



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Farmacia



**“Evaluación de la inflamación en la nefropatía diabética en rata
Wistar”**

Tesis presentada como requisito para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

pQFB Stephany Hernández Teotan

Lugar de realización:

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Director de tesis:

D.C. Samuel Treviño Mora

Co director:

D.C. Maria Guadalupe Muñoz Arenas

Asesor metodológico:

D.C. Cristhian Neftaly Sanchez Solis

Junio 2021

Agradecimientos

A mis padres por todo todo el apoyo y amor incondicional que me han dado hasta hoy en día, gracias por todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho para poder darme una educación, es gracias a ustedes que he podido concluir mis estudios y siempre estaré agradecida por la todas las enseñanzas, la confianza y el cariño que me han brindado.

A mi hermana gracias por hacerme reír todos los días con tus ocurrencias, por tu confianza y tu cariño, por tu abrazos en los momentos difíciles.

A mi director de tesis, el D.C Samuel Treviño Mora, por aceptarme en su grupo de trabajo y dejarme realizar este proyecto, por todas las pláticas y el apoyo incondicional de su parte, por todo el aprendizaje que me ha dejado, por el tiempo dedicado a este trabajo, por todos los consejos y regaños que me ha dado. Estaré siempre agradecida y para mí ha sido muy grato haber trabajado con usted.

A mis amigos de la uni Getse,Ceci, Esther y a mi parejita Nelly, por todos los bonitos momentos que pasamos juntos, por todas las risas y papas compartidas, por su amistad y apoyo en todo momento.

A mi amigo Hugo por apoyarme en todo momento, por enseñarme técnicas y ayudarme a comprender muchas cosas que no entendía,por sus regaños en el laboratorio, por los consejos y las risas, gracias por siempre escucharme.

A toda mi familia y amigos gracias por apoyarme siempre y por todo su cariño.

A mis sinodales y co-directores por el tiempo invertido en leer, revisar y corregir este trabajo.

A Diana y Victor por enseñarme las metodologías que utilicé en este trabajo y presentar siempre la mejor disposición para ayudarme.

A la VIEP por la beca otorgada para este proyecto.

Al laboratorio de investigaciones Químico Clínicas, por permitirme realizar todos mis experimentos para este proyecto.

Al personal del bioterio por facilitar los animales para el presente trabajo.

Marco Teórico

1.1 Nutrición y transición nutricional.....	10
1.2 Diabetes.....	10
1.2.1 Diagnóstico	11
1.2.2 Diabetes tipo 2	12
1.3 Nefropatía Diabética.....	13
1.3.1 Fisiopatología	14
1.3.2 Cambios estructurales.....	17
1.3.3 Pérdida de la función renal	20
1.3.4 Valoración de la función renal	21
1.4 Inflamación en la nefropatía diabética.....	24
1.5 Modelos de estudio.....	27
2. DEFINICION DEL PROBLEMA.....	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
5. HIPOTESIS.....	30
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	31
7. METODOLOGÍA	32
8. RESULTADOS.....	35
8.1 Determinaciones Zoométricas.....	35
8.2 Modelo Diabetogénico tipo 2	35
8.3 Valoración histológica	39
9. Discusión de resultados.....	51
10. Conclusión	74
11. Bibliografía:.....	75
12. ANEXOS.....	87

Índice de figuras

Figura 1. Sistema renina-angiotensina aldosterona y propiedades de la Angiotensina II. Tomada y modificada de Brewster, U. & Perazella, M. (2004). (página 8)

Figura 2. La hiperglicemia conduce a la acumulación de precursores de glucólisis. Tomada y modificada de Toth- Manikowski S. & Atta, M. (2015). (página 10)

Figura 3. Categorías de filtrado glomerular y de albuminuria. Tomado y modificado de KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. (página 15)

Figura 4. Descripción general de las moléculas inflamatorias y las vías de señalización en la nefropatía diabética. Tomada y modificada de Navarro-González, J. F., et al., 2011. (página 19)

Figura 5. Valoración temporal de la zoometría. (página 27)

Figura 6. Validación del modelo Diabetes tipo 2. (página 28)

Figura 7. Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) de una sección de un corte de riñón del grupo control. (página 31)

Figura 8. Perfil lípidico

Figura 9. Fotomicrografías de glomérulo. (página 32)

Figura 10. Fotomicrografías de túbulo. (página 33)

Figura 11. Fotomicrografías de médula (página 35)

Figura 12. Evaluación de la expresión de IL-1B (A,D), IL-6 (B,E) e IL-10 (C,F) en glomérulo. (página 36)

Figura 13. Evaluación de la expresión de TNF- α (A, D), TGF- β (B, E) y MCP-1 (C, F) en glomérulo. (página 37)

Figura 14. Evaluación de la expresión de IL-1 β (A,D), IL-6 (B,E) e IL-10 (C,F) en túbulo. (página 38)

Figura 15. Evaluación de la expresión de TNF- α (A,D), TGF- β (B,E), MCP-1 (C,F) y KIM-1 en túbulo. (página 39)

Figura 16. Evaluación de la expresión de IL-6 (A, C) e IL-10 (B, D) en médula renal. (página 40)

Figura 17. Evaluación de la expresión de TGF- β (A, C) y MCP-1 (B, D) en médula renal. (página 41)

Figura 18. Evaluación de la expresión de TNF- α (A, C) y KIM-1 (B, D) en médula renal. (página 42)

Figura 19. Ciclo celular y enfermedad renal crónica asociada a fibrosis progresiva. Tomada y modificada de Ferenbach y Bonventre, Nat Rev Nephrol. (página 55)

Figura 20. Inflamación y enfermedad renal crónica asociada a fibrosis progresiva. Figura tomada y modificada de Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. Am J Physiol Renal Physiol (página 64)

Figura 21. Descripción general de la patogénesis de DN y biomarcadores asociados. Tomada y modificada de Campion CG, Sanchez-Ferras O and Batchu SN. Can J Kidney Health Dis. (página 67)

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación glomerular de la Nefropatía Diabética. Tomada y modificada de Roshan, B., 2013. (página 19)

Tabla 2: Biomarcadores urinarios para la evaluación de la nefropatía diabética. Tomado y modificado de Gluhovschi, C., *et al.*, 2016. (página 24)

Tabla 3. Caracterización sérica del modelo diabético tipo 2. (página 38)

Tabla 4. Caracterización urinaria del modelo diabético tipo 2. (página 38)

Tabla 5: Citoquinas involucradas en la inflamación renal diabética. (página 64)

Abreviaturas

FAO Organización para la alimentación y la agricultura.
FDI Federación internacional de Diabetes
ENT Enfermedades no transmisibles
OMS Organización mundial de la salud
DMG Diabetes mellitus gestacional
MODY Diabetes de la edad madura que se presenta en los jóvenes
ERC Enfermedad renal crónica
ND Nefropatía diabética
DT1 Diabetes tipo 1
DT2 Diabetes tipo 2
TGF Tasa de filtrado glomerular
Ang II Angiotensina II
ET-1 Endotelina 1
TGF-β1 Factor de crecimiento transformante beta
VEGF-A Factor de crecimiento endotelial vascular
PCK Proteína-quinasa C
AGEs Productos finales de glicación avanzada
MAPK Proteínas quinasas activadas por mitógeno
NADPH Nicotinamida-Adenina- Dinucleótido Fosfato reducido
NADP Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido Fosfato oxidado
NADH Nicotin adenin dinucleótido reducido
GMB Membrana basal glomerular
PAS Ácido peryódico de Schiff
ESRD Enfermedad renal en etapa terminal
eGFR Tasa de filtrado glomerular estimada
KIM-1 Molécula de lesión renal 1
IL-1 Interleucina 1

RAAS Sistema renina angiotensina aldosterona

HDLc Colesterol de alta densidad

LDLc Colesterol de baja densidad

VLDLc Colesterol de muy baja densidad

H&E Hematoxilina-eosina

PKB/AKT proteína cinasa B

IMC Índice de masa corporal

DHC Dieta hipercalórica

TOG Tolerancia oral a glucosa

RI Resistencia a insulina

TAG Triglicéridos

CT Colesterol total

FAA Ácidos grasos libres

TNF-alpha Factor de necrosis tumoral alpha

Smet Síndrome Metabólico

AVC Área bajo la curva

HbA1C Hemoglobina glicosilada

1.1 Nutrición y transición nutricional

La *nutrición* es el proceso por el cual el organismo ingiere, digiere, absorbe, transporta, utiliza y excreta las sustancias alimenticias, permitiendo el crecimiento y mantenimiento del organismo. En la actualidad, los problemas de salud relacionados con la nutrición tienen una gran relación con los excesos alimentarios ya que estos facilitan la aparición de obesidad, algunas enfermedades crónicas y determinados tipos de cáncer (Corio, R. 2009).

Los cambios demográficos, sociales y económicos en muchos países de ingresos bajos y medianos han conducido a una mayor urbanización y a cambios en el estilo de vida, los sistemas y los hábitos alimentarios, los cuales se han volcado hacia una transición en el consumo de alimentos altamente procesados e hipercalóricos, con un alto contenido de grasas saturadas, azúcares y sal, además de un bajo contenido de fibra (FAO, 2018).

Esta transición nutricional, cada vez más evidente, junto con la reducción del gasto energético, han contribuido a aumentos en la incidencia de obesidad y enfermedades no transmisibles, especialmente diabetes (Mickey Chopra, 2002).

1.2 Diabetes

La diabetes es una afección crónica que se produce cuando se dan niveles elevados de glucosa en sangre debido a una insuficiente producción de insulina o bien, el organismo no logra utilizar dicha hormona de modo eficaz. La principal característica de la diabetes es la hiperglicemia, de no controlarse, ésta puede provocar daños a largo plazo en diversos órganos, que conllevan al desarrollo de complicaciones sanitarias discapacitantes y peligrosas para la supervivencia, tales como enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía o enfermedades oculares que acaban en retinopatía y ceguera (FDI Diabetes Atlas, 2017).

La diabetes ha sido seleccionada como una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) para intervenir con carácter prioritario debido a que representa

un importante problema de salud pública. En las últimas décadas el número de casos y la prevalencia de la enfermedad han ido en aumento constante (OMS, 2016).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición la prevalencia de diabetes en México aumentó del 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016.

De acuerdo con la publicación de Diabetes Care, 2019, la diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales:

- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) : debido a una destrucción inmunitaria de la célula β) que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) : debido a una pérdida progresiva de secreción de insulina por parte de las células β (resistencia a la insulina).
- Diabetes mellitus gestacional (DMG) (diabetes diagnosticada en la semana 24 - 28 del embarazo que no fue claramente diabético antes de la gestación).
- Tipos específicos de diabetes por otras causas, p. ej., diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por fármacos o productos químicos (como el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH / SIDA o después del trasplante de órganos).

1.2.1 Diagnóstico

La diabetes puede diagnosticarse según los criterios de glucosa en plasma, ya sea el valor de glucosa en plasma en ayunas (FPG), el valor de glucosa en plasma de 2 h (PG de 2 h) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 75 g (OGTT) o bien, de acuerdo a los los criterios de hemoglobina glicosilada (HbA1C) (ADA 2019).

- Glucosa basal ≥ 126 mg/ dL (7.0 mmol / L) en ayuno de por lo menos 8 horas antes de la determinación.
- Glucosa posprandial de 2 horas ≥ 200 mg / dL (11.1 mmol / L) durante una curva de tolerancia oral a la glucosa. La prueba debe realizarse de acuerdo a lo descrito por la organización mundial de la salud (OMS), utilizando una

carga de glucosa que contenga el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

- HbA1c \geq 6.5% (48 mmol / mol).
- En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una glucosa plasmática aleatoria \geq 200 mg / dL (11.1 mmol / L).

1.2.2 Diabetes tipo 2

Como resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona, que se define como resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 (DM2) se caracteriza por una hiperglucemia crónica. La DM2 representa la mayoría de los casos de dicha afección, ésta se ve con más frecuencia en adultos mayores, sin embargo, en los últimos años ha aparecido cada vez con mayor frecuencia en niños, adolescentes y jóvenes adultos a causa del aumento de los niveles de obesidad, a la falta de actividad física y a las deficiencias de ciertos nutrientes que existen en la dieta (IDF Diabetes Atlas, 2017).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 se observó que, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en la población de 5 a 11 años fue de 33.2%; en adolescentes de entre 12 y 19 años fue de 36.3%; y finalmente para los adultos de 20 años y más, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 72.5%.

Todos los tipos de diabetes pueden provocar complicaciones en diversos órganos e incrementar el riesgo general de muerte prematura. Entre las posibles complicaciones se incluyen: ataques cardíacos (infarto agudo), accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal (nefropatía diabética), amputación de piernas, pie diabético, pérdida de visión y daños neurológicos (neuropatías) (OMS 2016).

1.3 Nefropatía Diabética

En pacientes con diabetes, la enfermedad renal crónica (ERC) podría tratarse de una auténtica nefropatía diabética (ND), o estar causada indirectamente por la diabetes, debido principalmente a la hipertensión. (IFD Diabetes Atlas, 2017)

La ND, una complicación microvascular importante de la DM1 y la DM2, es una causa importante de enfermedad renal en etapa terminal en los países occidentales. Tradicionalmente se pensaba que esta complicación era el resultado de las interacciones entre los factores hemodinámicos y metabólicos. Sin embargo, el conocimiento actual indica que la extensión del daño renal en pacientes con diabetes mellitus no se explica completamente por el aumento de la presión sistémica e intraglomerular secundaria a factores hemodinámicos y metabólicos; sino que la patogenia de la nefropatía diabética es multifactorial (Navarro J. et al., 2011).

La ND, es un síndrome clínico caracterizado por albuminuria persistente (≥ 300 mg / g de creatinina), un descenso de la tasa de filtrado glomerular (TFG), aumento de la presión arterial con mayor morbimortalidad cardiovascular. De igual forma se caracteriza por cambios estructurales en la morfología renal como engrosamiento de la membrana basal glomerular y las membranas tubulares, la acumulación de matriz mesangial en estas membranas causa fibrosis tubulointersticial y glomeruloesclerosis (Duran M., 2014).

De no ser detectada y tratada a tiempo, la ND, puede avanzar hasta generar insuficiencia renal crónica (falla completa o mayor de los riñones, misma que requiere de un tratamiento de diálisis). La diabetes es una de las principales causas de insuficiencia renal, entre 10 y 20 % de los pacientes con diabetes mueren por esta causa (Radica Z. et al., 2017).

1.3.1 Fisiopatología

El mecanismo detrás de la fisiopatología de la ND es complejo, a pesar del reconocimiento de la hiperglucemia como principal elemento determinante en su desarrollo, los mecanismos íntimos por los cuales la hiperglucemia conduce a la lesión renal, no son del todo claros. Sin embargo, existe la certeza de la participación fundamental de diversos procesos que confluyen para iniciar los cambios funcionales y estructurales a nivel renal, entre los mecanismos participantes se encuentran la interacción de las alteraciones hemodinámicas y metabólicas (González J., et al., 2008).

