epiteliales, expansión de la matriz mesangial, hipertrofia glomerular y fibrosis.

Ho-Shan Niu y col., (2016)⁴³ observaron en el riñón de ratas Wistar macho después de 2 semanas de la administración de STZ, hipertrofia glomerular, expansión mesangial, dilatación tubular, fibrosis intraglomerular y tubulointersticial.

Considerando los antecedentes antes descritos y nuestros resultados, en nuestro modelo experimental se desarrollaron cambios morfológicos discretos y no



se presentaron cambios en la concentración de creatinina, lo cual sugiere que presenta características de la ND temprana de acuerdo a lo descrito por Juan Alberto Fierro (2009) y Lin Yi-Chih (2018).^{44,45}

Actualmente en la práctica clínica, la creatinina y la urea son biomarcadores séricos en uso. Sin embargo, no son sensibles ni específicos para la detección de cambios agudos en la función renal, ya que solo muestran cambios significativos hasta que se pierde aproximadamente el 50% de la función renal.^{51,52}

En etapas tempranas, la concentración de creatinina sérica y de urea, no se consideran biomarcadores de lesiones renales eficientes y por esta razón, es importante la búsqueda de otros biomarcadores de mayor sensibilidad y especificidad.⁵³

La disponibilidad de un biomarcador de cambios agudos en la función renal puede facilitar (i) la detección precoz del daño renal, permitiendo así un tratamiento que posiblemente prevenga la progresión hacia categorías más avanzadas de disfunción renal; (ii) la distinción entre los diferentes tipos de un daño renal (prerenal, renal, obstructivo); (iii) la estratificación del riesgo; (iv) la monitorización de la respuesta al tratamiento; y (v) la predicción de la respuesta al tratamiento. Con estos objetivos, se han estudiado en los últimos años diversas moléculas detectables en la sangre o en la orina.⁵³

Actualmente el estudio de los biomarcadores se desarrolla con el uso de las ciencias -ómicas, como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. La metabolómica consiste en la evaluación de todos los metabolitos producidos por el organismo en una muestra de tejido o en un fluido orgánico. La metabolómica proporciona información completa sobre los procesos



metabólicos de la célula, a diferencia de la genómica, la transcriptómica o la proteómica, que no informan sobre los productos de las reacciones metabólicas. Los metabolitos identificados incluyen productos del metabolismo intermediario, hormonas y otras moléculas de señalización. Dentro de la metabolómica, la lipidómica tiene su propia identidad. La lipidómica a través de glucolípidos está vinculada al campo de los glucómicos, y a través de los segundos mensajeros lipídicos al campo de la señalómica. Cabe destacar que, todos los precursores para la síntesis de lípidos y los productos de la degradación de los lípidos son metabolitos solubles en agua, que incorporan a la lipidómica en la metabolómica.⁵⁴

Existen diferentes categorías dentro de los lípidos, una de ellas son los esfingolípidos. Los esfingolípidos y sus metabolitos son constituyentes ubicuos de las membranas y participan en la de transducción de señales.⁵⁴

Recientemente, se ha sugerido que el metabolismo de los esfingolípidos contribuye en la fisiopatología de la diabetes tipo 1, 2.⁵⁵

Todd E. Fox y col (2011)⁵⁶ reportaron que en el plasma de ratas Sprague Dawley después de 4 semanas de la administración de STZ, aumenta la concentración de S1P y de ceramida, sin cambios en la concentración de SM y Sp, mientras que en el plasma de ratones *Ins2^{akita}*, observaron aumento de la concentración de S1P, disminución en la concentración de Sp y ceramida, sin cambios en la concentración de SM. Ville-Petteri Makinen y col., (2011)⁵⁷ demostraron que en el plasma de pacientes con diabetes tipo 1, aumenta la concentración de SM total y el colesterol esterificado de cadena larga (VLDL). Samar M Hammad y col., (2017)⁵⁸ realizaron un estudio piloto en el plasma de pacientes con diabetes tipo 1 con neuropatía. En los pacientes con neuropatía



detectada, observaron aumento de deoxi-ceramida C24, ceramida C24, C26 y cisteína, sin cambios de SM, hexosilceramida, lactosilceramida y Sp.