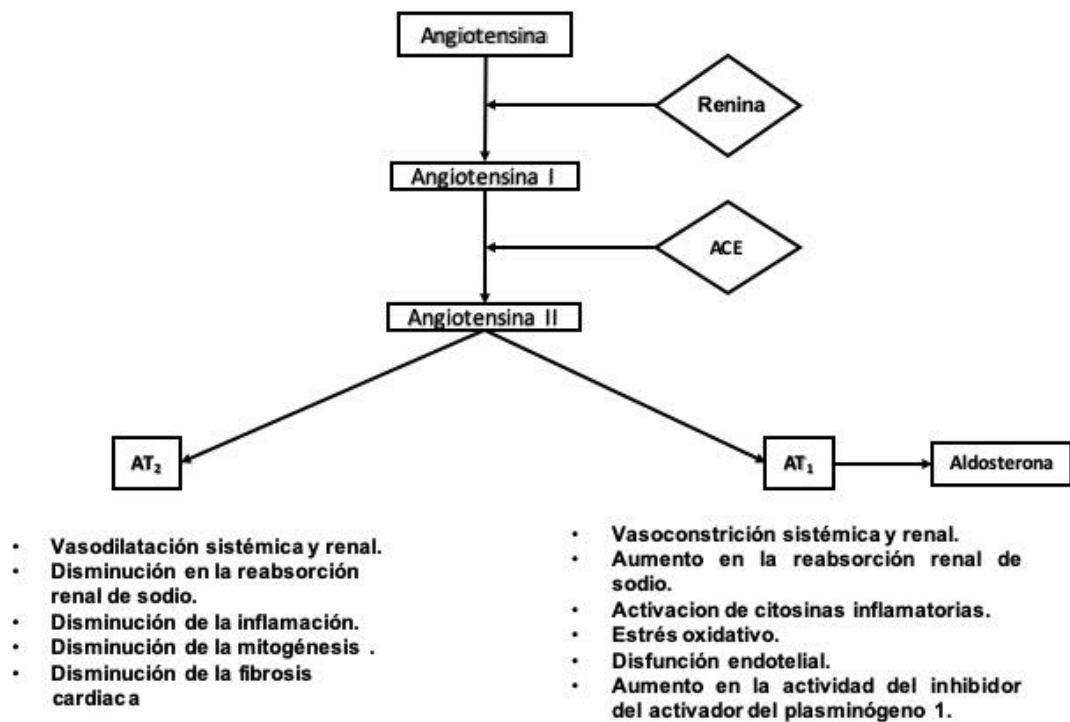


Figura 1. Sistema renina-angiotensina aldosterona y propiedades de la Angiotensina II. ACE = enzima convertidora de angiotensina; AT₁ = receptor de angiotensina II tipo 1; AT₂ = receptor de angiotensina II tipo 2. Tomada y modificada de Brewster, U. & Perazella, M. (2004).

Factores hemodinámicos

La figura 1 describe los cambios hemodinámicos renales, los cuales están mediados en parte por las acciones de las hormonas vasoactivas, como la angiotensina II (Ang II) y la endotelina (ET-1). En la ND los niveles elevados de Ang II causan hipertrofia de las células mesangiales y las células epiteliales tubulares (Chawla T., et al., 2010); debido a que, en respuesta, la secreción de citocinas profibróticas, como el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) aumenta, y con esto, se produce un aumento de la presión sistémica e intraglomerular.

Existen otros factores involucrados en esta regulación de la hemodinámica defectuosa, incluyendo prostanooides, óxido nítrico y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) Dronavalli S., et al., 2008).

Factores metabólicos

La hiperglucemia es un factor crucial en el desarrollo de la nefropatía diabética debido a sus efectos sobre las células glomerulares y mesangiales, pero por sí sola no es causante (Vallon, V., & Komers, R., 2011).

Se han postulado tres mecanismos (figura 2) que explican cómo la hiperglucemia causa daño al tejido renal: la glucosilación no enzimática que genera productos finales de glucosilación avanzada, la activación de la proteína-quinasa C (PKC) y la aceleración de la vía del poliol. (Sulaiman M. K., 2019)

ϕ *Productos finales de glicación avanzada (AGEs)*

Los azúcares reductores pueden reaccionar de manera no enzimática con los grupos amino de las proteínas para formar bases de Schiff reversibles, y luego productos Amadori. Estos primeros productos de glicación experimentan reacciones complejas adicionales como reordenamiento, deshidratación y condensación finalizando en derivados fluorescentes heterogéneos reticulados irreversiblemente denominados AGEs, cuando éstos se unen a su receptor, ubicado en células endoteliales, células mesangiales y macrófagos, pueden inducir la producción de citocinas y factores de crecimiento, por medio de la activación de del factor nuclear

de las cadenas ligeras kappa de las células B activada ($\text{NF}\kappa\text{B}$), lo cual induce un estado proinflamatorio y profibrotico en las células renales (Yamagishi S. & Matsui T., 2010; Setter, S. M., et al., 2003)

ϕ *Proteína C quinasa (PKC)*

La activación de PKC conduce a una mayor secreción de prostanoïdes vasodilatadores, lo que contribuye a la hiperfiltración glomerular. El mecanismo por el cual la hiperglucemia conduce a la activación de PKC implica la formación de *novo* de diacilglicerol y estrés oxidativo. La activación de PKC induce la actividad de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) en respuesta a estímulos extracelulares a través de la fosforilación dual en residuos conservados de treonina y tirosina (Yamagishi S. & Matsui T., 2010).

ϕ *Vía del poliol.*

La vía del poliol involucra dos reacciones enzimáticas: la primera es la reducción de glucosa a sorbitol por la acción de la aldosa reductasa y la segunda oxidación de sorbitol a fructosa por la acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa. El flujo a través de la ruta del poliol produce alteraciones importantes en la proporción de NADPH: NADP⁺. La reducción de glucosa a sorbitol usa NADPH y la oxidación de sorbitol aumenta NADH con un cambio rápido resultante en el estado redox citoplasmático que compromete la reducción de glutatión en las células con estrés oxidativo (Dunlop, M. 2000).

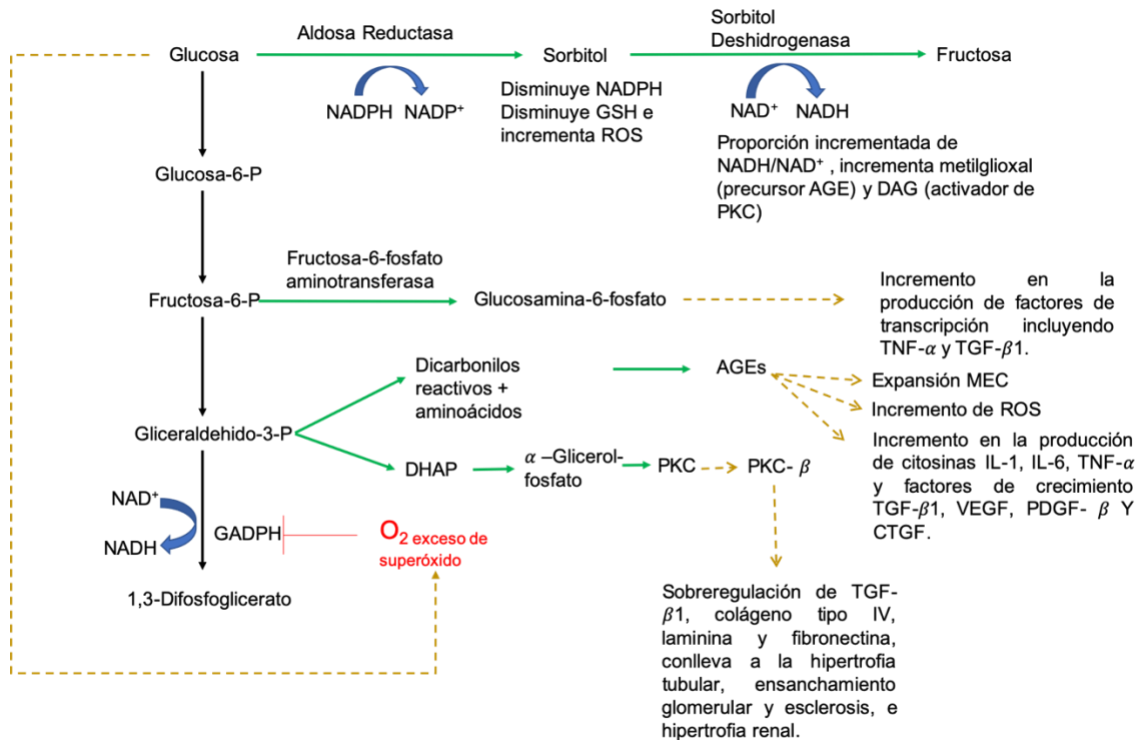


Figura 2. La hiperglicemia conduce a la acumulación de precursores de glucólisis. Los niveles aumentados de glucosa aumentan la vía de poliol, conllevan a la formación de AGEs, activación de la PCK y desvío hacia la ruta de hexosaminas. Tomada y modificada de Toth-Manikowski S. & Atta, M. (2015).

1.3.2 Cambios estructurales

La ND se puede diagnosticar con precisión mediante biopsia renal. La Sociedad de Patología Renal (The Renal Pathology Society) desarrolló una nueva clasificación de ND con la intención de proporcionar una forma consistente de asignar los resultados de la biopsia (tabla 1). Esta clasificación se basa en lesiones glomerulares, con una evaluación de lesiones intersticiales y vasculares. (Roshan, B., 2013)

Clase I: Engrosamiento de la membrana basal glomerular (GBM, por sus siglas en inglés)

El engrosamiento de GBM es un cambio temprano característico en la ND y aumenta con la duración de la enfermedad. El engrosamiento de GBM es una consecuencia de la acumulación de matriz extracelular, con una mayor deposición de componentes de la matriz extracelular normal como el colágeno tipo IV y VI, laminina y fibronectina. Dichas acumulaciones resultan del aumento de la producción de estas proteínas, su disminución de la degradación o una combinación de ambas (Tervaert, T.W., et al, 2010).

Clase II: expansión mesangial, leve (IIa) o severa (IIb).

La expansión mesangial se define como un aumento en el material extracelular en el mesangio de tal manera que el ancho del espacio intermedio excede dos núcleos de células mesangiales en al menos dos lobulillos glomerulares. La diferencia entre la expansión mesangial leve y severa se basa en si el área mesangial expandida es más pequeña o más grande que el área media de la luz capilar. Si se observa una expansión mesangial grave en más del 25% del mesangio total observado a lo largo de la biopsia, la biopsia se clasifica como IIb (Tervaert, T.W., et al, 2010).

Clase III: Esclerosis nodular (Lesiones de Kimmelstiel-Wilson)

Si se encuentra al menos una lesión convincente de Kimmelstiel-Wilson y la muestra de biopsia no tiene más del 50% de glomeruloesclerosis global, se clasifica como clase III. Las lesiones de Kimmelstiel-Wilson que se refieren a lesiones mesangiales focales, lobulares, de redondas a ovals con un núcleo acelular, hialino / matriz, redondeado periféricamente por núcleos mesangiales dispersos en forma de media luna (Tervaert, T.W., et al, 2010).

Clase IV: Glomeruloesclerosis diabética avanzada.

La biopsia muestra más del 50% de glomeruloesclerosis global. Es el punto final de los mecanismos multifactoriales que conducen a la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I, III y IV y la fibronectina en el espacio mesangial, que finalmente atraviesa las etapas de expansión y

desarrollo mesangial de las lesiones de Kimmelstiel-Wilson.(Tervaert, T.W., et al, 2010).

Lesiones tubulares

El engrosamiento de la membrana basal tubular de los túbulos no atróficos es evidente a partir del desarrollo de lesiones diabéticas glomerulares de clase II, siendo más visible en las clases III y IV, y se observa mejor en las tinciones ácido peryódico de Schiff (PAS) o plata. Además de observar la presencia de infiltrados de linfocitos T y macrófagos en el intersticio, los cuales son hallazgos ampliamente reconocidos en la ND (Tervaert, T. W. C., et al, 2010).

Lesiones vasculares

La hialinosis arteriolar eferente es una lesión importante por la cual la ND se distingue de la nefropatía hipertensiva. Además de la hialinosis arterial característica, en la muestra de biopsia puede estar presente una arteriosclerosis relativamente inespecífica (Tervaert, T. W. C., et al, 2010)

Tabla 1. Clasificación glomerular de la Nefropatía Diabética. Tomada y modificada de Roshan, B., 2013.

Clase	Descripción	Criterio de inclusión
I	Cambios no específicos o moderados en ML y engrosamiento de la MBG demostrada en ME.	La biopsia no cumple con los criterios mencionados para las clases II, III o IV. MBG > 395 nm en mujeres y > 430 nm en hombres de 9 años de edad y mayores.

IIa	Expansión mesangial moderada	La biopsia no cumple con los criterios de las clases III o IV.
IIb	Expansión mesangial severa.	Expansión mesangial moderada en >25% del mesangio observado.
III	Esclerosis nodular (Lesión Kimmelstiel-Wilson).	La biopsia no cumple con los criterios para la clase IV.
		Al menos una lesión convincente de Kimmelstiel-Wilson.
IV	Glomeruloesclerosis diabética avanzada.	Esclerosis glomerular global en >50% del glomérulo.
		Lesiones de las clases 1 a la 3.
ML: microscopia de luz. MBG: membrana basal glomerular. ME: Microscopio electrónico.		

1.3.3 Pérdida de la función renal

La ND tiene fases distintas de desarrollo, al inicio los cambios funcionales se producen en la nefrona a nivel del glomérulo, incluida la hiperfiltración e hiperperfusión glomerular (Dronavalli, S., et al., 2008). En la década de 1960, el desarrollo de una técnica de radioinmunoensayo permitió la cuantificación de

pequeñas cantidades de albúmina urinaria; posteriormente se demostró que la albuminuria en el rango de 15-70 mg / min podría predecir de manera “temprana” el desarrollo de ND (Rosolowsky, E., et al., 2008).

La pequeña cantidad de albúmina que escapa de un glomérulo sano es capturada por el borde en cepillo de las células del túbulo proximal y, por lo tanto, se impide que ingrese a la orina. En pacientes diabéticos, la albúmina presente en la orina puede provenir de muchas nefronas que pierden una pequeña cantidad de proteína o de una pequeña cantidad de nefronas que pierden una gran cantidad de proteína, en cualquier escenario esto implica un grado relativamente uniforme de daño funcional y estructural (Powell, D., et al., 2013).

Conforme al desarrollo de la ND el aumento de diferentes tipos de colágeno sustituyendo gradualmente a los tipos de colágeno fisiológicamente presentes en el riñón y el desarrollo hacia la glomeruloesclerosis, se hacen más evidentes (Lehmann, R., & Schleicher, E. D., 2000).

La fibrosis renal es comúnmente el resultado final de las enfermedades renales progresivas. Se caracteriza por el desarrollo de placas de matriz extracelular excesivas en el intersticio tisular que comprometen la función renal y provocan atrofia tubular e insuficiencia orgánica (Grabias, B. M., & Konstantopoulos, K., 2014).

1.3.4 Valoración de la función renal

La ND es la causa más común de ERC en todo el mundo. Las estrategias actuales de tratamiento pueden disminuir, pero en la mayoría de los casos no pueden detener la progresión hacia los estados finales de la enfermedad renal.

La ERC es una afección común que se refiere a una pérdida a largo plazo de la función renal. La identificación y el manejo efectivos son necesarios para prevenir la progresión de la ERC; esta se clasifica por el grado de disfunción renal, medido por la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR, por sus siglas en inglés), derivada de la creatinina sérica, se usan ecuaciones de estimación estándar, y por

la presencia o ausencia de anormalidad estructural del riñón o por otra evidencia de daño renal crónico, particularmente por el ratio albúmina/creatinina urinaria. (Fraser, S., & Blakeman, T. 2016).

En 2012 la organización KDIGO resumió las etapas de la ERC utilizando un sistema de estadificación de "semáforo" que incorpora tanto el eGFR basado en creatinina como el ratio albúmina/creatinina urinaria (figura 3).

KDIGO 2012 Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1.72 m ²)			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
			<30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	>300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	≥90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	<15			

Figura 3. Categorías de filtrado glomerular y de albuminuria. Verde: bajo riesgo (si no hay otros marcadores de enfermedad renal, sin ERC); Amarillo: riesgo moderadamente aumentado; Naranja: alto riesgo; Rojo, muy alto riesgo. KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Tomado y modificado de KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.

La Asociación Americana de Diabetes y los Institutos Nacionales de Salud recomiendan la tasa estimada de filtración glomerular calculada a partir de la creatinina sérica al menos una vez al año en todas las personas con diabetes para detectar la disfunción renal. El eGFR sigue siendo un predictor independiente y significativo, sin embargo, existen otros marcadores (Tabla 2) que han tomado relevancia en el diagnóstico del daño renal, entre los cuales destacan:

- *Cistatina-C*: una proteína básica no glicosilada, como un posible marcador de filtración endógena de GFR. La cistatina-C es un inhibidor de la cisteína proteasa que es producido por prácticamente todas las células nucleadas que se libera al torrente sanguíneo. Esta molécula es completamente filtrada por el glomérulo y metabolizada en el túbulo proximal. Debido a su fisiología sus concentraciones no se ven afectadas por el sexo, la edad o la masa muscular. (Dabla, P. K. 2010)
- *β -2-microglobulina*: es un componente del antígeno de histocompatibilidad principal. Al acoplarse con el receptor Fc neonatal, ayuda a regular los niveles séricos de inmunoglobulina G, albúmina y hepcidina. Se filtra en el glomérulo y el 99,9% se reabsorbe por el túbulo proximal, siguiendo la misma dinámica que la cistatina-C, esto permite la evaluación funcional tanto del glomérulo como de los túbulos renales. (Barton, K. T., et al., 2018)
- *Molécula de lesión renal-1 (KIM-1)*: es una proteína transmembrana que se regula positivamente en las células del túbulo proximal. Representa un biomarcador prometedor para el diagnóstico temprano de la enfermedad renal.
- *Proteína hepática de unión a ácidos grasos (L-FABP)*: L-FABP es una proteína expresada en el túbulo proximal. (Devarajan, P., 2011)
- *Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)*: es una pequeña proteína circulante altamente modulada en una amplia variedad de situaciones patológicas, lo que la convierte en uno de los mejores de lesión renal, ya que se libera rápidamente después del daño tubular.

Tabla 2: Biomarcadores urinarios para la evaluación de la nefropatía diabética. Tomado y modificado de Gluhovschi, C., et al., 2016.

Biomarcadores glomerulares		Biomarcadores tubulares	
Transferrina		Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)	
Inmunoglobulina G		Alfa-1-microglobulina	
Ceruloplasmina		N-acetil- β -D glucosaminidasa	
Colageno tipo IV		Angiotensinógeno	
Laminina	Albuminuria	Cistatina C	
Glicosaminoglicanos	El marcador principal en uso actual	Nefrina, proteína de unión a ácidos grasos tipo hígado	
Prostaglandina D sintasa tipo lipocalina		Proteína de unión a la grasa del corazón	
Fibronectina		Productos finales de glicación avanzada	
Factor de crecimiento endotelial vascular / VEGF			

Biomarcadores inflamatorios	Otros marcadores nuevos en estudio	Biomarcadores de estrés oxidativo
Factor de necrosis tumoral alfa	Retinol vinculante proteína-4	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
Orosomucoide	Proteína de unión a la vitamina D	
	Hemo oxigenasa-1	
	Periostina	
	Alpha klotho	
	Dipeptidilo unido a microvesícula	
	peptidasa IV	
	MicroRNA	

1.4 Inflamación en la nefropatía diabética

La investigación realizada durante los últimos 10 años ha proporcionado información sobre la etiología de la ND a nivel celular y molecular (figura 4), en este sentido, la inflamación se ha convertido en un mecanismo fisiopatológico clave. Las moléculas y mediadores inflamatorios son, por tanto, importantes en las primeras etapas de la enfermedad renal diabética (Navarro-González JF et al., 2011).

Las células renales (células endoteliales, epiteliales, mesangiales y tubulares) son capaces de sintetizar citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 y, por lo tanto, estas citocinas actúan en forma paracrina o autocrina induciendo una variedad de efectos en diferentes estructuras renales (Donate, J., et al., 2015).

Citocinas proinflamatorias

TNF- α

Induce la expresión de una variedad de moléculas efectoras, como las citocinas y las moléculas de adhesión, apoptosis y necrosis. Esta citocina juega papel fundamental en la patogénesis de la nefropatía diabética a través de citotoxicidad,

apoptosis, necrosis y aumento de la permeabilidad de las células endoteliales. Las concentraciones séricas y urinarias de TNF- α están relacionadas con la progresión de la enfermedad en pacientes con ND (Shikata, K., & Makino, H., 2013).

Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM-1)

Es una glucoproteína de la superficie celular de la superfamilia de inmunoglobulinas, expresada en células endoteliales vasculares, linfocitos, macrófagos activados y células endoteliales, epiteliales y mesangiales renales. La expresión de ICAM-1 puede ser inducida localmente por hiperglucemia, AGE, estrés oxidativo, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, y participa en la activación de los leucocitos, la adherencia al endotelio y promueve la infiltración de macrófagos (Lenz, O. et al., 2008).

TGF- β 1

Es inducido por la hiperglucemia en las células mesangiales y juega un papel clave en la fibrosis mesangial y la hipertrofia al aumentar la expresión de proteínas de matriz extra celular, como el colágeno y la fibronectina. De igual forma puede activar proteínas quinasas activadas por mitógeno, como p38 y ERK, también Akt mediante la inhibición de PTEN. (Kato, M., & Natarajan, R., 2014).

IL-1

Está implicada en el desarrollo de anormalidades hemodinámicas intraglomerulares relacionadas con las vías de prostaglandina; así como con la generación de hialuronato desregulada por las células epiteliales tubulares proximales renales, que aumenta directamente la permeabilidad de las células endoteliales vasculares.

Uno de los principales elementos implicados en esta reacción inflamatoria es el factor nuclear κ B (NF- κ B), un factor de transcripción ubicuo que se activa por muchos estímulos relevantes para la nefropatía diabética. Parte de la importancia de NF- κ B en la regulación de las respuestas celulares es que está continuamente presente en las células, aunque en estado inactivo. Por lo tanto, la activación de las vías río abajo de NF- κ B no requiere una nueva síntesis de esta proteína, lo que

permite que NF- κ B actúe como respuesta primaria a los estímulos celulares dañinos (Navarro-González, J. F., et al., 2011).

Las anomalías en el metabolismo y la hemodinámica desencadenan la activación de numerosas moléculas y vías inflamatorias en el riñón diabético, que en conjunto explican cómo estas anomalías se traducen en daño renal funcional y estructural (figura 4). Este nuevo concepto de ND como enfermedad inflamatoria es muy importante desde una perspectiva terapéutica (Navarro-González, J. F., et al., 2011.)

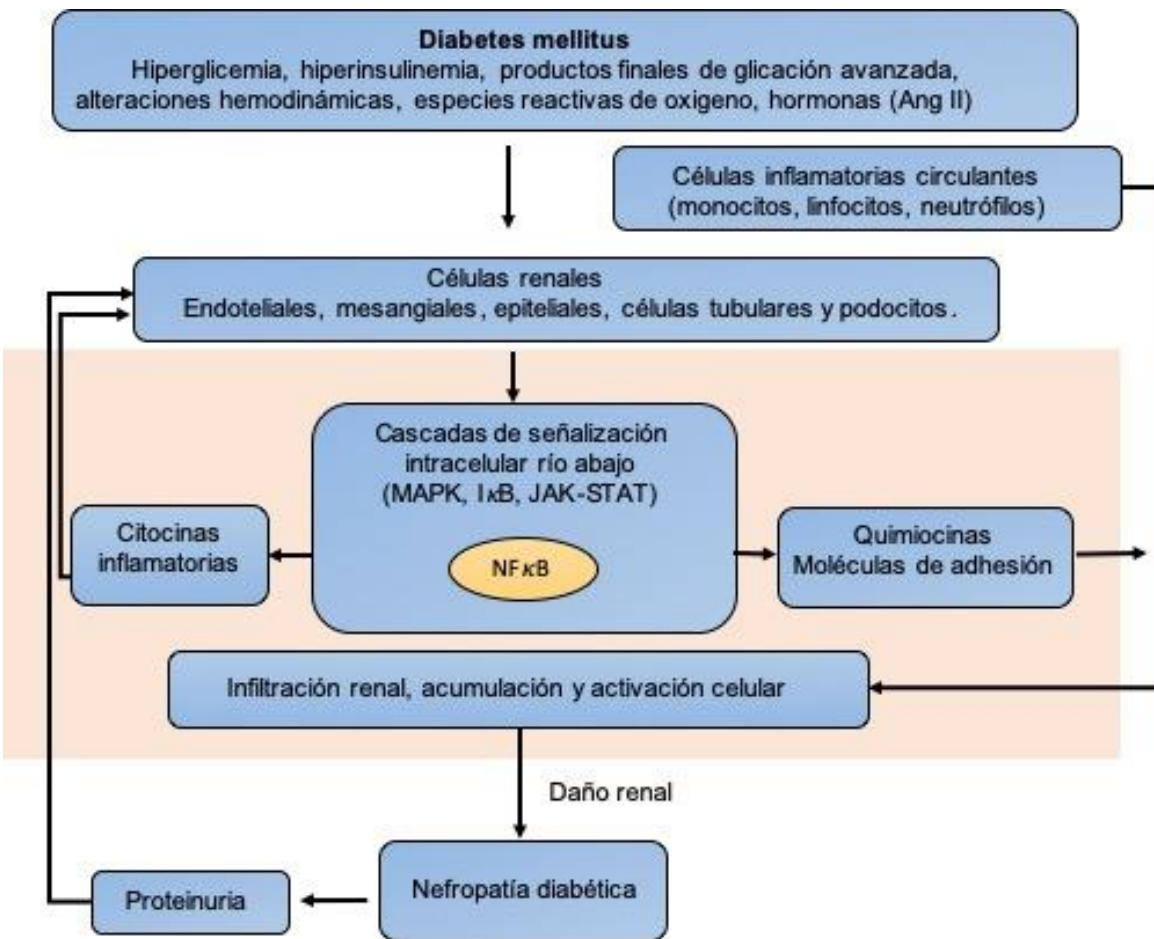


Figura 4. Descripción general de las moléculas inflamatorias y las vías de señalización en la nefropatía diabética. La activación de estas vías de señalización resulta en infiltración por las células inflamatorias circulantes, lo que amplifica el proceso inflamatorio en el riñón y finalmente resulta en el desarrollo y la progresión de la nefropatía diabética. Tomada y modificada de Navarro-González, J. F., et al., 2011.

1.5 Modelos de estudio

Los modelos animales, específicamente los modelos murinos, se han convertido en el modelo experimental de elección para estudios preclínicos de trastornos humanos en muchos campos, incluida la investigación en la diabetes. Si bien existen muchos modelos de obesidad y diabetes inducidos por dietas ricas en grasas, la creciente apreciación de la contribución de las dietas de alto índice glucémico en el desarrollo de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina resalta el requisito de modelos animales que representen más estrechamente los patrones dietéticos globales que reflejan la sociedad moderna. (Azushima, K., et al., 2017)

La disponibilidad de modelos animales relevantes de DM2 es fundamental para dilucidar la complejidad de los mecanismos patogénicos subyacentes a esta enfermedad y las implicaciones que esto tiene en la susceptibilidad a las complicaciones de la propia enfermedad (Morris, J. L., et al., 2016).

El modelo utilizado en este proyecto, ya se ha establecido con anterioridad por nuestro grupo de trabajo.

Por medio de una dieta hipercalórica-hiperglúcida, se estableció un modelo con características asociadas a la DM2. Así mismo este modelo presenta alteraciones histológicas propias de una ND como: disminución en el espacio de Bowman, cierre de la luz tubular e hiperplasia, esclerosis y fibrosis (Palafox, A. C., 2017)

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

De acuerdo con la federación internacional de diabetes (IFD), la diabetes se encuentra entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial por enfermedades no transmisibles (ENT). Uno de los principales potenciadores del problema de la diabetes es que entre un 30 y un 80 % de las personas con diabetes no están diagnosticadas.

La diabetes aumenta el riesgo de muchos problemas de salud graves. Sin el tratamiento adecuado y los cambios de estilo de vida recomendados, muchas personas con diabetes pueden desarrollar complicaciones de entre las cuales se destaca la ND..

La ND es una complicación grave que ocurre en un 20% a 40% de todos los diabéticos y es la principal causa de la ERC. Actualmente en nuestro país el costo del tratamiento para los pacientes con ERC es desproporcionadamente alto y de tendencia creciente.

La ERC por lo general se inicia sin que su portador lo sepa y transcurre incluso durante años, ya que desde el punto de vista de los síntomas puede pasar desapercibida y sólo se detecta de manera temprana si se realizan pruebas de laboratorio pertinentes.

La interacción entre factores metabólicos y hemodinámicos ha sido considerada el elemento central en el desarrollo de la lesión renal en la DM, sin embargo, la relación entre inflamación y las complicaciones, específicamente el desarrollo de nefropatía, se ha vuelto un tema de gran interés, pero que no se han entendido completamente en las diferentes etapas de desarrollo y progresión de la nefropatía.

3. JUSTIFICACIÓN

La ND es uno de los principales determinantes de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes. De no ser detectada y tratada a tiempo, la ND puede avanzar hasta generar ERC; se sabe que entre 10 y 20% de los pacientes con diabetes mueren por esta causa y su tratamiento a través de hemodiálisis o diálisis peritoneal, constituyen una carga económica considerable de gasto en salud.

Debido a que la hiperglucemia crónica y la hipertensión, en el caso de la DT2, son claves en el desarrollo de la ND, durante mucho tiempo el tratamiento para esta enfermedad se centró en el control glucémico y el bloqueo del sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), sin embargo, no siempre se evita la progresión final hacia la ESRD.

Los mecanismos moleculares patológicos de la ND han tomado relevancia como herramientas para el diagnóstico precoz, la prevención del inicio y la progresión de la enfermedad. Actualmente las estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad, se centran en las vías renales intrínsecas que intervienen con la señalización intracelular de las vías antiinflamatorias.

Ciertamente la inflamación juega un papel importante en la patogénesis de la ND y una mejor comprensión de la respuesta inflamatoria en los riñones diabéticos puede ayudar a identificar nuevas estrategias antiinflamatorias para el posible tratamiento; ya que a pesar del reconocimiento de la hiperglucemia como condición necesaria y elemento determinante para el desarrollo de la ND, los mecanismos por los cuales conduce a la lesión renal no resolutiva positivamente, siguen siendo desconocidos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la inflamación sobre la estructura y función renal en rata Wistar en un modelo con nefropatía diabética.

Objetivos Específicos

En ratas macho de la cepa Wistar con 3 meses de edad:

1. Evaluar la estructura renal
2. Evaluar la función renal
3. Valorar el estado nefro inflamatorio

5. HIPOTESIS

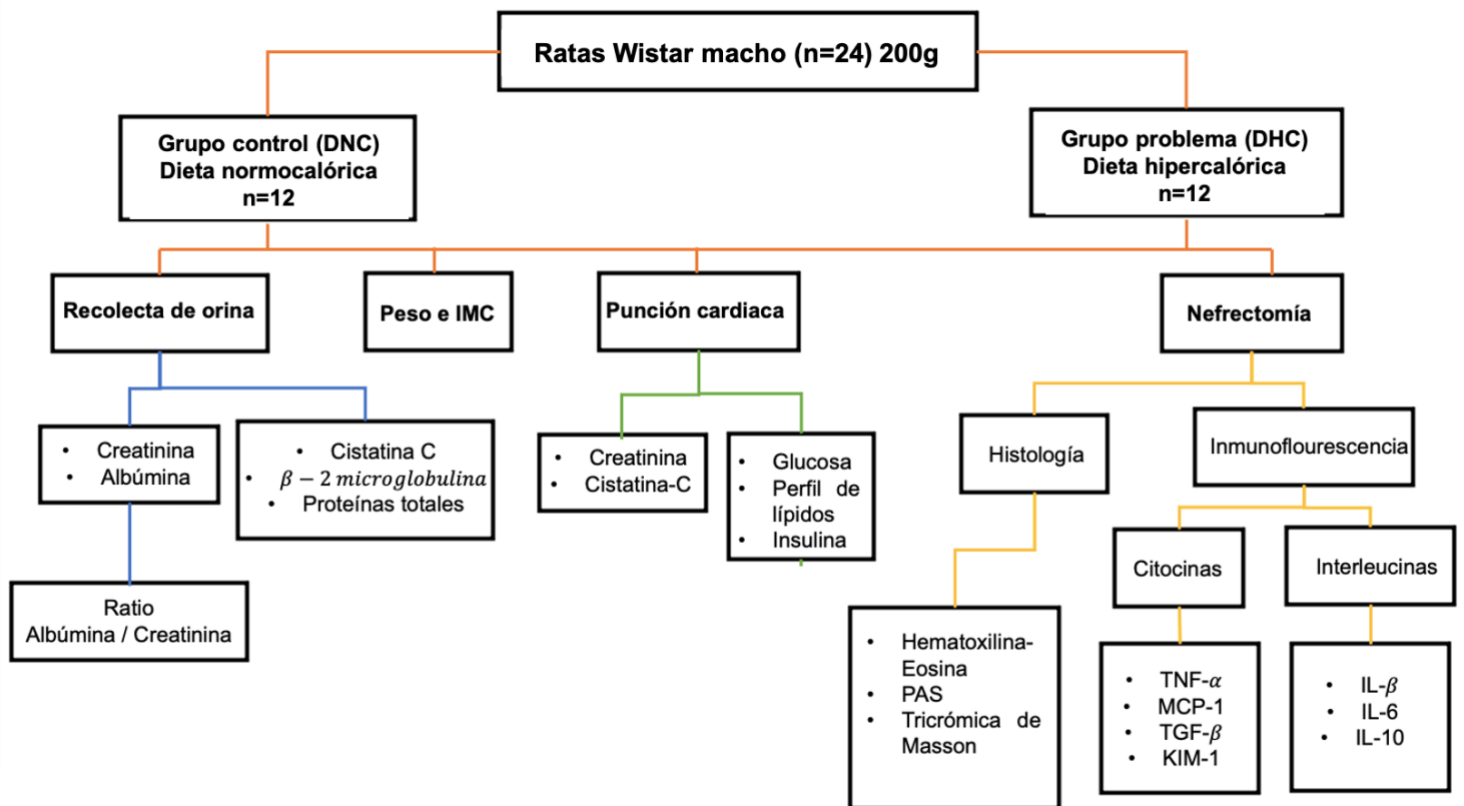
Hipótesis nula

El síndrome diabetogénico no genera una respuesta inflamatoria sobre la nefrona, ni cambios funcionales y estructurales en el riñón de rata Wistar.