Kelli M Sas y col., (2015)⁵⁹ reportaron que en el plasma de ratones db/db de 24 semanas de edad, aumenta la concentración de ceramidas de cadena larga (C14:0, C16:0, C18:0, C20:0) y de la glucosilceramida (Glu-Cer C18:0). Por el contrario, en la corteza renal, disminuye significativamente la concentración de ceramidas de cadena larga y glucosilceramida (Glu-Cer C16:0). Satoshi Maiyamoto y col., (2016)⁶⁰ reportaron que en ratones C57BL/6J de 20 semanas de edad con una dieta alta en grasas durante 1 semana aumenta la concentración de SM en el plasma y en los glomérulos observaron que aumenta la concentración de SM, aumenta la expresión de la SMS1, disminuye la expresión de la nSMasa y no hay cambios en la expresión de la SMS2 ni de la aSMasa. En los glomérulos de ratones *Ins2^{akita}* de 20 semanas de edad aumenta la concentración de SM, aumenta la expresión de la SMS1, SMS2, sin cambios en la expresión de la nSMasa y de la aSMasa. Karen Geoffroy y col., (2005)⁴⁷ observaron que en los glomérulos de ratas Wistar macho después de 4 días de la administración de STZ, aumenta la concentración de S1P así como la actividad de la CDasa neutral y de la Sphk, sin cambios en la concentración de Sp. Marmuthu Subathra y col., (2015)⁶¹ reportaron que en la corteza renal de ratones diabéticos db/db de 9 y 17 semanas de edad, aumenta la concentración de hexosilceramida y lactosilceramida, en la orina solo observaron después de 9 semanas, aumento de la concentración de glicosfingolípidos. Dania Yaghobian y col., (2016)⁶² reportaron que en la corteza de ratones C57/B16 diabéticos de 24 semanas,



observaron que aumenta la concentración de S1P y aumenta la expresión de colágeno IV, fibronectina y MCP1 a nivel de RNAm.

Los estudios antes descritos se realizaron en modelos de animales diabéticos, por otro lado, en humanos, Satoshi Miyamoto y col., (2016)⁶⁰ realizaron nefrectomía de un riñón con cáncer y solo utilizaron las células renales no involucradas con la enfermedad. En las células renales observaron que la SM se localiza en la pared vascular, así como en los glomérulos. Los resultados se obtuvieron por imágenes de espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistidas por matriz (MALDI-MSI). Dania Yaghobian y col., (2016)⁶² observaron por inmunohistoquímica que aumenta la expresión de la Sphk1, en el citoplasma de los túbulos proximales, en el mesangio y en el espacio tubulointersticial de la corteza renal de pacientes con ND.

En nuestros resultados observamos que en la corteza y en la médula renal de ratas diabéticas, aumentó la concentración de SM con respecto al grupo control.

La síntesis de SM se explica por una esterificación con fosforilcolina en una reacción catalizada por la SMS, que transfiere el grupo fosforilcolina desde la fosfatidilcolina al hidroxilo primario de la ceramida para formar SM y diacilglicerol.

Se han identificado 2 isoformas de la SMS: SMS1 y SMS2. La SMS1 se encuentra en el aparato de Golgi, mientras que la SMS2 se asocia principalmente con la membrana plasmática.

Para explicar el aumento de la concentración de SM, Satoshi Miyamoto y col., (2016)⁶⁰ reportaron que en los glomérulos de ratones *Ins2^{akita}* de 20 semanas de edad aumenta la expresión de la SMS1 y de la SMS2.



En nuestros resultados observamos que en la corteza y en la médula renal de ratas diabéticas, aumentó la concentración de ceramida con respecto al grupo control.

Para la formación de ceramida existen diferentes rutas metabólicas, de las cuales, las más estudiadas son: 1) la síntesis de novo en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico por la enzima SPT; 2) la ruta catabólica que se lleva a cabo por la hidrólisis de SM, catalizada por SMasas; 3) la síntesis de ceramida por la acilación de la Sp, catalizada por la ceramida sintasa. Existen más rutas metabólicas para la formación de ceramida que no se han estudiado: 1) a partir de la glucosilceramida en una reacción catalizada por la enzima β -glucosidasa; 2) a partir de la galactosil-ceramida por la enzima β -galactosidasa; 3) por la hidrólisis de la ceramida-1P catalizada por la enzima fosfatidatofosfohidrolasa.^{63,64}

Con respecto a la ruta metabólica “novo”, Liu y col (2010)²⁷ reportaron que, en la corteza renal de ratas diabéticas, aumenta la actividad de la enzima SPT y aumenta la concentración de ceramida.

Referente a la vía catabólica, se ha reportado que participan dos isoformas de la SMasa: aSMasa y nSMasa (Norma Marchesini y col., 2004).⁷ En relación a la isoforma aSMasa, Liu y col., (2010)²⁷ no observaron cambios en la actividad de la enzima en la corteza de ratas diabéticas. Bautista-Pérez y col., (2014)³⁵ reportaron que en el riñón de ratas Wistar macho, hay actividad y expresión de la nSMasa, es importante mencionar que tanto la actividad como la expresión fue mayor en la médula renal en comparación con la corteza renal. Actualmente se desconoce si



las SMasas contribuyen con el aumento de la concentración de ceramida durante la diabetes.

En este trabajo se observó que la actividad de la nSMasa disminuyó en la médula y en la corteza renal de ratas diabéticas con respecto al grupo control. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad de la nSMasa no contribuye con la hidrólisis de SM para la formación de ceramida. Es decir, el aumento de la concentración de ceramida se lleva a cabo por una vía alterna.

Por otra parte, en nuestro grupo de investigación, recientemente Bautista-Pérez y Carlos Becerra Cruz (2018) reportaron que en el plasma y en la orina de ratas diabéticas aumenta la concentración de ceramida con respecto al control.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que, en etapas tempranas de la diabetes, es posible determinar de forma no invasiva (en el plasma y en la orina) la concentración de ceramida. Considerando lo anterior, se propone considerar a este esfingolípido como biomarcador de lesión renal en etapa temprana y esto permitiría retardar el desarrollo de complicaciones y generar alternativas en el tratamiento de esta patología.



12. RESUMEN DE RESULTADOS

- El modelo experimental de diabetes presentó las características principales de la patología, como pérdida de peso, hiperglucemia, glucosuria y proteinuria, sin cambios en la concentración de creatinina en plasma y orina. Estos resultados sugieren que el daño renal se encuentra en una etapa temprana y por lo anterior, la función renal no se ha modificado de manera considerable.
- Con la tinción de H&E, PAS y Tricrómico de Masson observamos en cortes de tejido renal de ratas diabéticas: engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular, pérdida de la membrana apical, expansión mesangial, infiltración celular intersticial e intraglomerular y un grado de fibrosis no avanzado. Estos resultados correlacionan con los cambios bioquímicos y sugieren que las ratas presentan nefropatía diabética en una etapa temprana.
- En relación al metabolismo de los esfingolípidos, se observó que en la corteza y médula renal de ratas diabéticas aumentó la concentración de esfingomielina y ceramida, mientras que la actividad de la esfingomielinasa neutral disminuyó. Estos resultados sugieren que la modificación de la concentración de los metabolitos se debe a una vía alterna a la catabólica.



13. CONCLUSION

Estos resultados demuestran que en etapas tempranas de la diabetes, se observan cambios histológicos discretos y que no afectan la función renal ya que no observamos cambios en la concentración de creatinina tanto en plasma como en orina, sin embargo, observamos un aumento en la concentración de esfingomielina y de ceramida en el tejido renal, estos resultados sugieren que la esfingomielina y la ceramida pueden ser considerados biomarcadores de daño renal temprano en la diabetes.



14. REFERENCIAS

1. Alewijnse AE, Peters SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both?. *Eur J Pharmacol.* 2008;13(2-3):292-302.
2. Andieu-Abadie N, Jaffrezou J, Hatem S, y col. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB J.* 1999;13(12):1501-1510.
3. Levade T, Jaffrezou J. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys.* 1999;1438:1-17.
4. Callahan JW, Jones CS, Davidson DJ, y col. The active site of lysosomal sphingomyelinase: evidence for the involvement of hydrophobic and ionic groups. *J Neurosci.* 1983;10:151-163.
5. Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, y col. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem.* 1998a;273:2738-2746.
6. Tabas, I. Secretory sphingomyelinase. *Chem Phys Lipids.* 1999;102:123-130.
7. Marchesini N, Hannun Y. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *J Biochem Cell Biol.* 2004;82:27-44.
8. Fuentes AX, Castiñeiras LM, Queraltó CJ. *Bioquímica clínica y patología molecular.* Vol. 2, Lípidos y lipoproteínas. Barcelona: Reverté; 1998.698-700.