Hipótesis alternativa

El síndrome diabetogénico genera una respuesta inflamatoria sobre la nefrona y cambios funcionales y estructurales en el riñón de rata Wistar.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. METODOLOGÍA

7.1 Métodos

Animales

Rata macho Wistar (190-210 gr) provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que se mantuvieron en condiciones controladas de acondicionamiento con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura de 19-26°C, con disponibilidad de alimento y agua "*Ad libitum*", mantenidas bajo las consideraciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los animales fueron divididos en 2 grupos: El grupo alimentado con dieta normocalórica [DNC, n=6] y el grupo con dieta hipercalórica [DHC, n=6]. El grupo DHC se mantuvo desde los 200 g con su respectiva dieta para iniciar con su inducción, la cual fue de 3 meses. [Composición de las dietas ver anexo 1]

Obtención de muestra sanguínea y muestra de orina

La muestra sanguínea fue tomada por punción cardíaca en la rata anestesiada con una mezcla de Ketamina y Xilazina .02 mL/ 100g por vía intraperitoneal, posteriormente fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos, posteriormente el suero fue almacenado a -70° hasta su análisis. Para la recolección de orina, los animales se mantuvieron dentro de jaulas metabólicas durante 24 h en cadena de frío durante ese lapso, las muestras se centrifugaron a el sobrenadante se separo y fue almacenado a -70°, hasta su análisis.

Por kits comerciales y el espectrofotómetro Biosystems (A-15) se realizaron las determinaciones en suero de glucosa, proteínas totales, ácidos grasos libres, creatinina, triglicéridos, colesterol, colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDLc), colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDLc), el colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLc) y de las determinaciones en orina de

albúmina, creatinina y proteínas totales. Las determinaciones de cistatina-C sérica y urinaria se determinaron por inmunoensayo acoplado a cromatografía lateralizada de capa fina, mediante reactivos y equipos de la casa comercial i-Chroma. Por prueba de ELISA se cuantificó la insulina sérica y β 2-microglobulina, mediante kits comerciales (Diagnóstica internacional, México) y un lector modelo StatFax 2600 (WinerLab, Argentina).

Curva de tolerancia oral a la glucosa

Para la realización de la curva de tolerancia oral a la glucosa, se les suspendió el consumo de agua y alimento de 4 a 5 horas antes de comenzar. Se anestesiaron a las ratas con una mezcla de Ketamina y Xilazina 0.2 mL/100g por vía intraperitoneal, se les tomó la muestra mediante punción cardiaca y se les realizó una extracción de 700 μ L de sangre, recolectadas en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Seguido de esto, se procedió a realizar las curvas de tolerancia oral a la glucosa en ayuno, recolectando las muestras en tubo eppendorf a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de la carga de glucosa de 1.75 g/kg de peso. [Ver Anexo..]

Histología

Se anesteció a cada uno de los animales con Ketamina y Xilazina 0.2 mL/100g de cada grupo y fueron perfundidos con solución salina isotónica, a la extracción de los riñones, el correspondiente del lado derecho de la rata se cortó longitudinalmente, mantenido en refrigeración en formalina bufferada al 4%. Posteriormente se realizó el proceso de deshidratación y embebido en parafina de los tejidos, lo que nos permitió obtener los bloques del tejido, después se seccionaron en cortes de 5 μ m de grosor, con ayuda de un microtomo y se montaron en laminillas para posteriormente ser analizados.

Para cada una de las laminillas se realizaron las siguientes tinciones: Hematoxilina-Eosina (H-E), Tricómico de Masson (TM) y Ácido peryódico de Schiff (PAS).

Después se observaron y analizaron las estructuras renales, mediante microscopia de campo claro, de la siguiente manera:

- Análisis glomerular: Se tomaron en total 75 fotografías de diferentes glomérulos ubicados en la región de la corteza renal en un aumento de 40x para cada uno de los grupos experimentales.
- Análisis tubular: Se tomaron en total 75 fotografías de diferentes túbulos ubicados en la región de la corteza y médula renal en un aumento de 40x para cada uno de los grupos experimentales.

En lo que respecta al análisis de la evaluación inflamatoria, ésta se realizó mediante una reacción antígeno-anticuerpo con marca fluorescente. De esta manera se evaluó la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , TGF- β 1 y KIM-1 en glomérulo, túbulo y médula renal. Se tomaron fotos de las inmunofluorescencias con un microscopio OLYMPUS BX41 a 60x, manteniendo las mismas condiciones de exposición en los dos grupos experimentales. Para el análisis densiométrico estas se examinaron con el programa ImageJ, mediante la transformación a escala de grises y el posterior análisis de píxeles. Para ello se construyeron curvas de calibración de píxeles para cada una de las marcas de interés. Para las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) y se evaluaron e interpretaron por análisis estadístico "t" de Student.

8. RESULTADOS

8.1 Determinaciones Zoométricas

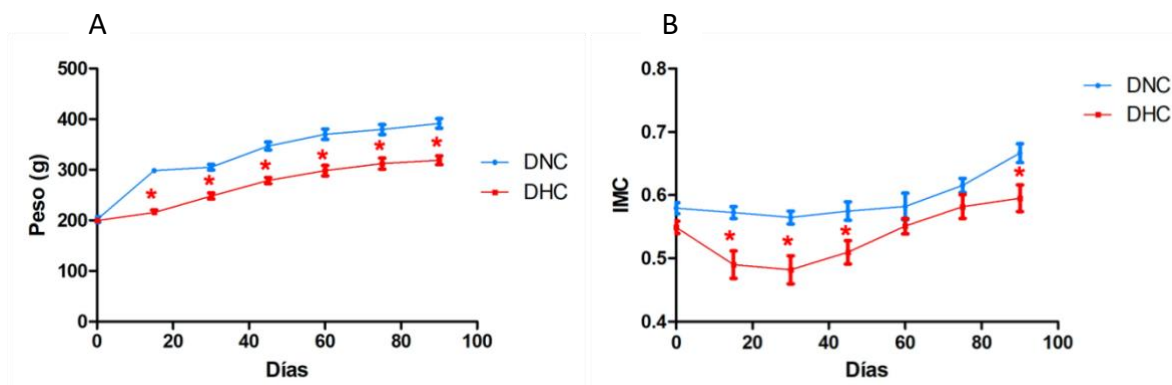


Figura 5. Valoración temporal de la zoometría. (A) Peso; (B) Índice de masa corporal. grupo normocalórico (DNC); grupo hipercalórico (DHC). Los resultados de los parámetros zoométricos se representan como el promedio de 12 experimentos separados \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo DNC con $p \leq 0.05$ por una prueba "t" de student.

En la figura 5 se muestra la valoración de la zoometría (Peso e IMC) durante 90 días, una vez iniciado el tratamiento. Se observa que ambos grupos aumentan de peso constantemente, sin embargo, el grupo DHC a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días, disminuye en el peso de manera significativa un 28%, 18%, 22%, 21%, 21% y 19% respectivamente, en comparación con el grupo control (DNC). Asimismo, el IMC del grupo DHC sufre cambios significativos a los 15 (19%), 30 (14%), 45 (17%) y a los 90 días (11%), no habiendo diferencia significativa entre los días 60 y 75.

8.2 Modelo Diabetogénico tipo 2

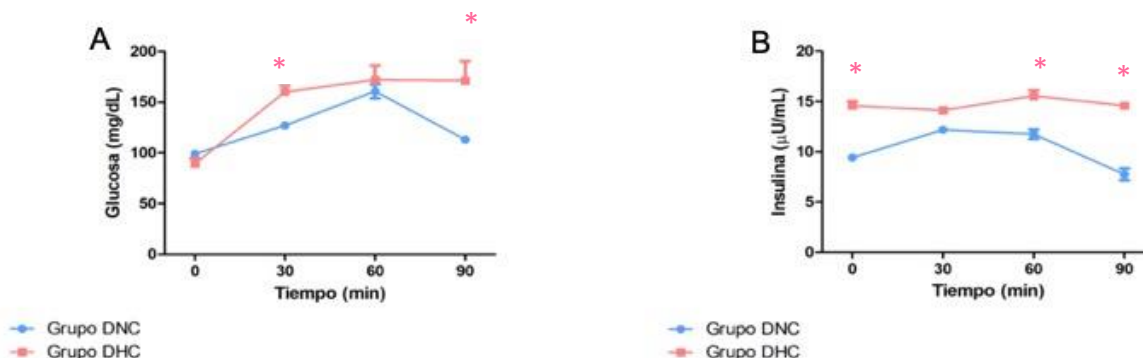


Figura 6. A) Curva de tolerancia oral a la glucosa y B) respuesta a la insulina del modelo diabético tipo 2. Los resultados mostrados son el promedio de 12 experimentos separados \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo DNC con $p \leq 0.05$ por una prueba "t" de student.

La prueba de tolerancia oral a glucosa (TOG) es una de las principales herramientas para el diagnóstico de DT2 y resistencia a insulina (RI). La Figura 6A - B, muestra los gráficos de la curva de TOG (A) con su respectiva respuesta de insulina (B) a los tiempos 0, 30, 60 y 90 min. En la gráfica A podemos observar que los niveles de glucosa inician entre 90-100 mg/dL, posteriormente la curva alcanza un pico máximo no mayor a 200 mg/dL entre los 30-60 min, finalmente la curva comienza a regresar a condiciones basales a partir del minuto 90. La respuesta de insulina del grupo DHC al minuto 0, 60 y 90 aumentó de manera significativa, con respecto al grupo control, un 55%, 32% y 89% respectivamente, por lo cual el grupo DHC se mantiene en un estado hiperglucémico - hiperinsulinémico.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros que hacen referencia al perfil lipídico. La concentración de FFA tuvo un incremento del 220% con respecto al grupo control, por otro lado, la concentración TAG en el grupo problema (DHC) tuvo un incremento del 29% en comparación con el grupo control (Figura 8A, 8D). La concentración de CT no se ve afectada en el grupo problema en comparación del grupo control. Sin embargo, se observa una distribución diferente en cuanto a la composición de las lipoproteínas evaluadas en el grupo problema. Ya que se observa un incremento del 36% y 29% en la concentración de las LDL (Figura 8 C) y VLDL (Figura 8F), respectivamente. Mientras que en la concentración de las HDL (Figura 8E) se observa el efecto contrario al haber un decremento del 37% con respecto al grupo control.

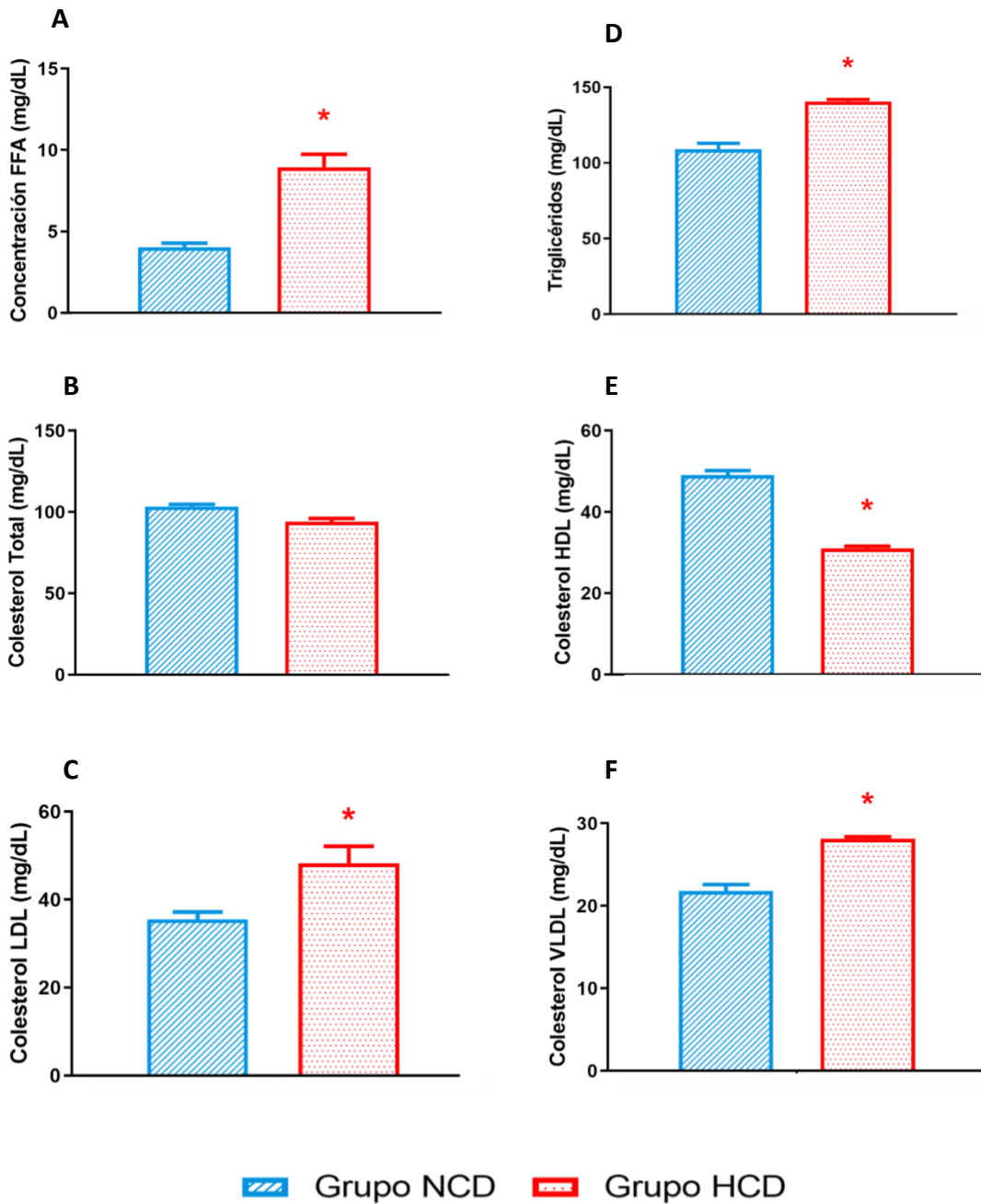


Figura 7. Perfil lipídico en condiciones de ayuno. (FFA) Acidos grasos libres, (TAG) Triglicéridos, (CT) Colesterol Total, HDL Colesterol (HDL), LDL Colesterol (LDL), VLDL Colesterol (VLDL). Los resultados mostrados son el promedio de 12 experimentos separados \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo DNC con $p \leq 0.05$ por una prueba "t" de student.

Tabla 3. Caracterización sérica del modelo diabético tipo 2

ANALITO	90 días	
	Grupo DNC	Grupo DHC
Creatinina sérica (mg/dL)	0.80±0.054	0.68±0.045
Cistatina C sérica (mg/L)	0.86 ± 0.065	1.11± 0.065 ↑

Los resultados mostrados son el promedio de 12 experimentos separados ± EEM. (↑) Indica diferencia significativa con respecto al grupo DNC con $p \leq 0.05$ por una prueba "t" de student.

Tabla 4. Caracterización urinaria del modelo diabético

ANALITO	90 días	
	Grupo DNC	Grupo DHC
Creatinina (mg/dL)	31.00±11.11	21.00±2.817
Cistatina C (mg/L)	0.2583±0.02868	1.198±0.1802 ↑
$\beta 2$ microglobulina pg/mL	337.1±20.32	1773±152.2 ↑
Albúmina mg/L	1.433±0.3730	8.517±1.487 ↑
Albúmina/ creat (mg/g)	5.428±0.6202	40.16±2.187 ↑
Proteínas/ creat (mg/g)	13.96±2.787	668.4±252.3 ↑

Los resultados mostrados son el promedio de 12 experimentos ± EEM. (↑) Indica diferencia significativa con respecto al grupo DNC con $p \leq 0.05$ por una prueba "t" de student.

Para evaluar la función renal se midieron las concentraciones plasmáticas de creatinina y cistatina-C (Tabla 3). La creatinina medida en el grupo con DHC no presenta cambios estadísticamente significativos con respecto al control; por otra parte, la concentración de cistatina-C en el grupo tratado con DHC, muestra un aumento de 30% con respecto al control.

En la tabla 4 se muestran las concentraciones urinarias de varios marcadores de daño renal. La creatinina no tuvo diferencia significativa; por otro lado, la cistatina C en el grupo tratado con DHC aumentó un 380% con respecto al control; β 2-microglobulina tuvo un aumento de 426% y la albúmina aumentó 507%. En relación al ratio albúmina/creatinina y el ratio proteínas/creatinina estos aumentaron 640% y 4674%, respectivamente.

8.3 Valoración histológica

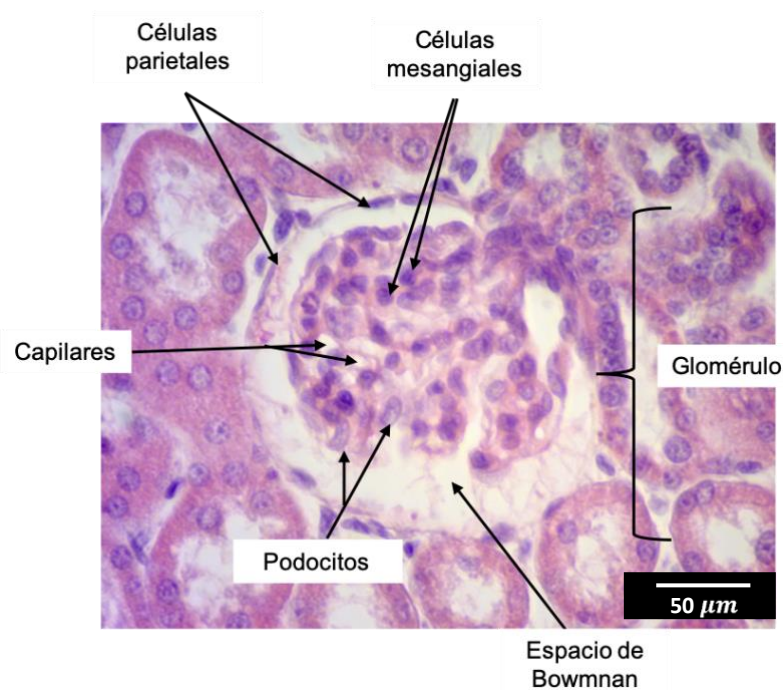


Figura 8. Tinción Hematoxilina-Eosina (HE) de una sección de un corte de riñón del grupo control con las estructuras señaladas (Glomérulo, capilar, espacio de Bowman, células parietales, células mesangiales y podocitos).

En la Figura 8 se presenta una fotomicrografía representativa del grupo control de en el cual se señalan las estructuras: el glomérulo, podocitos, el espacio de Bowman, las células parietales, mensangiales y los capilares.

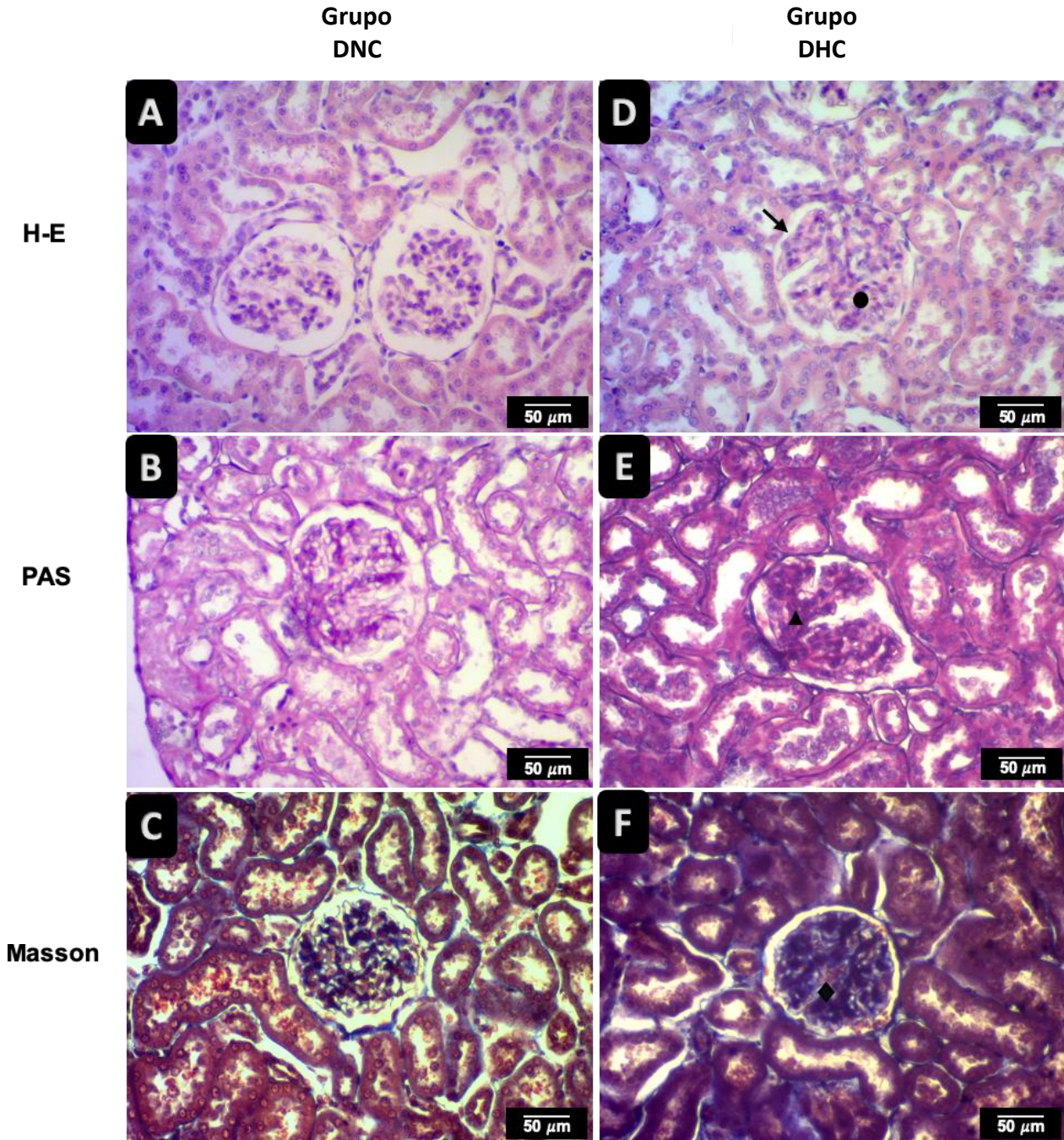


Figura 9. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) [A, D]. Hiperplasia (●), Reducción del Espacio de Bowman (→). Tinción PAS [B, E]. Incremento de la matriz mesangial (▲). Tinción Tricrómica de Masson [C, F]. Aumento de fibrosis (◆) .

En las fotomicrografías de la Figura 9, podemos observar que el grupo control (Fig. 9A) muestra una estructura glomerular intacta, mientras que el grupo problema (Fig. 9D) muestra evidencias de hiperplasia glomerular y una notable reducción en el espacio de Bowman.

Con el análisis histológico de la técnica PAS podemos observar un incremento de la matriz mesangial (Fig. 9E) con respecto al grupo control (Fig. 9B). Las lesiones ocasionadas en el tejido renal se ponen de manifiesto con la tinción Tricrómica de Masson (Fig. 9C,F), el grupo tratado con la DHC (Fig. 9F) se observa un incremento en la cantidad de colágeno (esclerosis) en la cápsula como en el glomérulo, con respecto al grupo control (Fig. 9C).

En las fotomicrografías de la Figura 10, podemos observar que el grupo control (Fig. 10A) muestra una estructura tubular intacta, mientras que el grupo problema (Fig. 10D) muestra evidencias de hiperplasia e hipertrofia, se observa una disminución en la luz tubular.

En las fotomicrografías con tinción PAS podemos observar un incremento en la acumulación de matriz extracelular (Fig. 10E) con respecto al grupo control (Fig. 10B). Las lesiones ocasionadas en el tejido renal se ponen de manifiesto con la tinción Tricrómica de Masson (Fig. 10 C,F), en el grupo tratado con la DHC (Fig. 9F) se observa un incremento en la cantidad de colágeno en los túbulos de corteza, con respecto al grupo control (Fig. 10C).

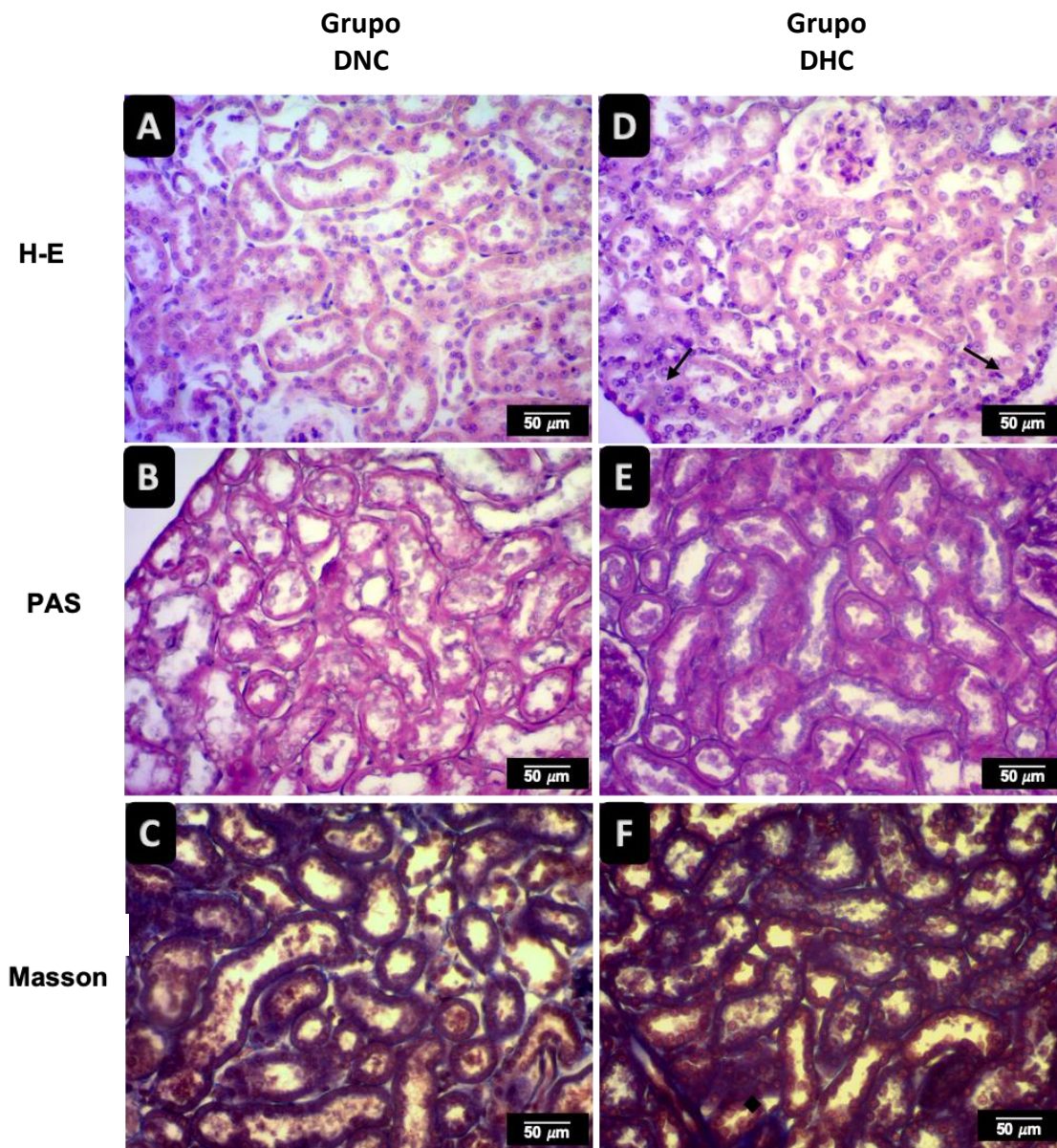


Figura 10. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) [A, D]. Hiperplasia e hipertrofia en túbulo de corteza (→). Tinción PAS [B, E]. Tinción Tricrómica de Masson [C, F]. Aumento de fibrosis (◆).

En las fotomicrográficas de la Figura 11, podemos observar hiperplasia en el grupo problema con la tinción H-E (Fig. 11A). En la tinción de PAS podemos observar un incremento en la acumulación de matriz extracelular (Fig. 11E) con respecto al grupo control (Fig. 11B). Las lesiones ocasionadas en el tejido renal se pueden

observar con la tinción Tricrómica de Masson (Fig. 11C,F), el grupo tratado con la DHC (Fig. 11F) se observa un incremento en la cantidad de colágeno (esclerosis) en los túbulos de médula, con respecto al grupo control (Fig. 11C).

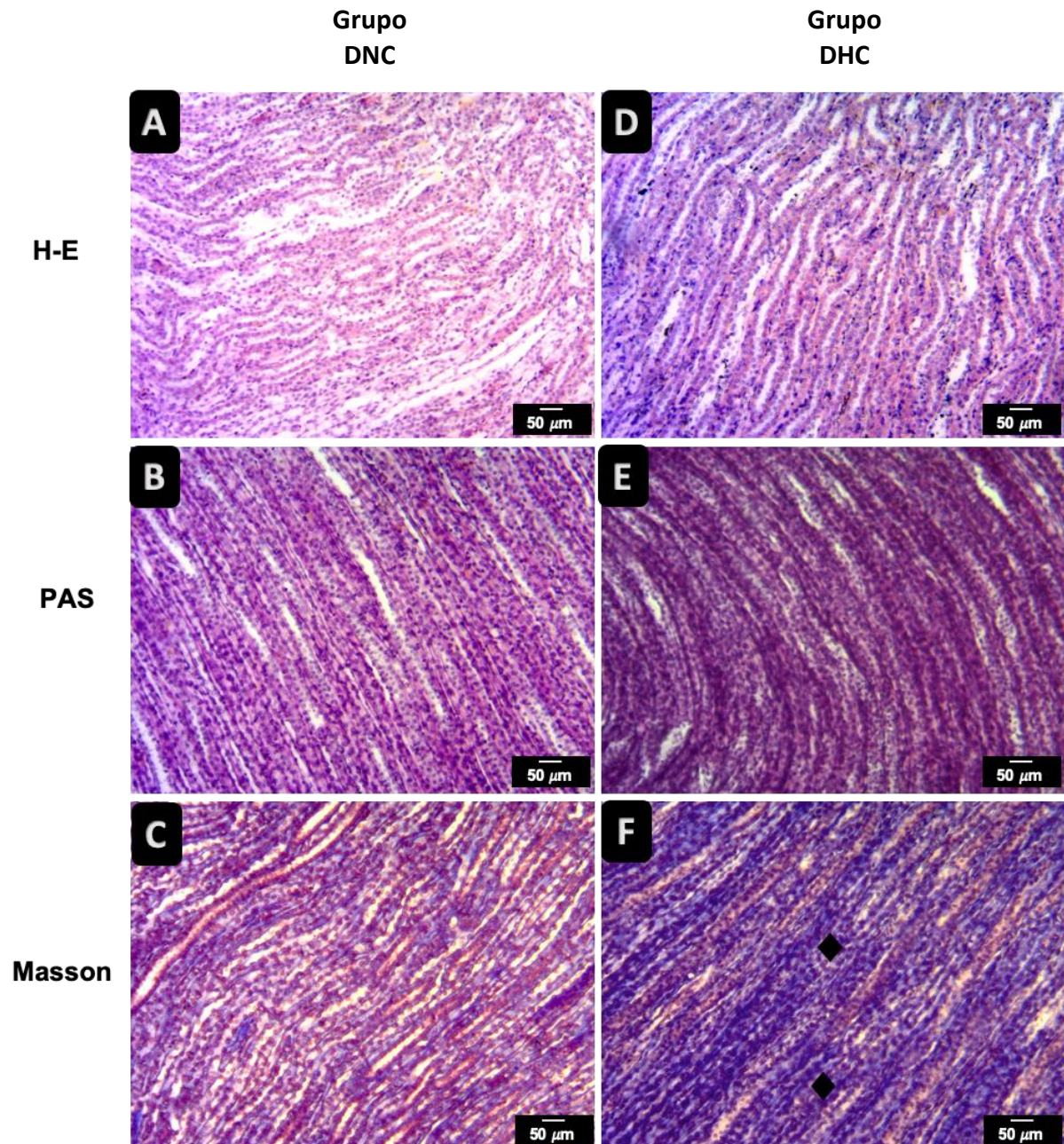


Figura 11. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) [A, D]. Tinción PAS [B, E]. Tinción Tricrómica de Masson [C, F]. Fibrosis (◆) .