9. Shayman JA, Radin NS. The structure and function of renal glycosphingolipids. *Am J Physiol.* 1991;260:F291–F302.
10. Fajans SS. Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care* 1990;13:49–64.
11. Froguel P, Vaxillaire M, Velho G. Genetic and metabolic heterogeneity of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Rev.* 1997;5:123–130.
12. Kasuga M, Kadowaki T. Insulin receptor disorders in Japan. *Diabetes Res Clin Pract.* 1994;24(Suppl): S145–S151.
13. Maassen JA, Kadowaki T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia.* 1996;39: 375–382.
14. Sakagashira S, Sanke T, Hanabusa T y col. Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes rev.* 1996;45: 1279–1281.
15. Nanjo K, Oka Y, Kadowaki T. Recent aspects on diabetes mellitus associated with gene mutation in Japan. *JJpn Diabetes Soc.* 1998;(41): A29–A31.
16. Seino Y, Nanjo K, Tajima N, y col. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetol Int.* 2010;1(1):2-20.
17. Estrada VA, López MJ, Alvarado R, y col. Insuficiencia renal crónica. 2009;1:3-10.
18. Miyahira AJ. Insuficiencia renal aguda. *Rev Medica Hered.* 2013;14(1):36.
19. Monedero P, García FN, Vives M, y col. Insuficiencia renal aguda. *Rev Esp Anestesiología Reanim.* 2011;(58):365-374.



20. Mongenssen C, Christensen C, Vittinghus. The Stages in Diabetic Renal Disease: With Emphasis on the Stage of Incipient Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 1983;32(2):64-78.
21. Torres A, Zacarías R. Nefropatía diabética. *Revista del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”*. 2002;5(1-2):24-32.
22. Borodzicz S, Czarzasta K, Kuch M, y col. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis*. 2015;14(1):1-5.
23. Sacket S, Chung H, Okajima F, y col. Increase in sphingolipid catabolic enzyme activity during aging. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(10):1454-1461.
24. Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*. 2002;(110):3–8.
25. Spijkers L, van den Akker R, Janssen B, y col. Hypertension Is Associated with Marked Alterations in Sphingolipid Biology: A Potential Role for Ceramide. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21817.
26. Kalhorn T, Zager R. Renal cortical ceramide patterns during ischemic and toxic injury: assessments by HPLC-mass spectrometry. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999;46:723-733.
27. Liu G, Han F, Yang Y, y col. Evaluation of sphingolipid metabolism in renal cortex of rats with streptozotocin-induced diabetes and the effects of rapamycin. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;26(5):1493-1502.
28. Yi F, Zhang A, Li N, y col. Inhibition of ceramide–redox signaling pathway blocks glomerular injury in hyperhomocysteinemic rats. *Kidney Int*. 2006;70(1):88-96.



29. Zager R, Conrad S, Lochhead K, y col. Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* 1998;53(3):573-582.
30. Bautista-Pérez R, Arellano A, Franco M, y col. Sphingosine 1-phosphate-induced vasoconstriction is increased in the isolated perfused kidneys of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(1):e8-11.
31. Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Physiol Pharmacol.* 1959;37(8):911-917.
32. He X, Chen F, McGovern M, Schuchman E. A Fluorescence-Based, High-Throughput Sphingomyelin Assay for the Analysis of Niemann–Pick Disease and Other Disorders of Sphingomyelin Metabolism. *Anal Biochem.* 2002;306(1):115-123.
33. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
34. Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou I, y col. Differential effects of high-fat diet on myocardial lipid metabolism in failing and nonfailing hearts with angiotensin II-mediated cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(9):H1795-H1805.
35. Bautista-Pérez R, del Valle-Mondragón L, Cano-Martínez A, y col. Involvement of neutral sphingomyelinase in the angiotensin II signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;15;308(10):F1178-87.
36. American Diabetes Association. Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(1):S79-S86.