8.2 Inmunofluorescencias

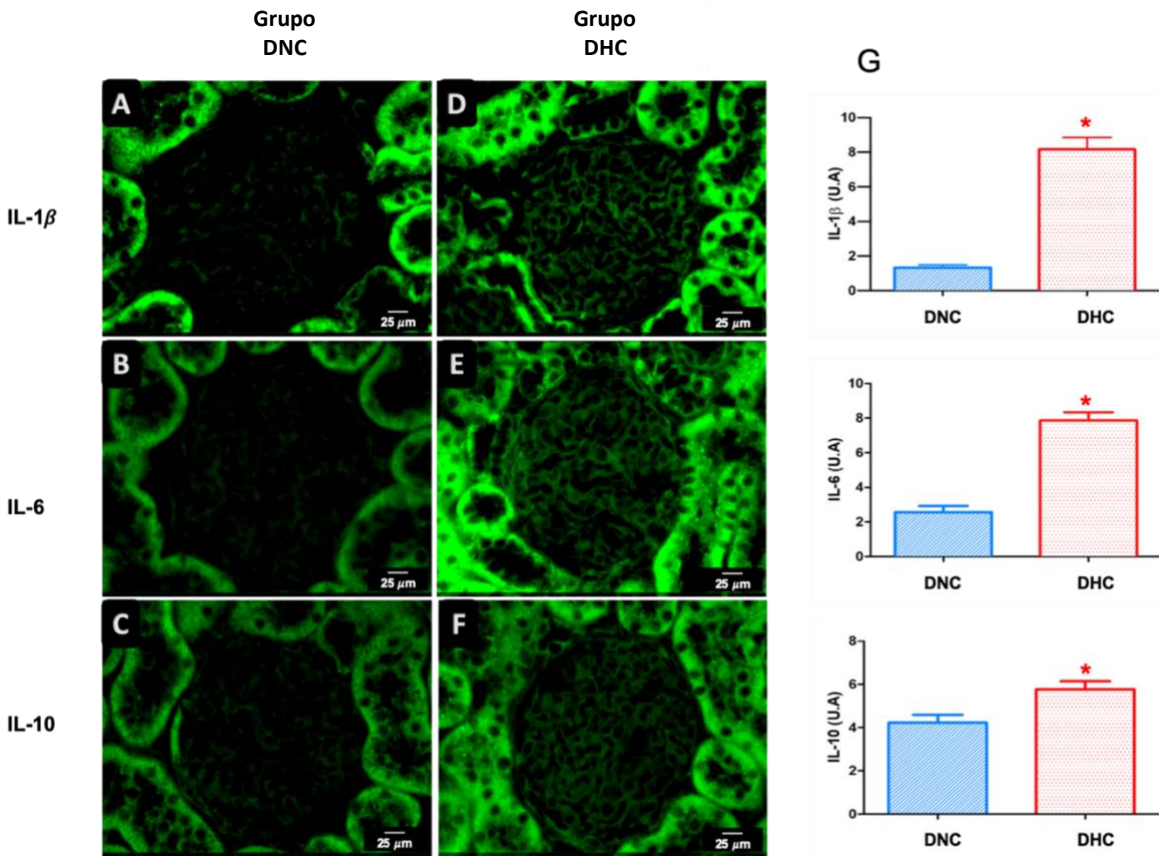


Figura 12. Evaluación de la expresión de IL-1 β (A,D), IL-6 (B,E) e IL-10 (C,F) en glomérulo. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-C] e hipercalórico (DHC) [D-F]. Análisis densitométrico de la expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en glomérulo. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. (*)Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

En el análisis de inmunofluorescencia se observa un marcado aumento en la expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en el grupo tratado con DHC (Fig. 12 D-F), en comparación con el grupo control (Fig. 12 A-C). Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 12 G) donde se observa una diferencia significativa en la expresión de los marcadores inflamatorios IL-1 β e IL-6 con un aumento de 523% y 203%, respectivamente. Por otro lado, la IL-10, que ejerce un efecto antiinflamatorio, tuvo un aumento del 30%.

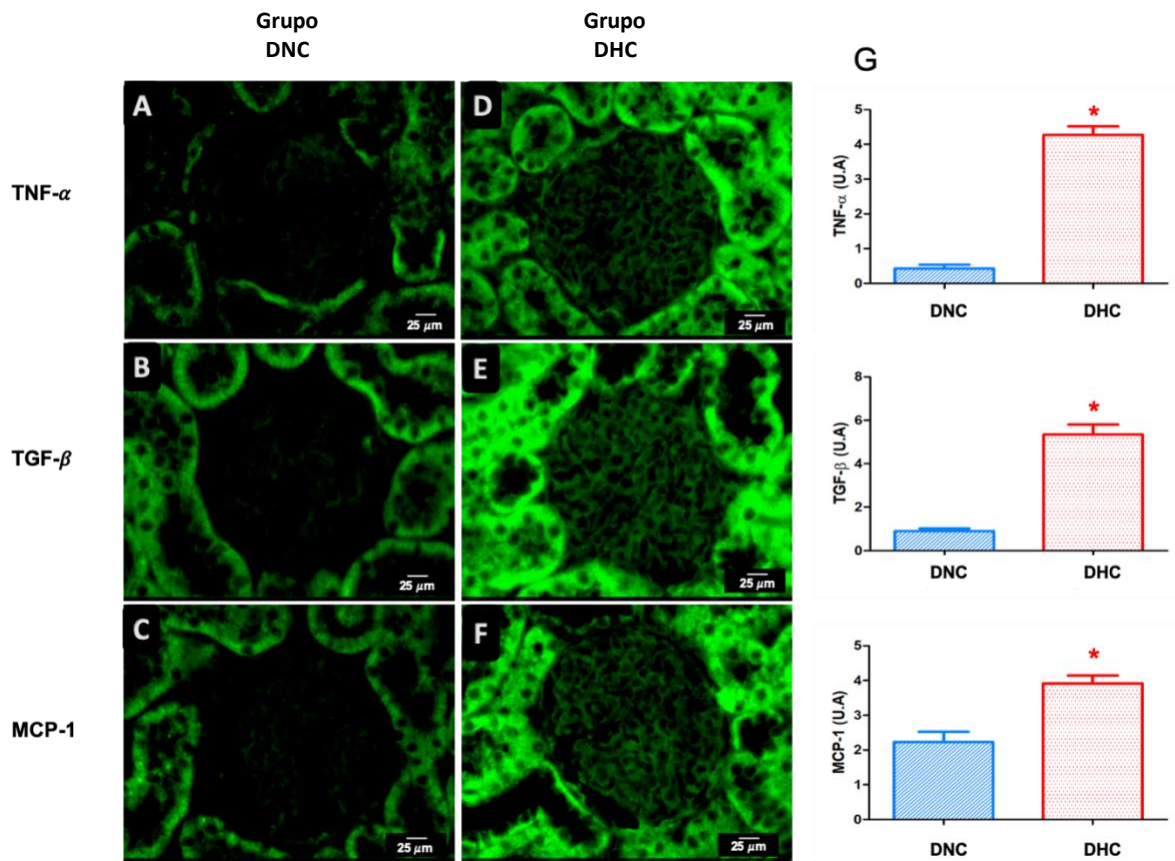


Figura 13. Evaluación de la expresión de TNF- α (A, D), TGF- β (B, E) y MCP-1 (C, F) en glomérulo. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-C] e hipercalórico (DHC) [D-F]. Análisis densitométrico de la expresión de TNF- α , TGF- β y MCP-1 en glomérulo. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

En la Figura 13 se presenta el panel de las fotomicrografías representativas del grupo normocalórico (A-C) y el grupo con dieta hipercalórica (D-F); en el análisis de la inmunofluorescencia se observa un aumento en la expresión de TNF- α , TGF- β y MCP-1 en el grupo tratado con DHC, en comparación con el grupo control. Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 13 G) el cual reveló un aumento de 900% en la expresión de TNF- α , 488% en la expresión de TGF- β y 81% en MCP-1.

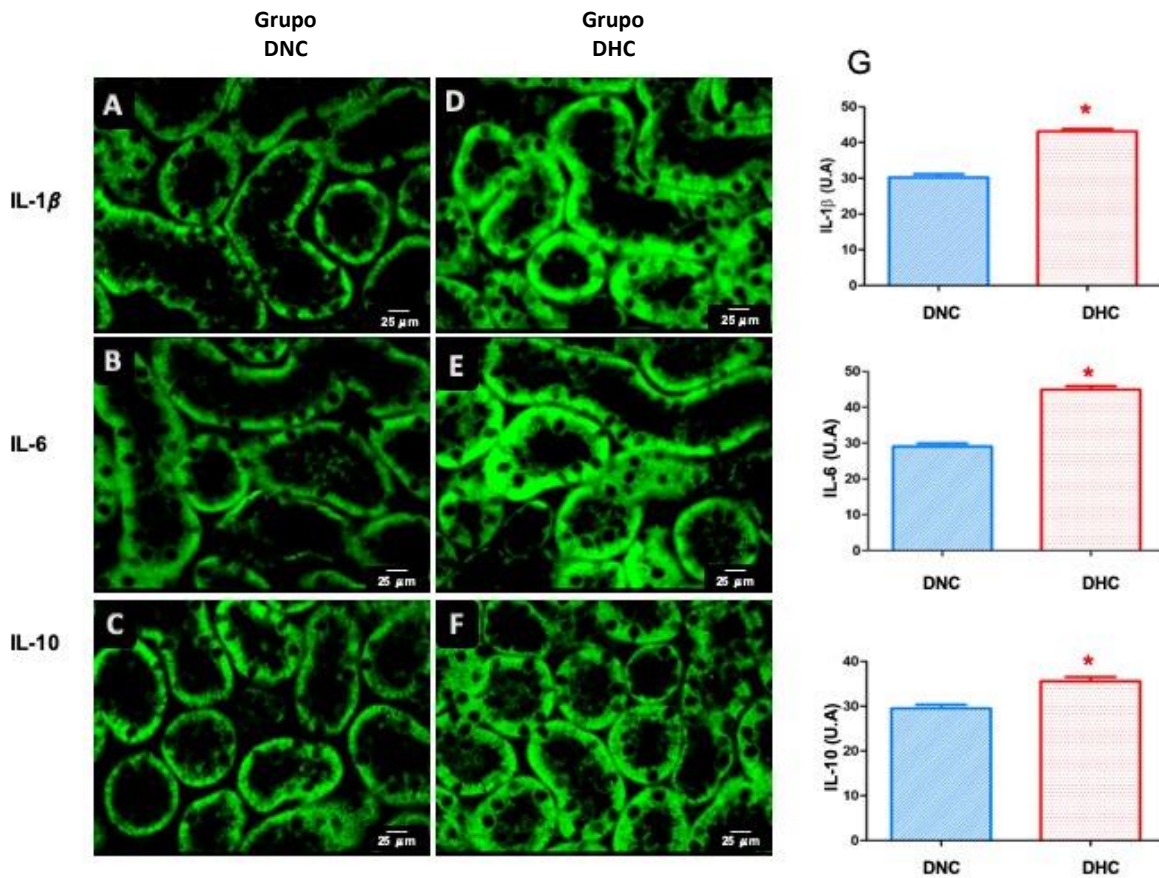


Figura 14. Evaluación de la expresión de IL-1 β (A,D), IL-6 (B,E) e IL-10 (C,F) en túbulo. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-C] e hipercalórico (DHC) [D-F]. Análisis densitométrico de la expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en túbulo. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

En la Figura 14 A-C se presenta el panel de las fotomicrografías representativas del grupo normocalórico y el grupo con dieta hipercalórica (Fig. 14 D-F); en el análisis de inmunofluorescencia se observa un notable aumento en la expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en el grupo tratado con DHC, en comparación con el grupo control. Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 14 G) donde se observa una diferencia significativa en la expresión de IL-1 β (42%), IL-6 (54%) e IL-10 (20%).

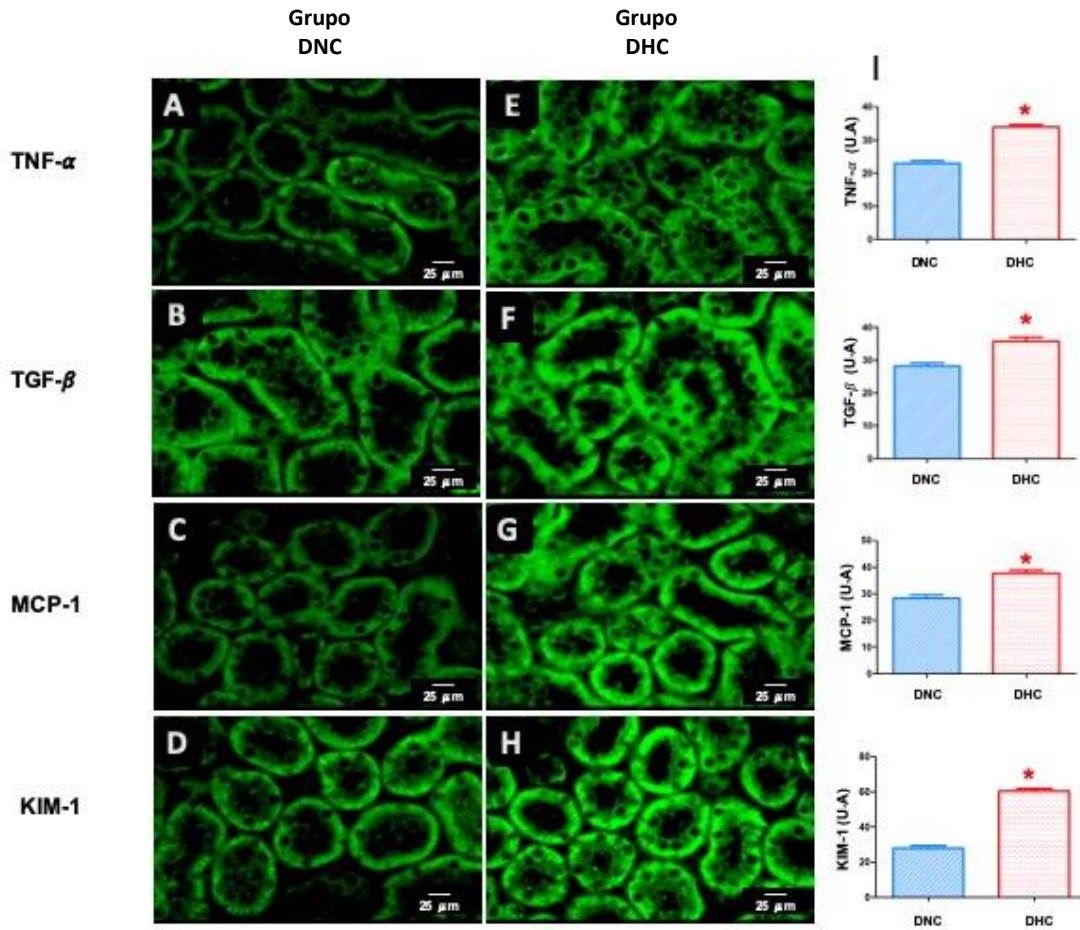


Figura 15. Evaluación de la expresión de TNF- α (A,D), TGF- β (B,E, MCP-1 (C,F) y KIM-1 en túbulo. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-C] e hipercalórico (DHC) [D-F]. Análisis densitométrico (I) de la expresión de TNF- α , TGF- β , MCP-1 y KIM-1 en túbulo. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

En la figura 15 en el análisis de inmunofluorescencia se observa un aumento en la expresión de TNF- α , TGF- β , MCP-1 y KIM-1, en los túbulos renales, en el grupo tratado con DHC (E-H), en comparación con el grupo control (A-D). Los resultados observados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 15 I), en donde la expresión de TNF- α , TGF- β , MCP-1 y KIM-1 se vio aumentada un 48%, 27%, 32% y 127%, respectivamente.

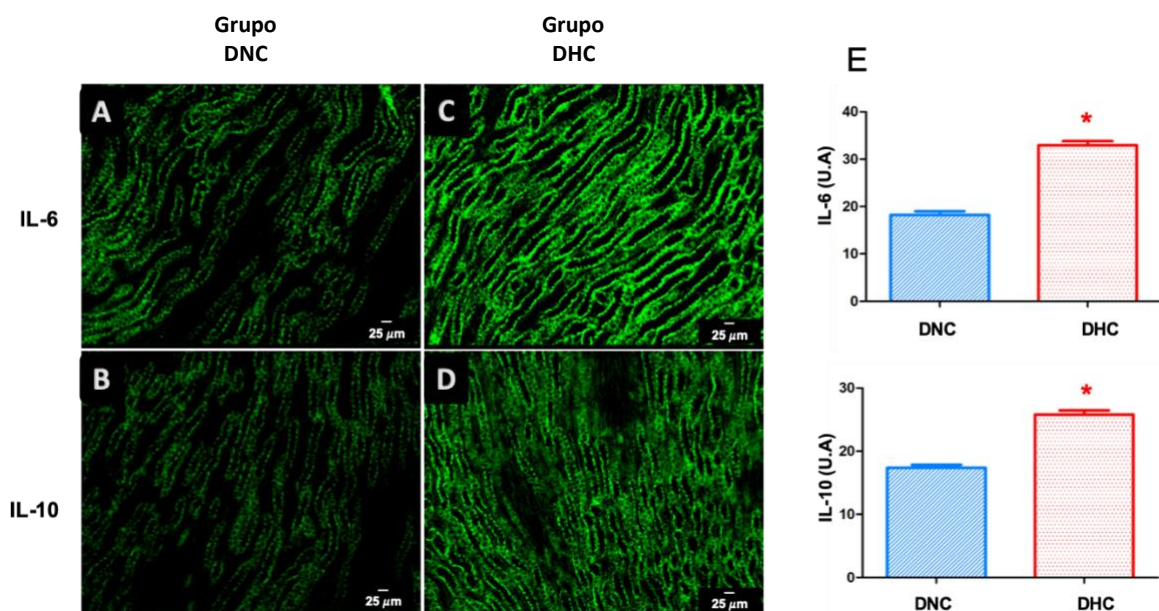


Figura 16. Evaluación de la expresión de IL-6 (A, C) e IL-10 (B, D) en médula renal. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-B] e hipercalórico (DHC) [C-D]. Análisis densitométrico de la expresión de IL-6 e IL-10 en médula renal. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

En la Figura 16 se muestra el panel de microfotografías representativas del grupo normocalórico (A-B) y el grupo con una dieta hipercalórica (C-D). En el análisis de inmunofluorescencia se observa mayor expresión de la IL-6 e IL-10 en el grupo problema, con respecto al control. Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 16 E), donde se observa un aumento significativo en la IL-6 de un 80% y en la IL-10 un 48%, con respecto al control.

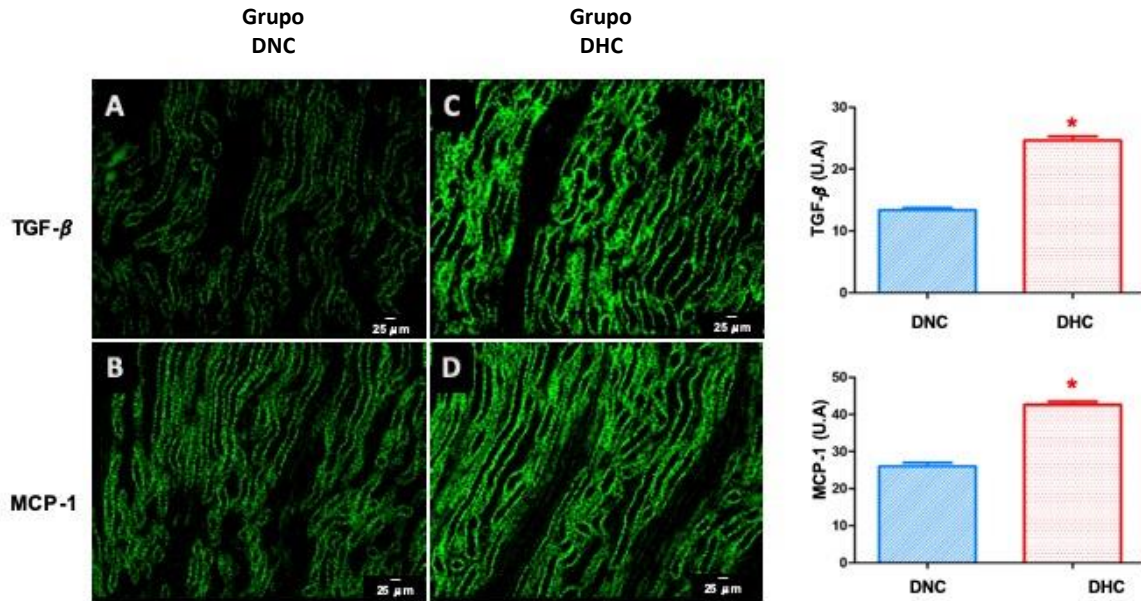


Figura 17. Evaluación de la expresión de TGF-β (A, C) y MCP-1 (B, D) en médula renal. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 60x representativas del grupo normocalórico (DNC) [A-B] e hipercalórico (DHC) [C-D]. Análisis densitométrico de la expresión de TGF-β y MCP-1 en médula renal. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

La Figura 17 muestra el panel de microfotografías representativas del grupo control (A-B) y el grupo problema (C-D). En el análisis de inmunofluorescencia se observa un aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias TGF-β y MCP-1, en médula renal, en comparación con el grupo control. Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 16 E), las gráficas representativas de TGF-β y MCP-1 muestran un incremento significativo de 63% y 84% respectivamente, en comparación con el grupo control.

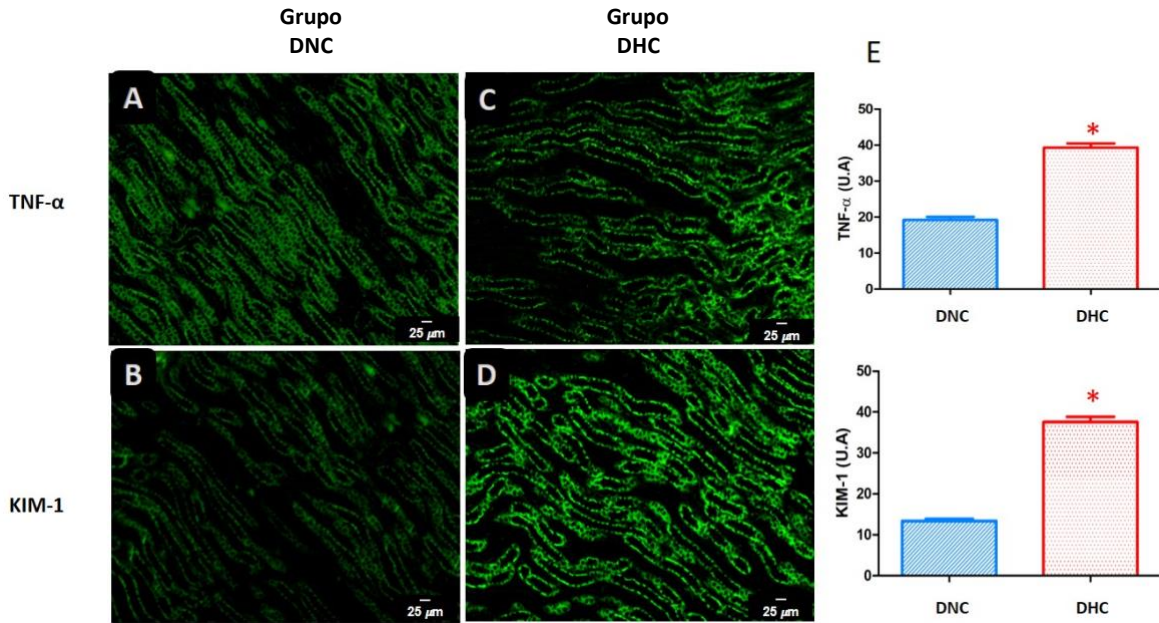


Figura 18. Evaluación de la expresión de TNF- α (A, C) y KIM-1 (B, D) en médula renal. Se muestran fotomicrografías tomadas y analizadas con objetivo 20x representativas del grupo normocalórico (A-B) e hipercalórico (C-D). Análisis densitométrico de la expresión de TNF- α y KIM-1 en médula renal. U-A = unidades arbitrarias. Los valores presentados son la media de 75 mediciones individuales \pm EEM. *Representa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control $p < 0.05$.

La Figura 18 muestra el panel de microfotografías representativas del grupo control (A-B) y el grupo problema (C-D). En el análisis de inmunofluorescencia se observa un aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α y KIM-1, en médula renal, en comparación con el grupo control. Estos resultados se confirmaron con un análisis densitométrico (Fig. 18 E), las gráficas representativas de TNF- α y KIM-1 muestran un incremento significativo de 96% y 105% respectivamente, en comparación con el grupo control.

9. Discusión de resultados

La DM2 se caracteriza por una desregulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, resultado de una secreción de insulina alterada, resistencia a la insulina o una combinación de ambas (De Fronzo R. 2015). La alimentación con una dieta alta en carbohidratos induce en el hígado y tejido adiposo la expresión de una serie de genes que codifican las proteínas involucradas en el almacenamiento de energía, como lo es la síntesis de ácidos grasos (Corio, R. Arbonés, L., 2009). Por otro lado, el síndrome metabólico (SMet) que es la forma más temprana de determinar clínicamente los desórdenes metabólicos y por supuesto del desarrollo de DM2, se caracteriza por la ocurrencia simultánea de al menos tres de las siguientes condiciones médicas, obesidad, hiperglucemia, hipertensión o dislipidemia (Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., et al., 2009). El SMet plantea un problema de salud pública en todo el mundo debido a su creciente prevalencia. La prevalencia mundial de SMet varía de 10 a 84% según la edad, el sexo, la raza, el origen étnico y la definición de SMet (Kaur, J., 2014).

Las ratas y los ratones son los modelos animales más comunes utilizados en la investigación de SMet y DT2. Algunos de los diversos enfoques utilizados para inducir DT2 en roedores incluyen la manipulación de la dieta, la modificación genética y drogas. Panchal y Brown realizaron una revisión, que sugirió principalmente que el modelo de rata que mostraba los criterios más cercanos al SMet y DT2 humano fue inducido por una dieta alta en carbohidratos y grasas (Panchal, S. K., & Brown, L. 2011). Así mismo, por medio de una dieta hipercalórica-hiperglúcida, previamente reportada en nuestro grupo de trabajo, se estableció el modelo con características asociadas a la DT2 en ratas macho de la cepa Wistar, las ratas del grupo DHC después de tres meses de inducción mostraron intolerancia a los carbohidratos, (Figura 6A), dislipidemia (Figura 7), y presencia de hiperinsulinemia (Figura 6B) La aparición de hiperglucemia característica de la diabetes, si bien es signo clínico por excelencia para el diagnóstico, es también uno de los indicadores más tardíos, ya que antes de este, tienen lugar modificaciones

en la secreción de insulina, hiperinsulinemia compensatoria, como se observó en nuestro grupo DHC. La hiperinsulinemia compensatoria ocurre cuando la secreción de la hormona aumenta para mantener los niveles normales de glucosa en sangre. En el contexto de la RI periférica, esta sucede principalmente en el tejido muscular y adiposo, sin embargo, cuando la hiperinsulinemia es mantenida afecta y se presenta en múltiples tejidos y órganos con grado-intensidad diferentes (Raven, G. 2004; Raven, G. M. 2005).

Diversos estudios indican que la resistencia a la insulina *per se* y los componentes asociados del síndrome de resistencia a la insulina contribuyen al desarrollo de diversas patologías en las que destacan las enfermedades cardio vasculares, hipertensión, disfunción endotelial, aterosclerosis, dislipidemia, obesidad, intolerancia a la glucosa y alteración de la glucosa en ayuno, y estos a su vez al daño renal (McLAughlin, T., et al. 2004).

En la figura 6A (curva de tolerancia oral a la glucosa) la forma de la curva, denotada por las pendientes positiva (del tiempo cero al 30' en el grupo DHC y al 60' en el grupo DNC, y negativa del punto máximo a los 90 min, han sido ampliamente estudiadas, y se conoce que de los 0 a los 30 minutos, la curva describe la respuesta de los tejidos independientes a insulina para la recaptura de glucosa (principalmente hígado), mientras que de los 30-120 minutos – en el caso de humanos, y 90 minutos en roedores - describe el consumo de glucosa por los tejidos dependientes de insulina principalmente músculo y adiposo (Tschirtter, O., et al. 2003). En un principio, solamente se realizaban las curvas generadas a partir de una carga de glucosa estandarizada con el objetivo de determinar la tolerancia a carbohidratos en los pacientes, no obstante, con el tiempo, se llegó a la conclusión de que las curvas de glucosa no pueden interpretarse por sí solas, debido a que su comportamiento se ve influenciado directamente por la conducta de insulina, la cual en condiciones fisiológicas presenta el mismo tipo de curva que la glucosa, y en prediabetes o en RI, incrementa o disminuye el área bajo la curva (AUC), respectivamente, como se observa en nuestros resultados (Figura 6B).

En los resultados del presente trabajo, el comportamiento del grupo DNC, muestra la forma clásica de la curva, en donde de los 0 a los 30 min se evidenció la pendiente positiva, mientras que la pendiente negativa se generó del minuto 60 a los 90 minutos, evidenciando la eficiencia de la insulina y una correcta secreción que se reflejó en un eficaz manejo de la glucosa por los tejidos periféricos. En este sentido, es conocido que la insulina es la hormona fundamental que regula el suministro de energía celular y el balance de macronutrientes, dirigiendo los procesos anabólicos. La insulina es esencial para el transporte intracelular de la glucosa a los tejidos dependientes de la hormona, como el músculo y tejido adiposo. En éstos, la insulina (y otras adipocinas) actúa como un sensor energético, por lo que la cascada de señalización posterior a la unión de su receptor es sobre la abundancia de energía exógena, de esta manera se suprime la degradación de la grasa del tejido adiposo y se promueve su síntesis. En las células musculares, la entrada de glucosa permite que el glucógeno se sintetice y almacene, y que los carbohidratos, en lugar de los ácidos grasos (o aminoácidos), se utilicen como fuente de energía disponible de inmediato para la contracción muscular. Por lo tanto, la insulina promueve la síntesis de glucógeno y lípidos en las células musculares, mientras que suprime la lipólisis y la gluconeogénesis de los aminoácidos musculares. En presencia de un suministro adecuado de aminoácidos, la insulina es anabólica en el músculo (Petersen, M. C., & Shulman, G. I. 2018).