37. Kumar S, Singh R, Vasudeva N, y col. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11(9):1-13.
38. Brondum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional Abnormalities in Isolated Arteries from Goto-Kakizaki and Streptozotocin-treated Diabetic Rat Models. *Horm Metab Res.* 2005;37(1):56-60.
39. Furman B. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;(1):1-20.
40. Qing-nian T, Hui D, Fu-er L. Effects of Panax Notogino side on the Nephropathy in Rats with Type 1 Diabetes Mellitus. *Chin J Integr Med.* 2011;17(8):612-615.
41. Xu W, Wu J, An Y, y col. Streptozotocin-Induced Dynamic Metabonomic Changes in Rat Biofluids. *J Proteome Res.* 2012;11:3423-3435.
42. Scridon A, Perian M, Marginean A, y col. Wistar rats with long-term streptozotocin-induced type1 diabetes mellitus replicate the most relevant clinical, biochemical, and hematologic features of human diabetes. *Rev Romana de Med Lab.* 2015;23(3): 263-274.
43. Niu HS, Liu IM, Niu CS, y col. Eucommia bark (Du-Zhong) improves diabetic nephropathy without altering blood glucose in type 1-like diabetic rats. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10(2):971-978.
44. Fierro JA. Nefropatía Diabética: Fisiopatología, Diagnóstico, Evolución Clínica y Epidemiología. *Med Clin Condes.* 2009;20(5)639-650.
45. Yi CL, Chang YH, Yang SY, y col. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(8):662-675.



46. Wolf G, Ziyadeh F. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1999;(56):393-405.
47. Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, y col. Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels. *J FEBS.* 2005;(579):1249-1254.
48. Yang Y, Wang J, Qin L, y col. Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats. *Am J Nephrol.* 2007;27(5):495-502.
49. Malatiali S, Francis I, Barac-Nieto M. Phlorizin Prevents Glomerular Hyperfiltration but not Hypertrophy in Diabetic Rats. *Exp Diabetes Res.* 2008;(1):1-7.
50. Li X, Tian W, Liu X, y col. Corosolic acid inhibits the proliferation of glomerular mesangial cells and protects against diabetic renal damage. *Sci Rep.* 2016;(6):1-16.
51. Bagshaw S, Bellomo R. Early diagnosis of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2007;(13):638–644.
52. Nickolas T, Barasch J, Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;(17):127–132.
53. Seijas M, Baccino C, Nin C, y col. Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas. *Med Intensiva.* 2014;38(6):376-385.
54. Meer G. Cellular lipidomics. *The J EMBO.* 2005;(24):3159–3165.
55. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, y col. Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(4):E398-408.



56. Fox T, Bewley M, Unrath K, y col. Circulating sphingolipid biomarkers in models of type 1 diabetes. *J Lipid Res.* 2011;52(3):509-517.
57. Mäkinen V, Tynkkynen T, Soininen P, y col. Sphingomyelin is associated with kidney disease in type 1 diabetes (The Finn Diane Study). *Metabolomics.* 2012;8:369-375.
58. Hammad S, Baker N, El Abiad J, y col. Increased Plasma Levels of Select Deoxy-ceramide and Ceramide Species are Associated with Increased Odds of Diabetic Neuropathy in Type 1 Diabetes: A Pilot Study. *Neuromolecular Med.* 2017;19(1):46–56.
59. Sas K, Nair V, Byun J, y col. Targeted Lipidomic and Transcriptomic Analysis Identifies Dysregulated Renal Ceramide Metabolism in a Mouse Model of Diabetic Kidney Disease. *J Proteomics Bioinform.* 2015;(14):01-17.
60. Miyamoto S, Hsue C, Hamm G, y col. Mass Spectrometry Imaging Reveals Elevated Glomerular ATP/AMP in Diabetes/obesity and Identifies Sphingomyelin as a Possible Mediator. *EBioMedicine.* 2016;(7):121–134.
61. Subathra M, Korrapati M, Howell L, y col. Kidney glycosphingolipids are elevated early in diabetic nephropathy and mediate hypertrophy of mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;(309):F204–F215.
62. Yaghobian D, Don S, Yaghobian S, y col. Increased sphingosine 1-phosphate mediates inflammation and fibrosis in tubular injury in diabetic nephropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;(43):56–66.
63. Kumar A, Chitra S, Bhanuprakash G. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. *Biomol Concepts.* 2016;7(5-6):293–309.



- 64.Schenck M, Carpinteiro A, Grassmé H, y col. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. Arch Biochem Biophys.2007;462:171–5.