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se ha descrito que el empleo de una dieta hipercalórica por 3 meses en ratas Wistar, ocasiona un incremento en el AUC tanto de glucosa como de insulina, como se pudo observar en nuestros grupos DHC (Treviño, S., et al. 2015). Este mismo comportamiento, además de la falta de retorno de la glucosa a los 90 minutos, se observó en nuestros resultados para el grupo DHC, lo cual habla de una limitante en la primera fase de control gluconeogénico hepático y en la segunda fase de una deficiente recaptura de glucosa por tejidos periféricos, aún en presencia de hiperinsulinemias constantes.

La insulina media sus acciones a través de la unión a los receptores de insulina. Toda vez que se une a su receptor, se genera una autofosforilación y entonces se unen y se despliegan una serie de moléculas de señalización que median otras acciones celulares de la insulina. Particularmente, la fosforilación de la vía PI 3-quinasa promueve la translocación de proteínas transportadoras de glucosa, glucógeno, y proteínas, el control de la gluconeogénesis hepática, así mismo promueve la síntesis de lípidos e inhibe su degradación.

Los perfiles lipídicos de individuos con ND se han caracterizado por tener concentraciones plasmáticas más altas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol de lipoproteínas de densidad intermedia y triglicéridos, pero niveles más bajos de HDL, este mismo comportamiento lo pudimos observar en el perfil de lípidos de los animales del grupo DHC (Figura 8). Reportes indican que estas anomalías lipídicas promueven la progresión de la lesión renal, a través de distintos mecanismos. En estos, el daño endotelial es uno de los más importantes. Los pacientes con niveles bajos de HDL, triglicéridos altos y niveles normales o incluso bajos de colesterol y LDL, pero se oculta un perfil más aterogénico y de daño endotelial detrás de este espectro. Este perfil incluye un aumento de la apolipoproteína B (apoB), lipoproteína (a) (Lp (a), lipoproteína de densidad intermedia y muy baja (colesterol IDL, colesterol VLDL; "partículas remanentes") y pequeñas partículas densas de LDL, que a menudo se generan un proceso de daño oxidativo, que conduce a la formación de pequeñas lipoproteínas y a una mayor formación de LDL oxidada (Cases, A., & Coll, E. 2005; Weiner, D. E., & Sarnak, M. J. 2004; Shurraw S. & Tonelli M. 2006). Aunque el LDL no suele estar elevado en pacientes con ERC, las partículas de LDL tienden a ser más pequeñas, más densas y más aterogénicas en su forma. Las LDL e IDL oxidadas, que se consideran altamente aterogénicas, aumentan. Varios estudios han demostrado niveles elevados de LDL densa pequeña en pacientes con ERC no dependientes de diálisis en comparación con los controles sanos y han indicado que la LDL densa pequeña es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC. Debido a la renovación de la subfracción de lípidos significativamente modificada, el tiempo

de residencia de las lipoproteínas en la circulación se prolonga, y puede generar depósitos de lípidos en tejidos no apropiados para ello, por lo que dicho fenómeno asociado a daño se le ha denominado lipotoxicidad. La lipotoxicidad recientemente se ha sugerido que podría ser la causa de la nefropatía diabética, en las primeras etapas, cuando existen movilizaciones importantes de FFA en suero, triglicéridos, lipoproteínas y cuando los cambios de glucosa son imperceptibles. En sujetos sanos, la lipólisis está estrictamente regulada de modo que la partición de los combustibles energéticos (glucosa y FFA) se adapte a las necesidades energéticas de los diferentes tejidos, por el contrario, en enfermedades como la DM2, el flujo de FFA aumenta de forma crónica y se cree que este aumento permanente de la disponibilidad de FFA induce y / o agrava la resistencia a la insulina del hígado y del músculo esquelético. El flujo de FFA promueve la producción de triglicéridos hepáticos, lo que conduce a una síntesis excesiva de apoB y VLDL (Delarue, J., & Magnan, C. 2007; Kawanami, D., et al., 2016)

En 1982, Moorhead propuso que la acumulación de lípidos contribuye a la lesión renal crónica (Moorhead, J. F., et al. 1982). El concepto de que el comportamiento análogo al inducido por las lipoproteínas de baja densidad durante la aterogénesis ocurre en los macrófagos glomerulares y las células mesangiales y contribuye a la progresión de la glomeruloesclerosis está respaldado por estudios de los efectos de la modificación de los lípidos dietéticos y los fármacos hipolipemiantes por los grupos de Keane y Diamond, respectivamente, y otros a fines de la década de 1980 (Krasiske, B. L., et al. 1988,1991). Estas investigaciones incluyeron estudios de la progresión de la glomerulonefritis esclerosante focal que se desarrolla espontáneamente en la rata adiposa diabética Zucker y modelos similares (Dominguez, J. H., et al. 2000; Maddox, D. A., et al. 2002). Durante los estados dislipidémicos, la albúmina circulante, que normalmente contiene <1 molécula de ácido graso no esterificado (NEFA) / albúmina, se satura con 5–6 NEFA (Shafir, E. 1958), aumentando el suministro de NEFA al riñón y a las células del túbulo proximal, después de endocitar la albúmina filtrada, constituyendo uno de los principales mecanismos para que se genere daño renal y progresivamente una ND.

Además, los altos niveles de lípidos están involucrados en las lesiones renales típicas de la obesidad e inducen daño directo a los podocitos (Joles, J. A. et al. 2000) Los podocitos son células dinámicas que participan principalmente en el proceso de filtración renal y el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular (GFB), pero también participan en los mecanismos de transducción de señales. Durante la última década, los podocitos se han vuelto críticamente importantes debido al descubrimiento de mutaciones específicas en genes fisiológicos clave que conducen a proteinuria (Welsh, G. I., & Saleem, M. A. 2011; Machuca, E., Benoit, G., & Antignac, C. 2009). Los podocitos consisten en un cuerpo celular que lleva a cabo procesos fundamentales, tanto estructurales como selectivos. Los procesos selectivos están asociados al mantenimiento e integridad del citoesqueleto, en los que la actina está unida a la membrana basal glomerular por proteínas de adhesión por medio de estructuras llamadas pedicelios. Es de destacar que los pedicelios de los podocitos vecinos se interdigitan entre sí y forman uniones intercelulares llamadas diafragmas de hendidura (SD) (Leeuwis, J. W., et al. 2010). La SD consta de varias proteínas como la nefrina, la podocina, el grupo de proteína 2 de diferenciación asociada (CD2AP) y la zonula occludens-1 (ZO-1) que están estrechamente relacionadas con el citoesqueleto de actina. Esta interacción influye en la movilidad celular y las vías de señalización en el podocito (Mundel, P., et al. 1997; Lavin, P. J., et al. 2008). La SD también se requiere para controlar la dinámica de la actina, la respuesta a la lesión, la endocitosis y la viabilidad celular. Una expresión alterada o una alteración física de estas proteínas desempeña un papel clave en el rompimiento del diafragma y la pérdida de las interdigitaciones, hallazgos morfológicos inequívocos en el desarrollo de proteinuria (Chuang, P. Y., & He, J. C. 2009; Ha, T.-S., Hong, E.-J., & Han, G.-D. 2015). Además, la lesión de podocitos que afecta al citoesqueleto o las alteraciones genéticas en la expresión de ciertas proteínas moduladoras del citoesqueleto se observan en diferentes formas de glomeruloesclerosis segmentaria focal, en asociación con proteinuria y pérdida de los pedicelios (Mundel, P. 2002; Bijian, K., Takano, et al. 2005). Todas estas observaciones apoyan la idea de que la regulación del citoesqueleto de podocitos

es crítica para la función sostenida de la tasa de filtrado glomerular. (Ichimura, K., Kurihara, H., & Sakai, T. 2007; 2003). Además, los podocitos son únicos entre las células glomerulares, debido a que expresan todos los elementos de la cascada de señalización de insulina, lo que también influye en la estructura, función y su supervivencia (Coward, R. J. M., et al. 2005).

Nuestros resultados muestran que el grupo DHC no modifica la excreción de creatinina de manera drástica por lo que no se observan diferencias significativas tanto en suero como en orina (Tabla 3 y 4). Sin embargo, al analizar los niveles de cistatina-C que es un biomarcador con mayor sensibilidad para determinar los estadios iniciales de lesión renal, éste mostró incremento tanto en suero como en orina. Asimismo, la excreción de albúmina incrementó y por ende el ratio albúmina/creatinina aumentó 8 veces en relación a los grupos control. Complementariamente, la relación de proteínas totales / creatinina se vio sumamente incrementada en las orinas del grupo DHC. Estos resultados en conjunto sugieren datos de una ND en etapas iniciales. Al respecto se ha descrito que, albuminuria persistente, se debe a la fuga constante de pequeñas cantidades de albúmina y otras proteínas de bajo y alto peso molecular en el ultrafiltrado glomerular. Además, la enfermedad renal crónica (ERC) se define de acuerdo con las guías KDIGO con una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o el daño renal tal como proteinuria (> 200 mg / día o relación proteína / creatinina > 200 mg / g creatinina) o albuminuria (excreción de albúmina urinaria ≥ 30 mg / día o relación de albúmina a creatinina ≥ 30 mg / g creatinina) (GUH, J.-Y. 2010).

En un análisis secundario del estudio modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDRD, por sus siglas en inglés) indicó que disminuye progresivamente la TFG, sólo en pacientes con proteinuria de 3 g / día o más (Klahr, S., et al. 1994). Estudios sobre el análisis secundario del ensayo de intervención de prevención de la enfermedad terminal renal y vascular en etapa terminal (PREVEND-IT) encontró que la disminución de la TFG es más rápida en pacientes con niveles más altos de albuminuria (Boersma, C., Postma, et al., 2008). Por lo que, un cambio entre normoalbuminuria y macroalbuminuria puede ser una condición asociada en el desarrollo o la remisión de la nefropatía diabética

temprana. Además, el cambio de proteinuria o albuminuria es un marcador de los cambios en la progresión de la ERC en pacientes con proteinuria leve a moderada (Levey, A. S., et al. 2009).

La progresión del daño funcional viene acompañada de modificaciones en la citoestructura renal, esta se altera drásticamente en estados adaptativos desde RI hasta diabetes como se ha demostrado tanto en modelos animales y en pacientes (Fioretto, P., et al., 1992). Los cambios estructurales tempranos incluyen agrandamiento del riñón que afecta tanto a los túbulos como a los glomérulos. Este proceso implica predominantemente hipertrofia y en menor grado, hiperplasia (Wolf, G., 2000). El mayor volumen glomerular y el aumento resultante en el área de la superficie capilar mantienen la Tasa de Filtración Glomerular (TFG) a pesar del desarrollo de la expansión de la matriz mesangial. El daño vía hiperglicemia y la presencia de agentes de glicación avanzada condicionan la aparición de eventos proinflamatorios que terminan por ejercer un daño vascular-endotelial, tubular y glomerular, favoreciendo en primera instancia el desarrollo de microangiopatías, patología asociada a los principios de la nefropatía diabética como lo descrito en diversos estudios (Mudaliar, H., et al., 2014; Ovidiu V.A et al., 2017; Gurley, S. B., et al., 2018).

Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente descrito, al observar estados de glicación asociados con los cambios estructurales en la morfología de corteza renal que se tiñó con H&E y PAS (figura 8), dónde es evidente la proliferación celular que se denota con el incremento de núcleos en el mesangio intraglomerular. Además de observarse hipertrofia citoplasmática como de matriz extracelular, que se presenta mayormente en túbulos renales proximales y es evidenciada con la disminución de la luz tubular y la pérdida del borde de cepillo debido a la glicación de polisacáridos epiteliales y posible oxidación de ácidos grasos membranales que favorecen el daño tisular.

La información sobre los mecanismos de crecimiento se ha desarrollado principalmente de estudios *in vitro* en los que, células renales se expusieron a altas concentraciones de glucosa. Después de un período de proliferación autolimitado y corto, las células glomerulares y tubulares sometidas a hiperglucemia *in vitro* o *in*

vivo se ha observado que altas concentraciones de glucosa, estimulan la isoforma ERK de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que conduce a un aumento del ciclo celular y de procesos de sobrevivencia (Awazu, M., et al. 2003; Wolf, G., et al. 2003). En estados tempranos de diabetes como los son la RI y el SM, las células renales, y especialmente las células mesangiales, activan el complejo sensible a rapamicina (mTOR) (Sataranatarajan, K., et al. 2007; Mori, H., et al. 2009). Esta proteína desempeña un papel clave en la regulación de la hipertrofia celular en órganos, como el riñón. De hecho, la inhibición de la vía de mTOR con rapamicina, o la caída de S6K1 disminuyen la hipertrofia renal en modelos de diabetes en roedores (Mori, H., et al. 2009). Además, el tratamiento con rapamicina puede reducir el engrosamiento de la membrana basal, la acumulación de matriz mesangial, así como los marcadores inflamatorios renales, y conducir a una albuminuria significativamente menor (Yang, Y., et al. 2007)

Además, nuestros resultados muestran que las membranas basales de los túbulos y la membrana basal glomerular comienzan a engrosarse y a ganar depósitos de colágeno tras 90 días de alimentación con la dieta hipercalórica como se observa en la figura 8. El ancho de la membrana basal glomerular (MBG) a menudo supera los 500 nm, casi el doble del valor de control. Se sabe que, en su composición, existe una mayor abundancia de colágeno tipo IV, lamininas y nidogen / entactina, pero otros informes han descrito un aumento en el contenido subendotelial de las cadenas de colágeno $\alpha 3$ (IV) y $\alpha 4$ (IV) y una disminución relativa en la densidad de las cadenas de colágeno clásicas (ubicuas) $\alpha 1$ (IV) y $\alpha 2$ (IV) (Zhu, D., et al. 1994). También puede haber una reducción relativa en la otra cadena de colágeno $\alpha 5$ (IV) (Funabiki, K., et al. 1998). Por lo tanto, el ensamblaje alterado de las cadenas de colágeno IV es un aspecto importante de la composición alterada de la MBG engrosada y puede explicar en parte la proteinuria. De hecho, el engrosamiento de la MBG se correlaciona bien con la presencia de proteinuria y es potencialmente reversible en terapias que reduzcan la RI, dislipidemia y la glucemia (Caramori, M. L., et al. 2002).

El proceso de reparación adaptativa a partir de una lesión o daño renal puede conceptualizarse en el contexto del patrón temporal de la fase de la lesión en sí,

esta puede dividirse en cuatro etapas; iniciación, extensión, mantenimiento y reparación. La fase de iniciación ocurre con una lesión o daño que puede provocar el agotamiento de la adenosina trifosfato o una lesión celular independiente de la adenosina trifosfato, con la muerte de células epiteliales tubulares (Bonventre, J. V., & Yang, L. 2011) y daño al endotelio. La reversión del insulto inicial, en la fase de extensión, la lesión de las células endoteliales produce vasoconstricción, aumento de la obstrucción vascular, y una mayor expresión de moléculas de adhesión que promueven la transmigración de las células inflamatorias. (Jang, H. R., & Rabb, H. 2009). La lesión epitelial tubular, con células muertas y/o moribundas que forman procesos obstructivos en las luces tubulares por procesos adaptativos de hipertrofia y secreción de proteína de Tamm-Horsfall (Yang, L., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. 2011). El reclutamiento de neutrófilos activados y macrófagos inflamatorios produce una citotoxicidad adicional, lo que amplifica la lesión desde los niveles iniciales (Jang, H. R., & Rabb, H. 2009). En un insulto autolimitante en un riñón sano, se reduce la propagación de la lesión durante la fase de mantenimiento y comienza el proceso de reparación. Las células epiteliales tubulares maduras supervivientes sufren una desdiferenciación y migran a áreas expuestas por necrosis y apoptosis de células tubulares (Hader, C., Marlier, A., & Cantley, L. 2009; Humphreys, B. D., et al. 2008). Estas células epiteliales desdiferenciadas luego proliferan, reemplazando la capa epitelial perdida (Humphreys, B. D. et al. 2011; Schrimpf, C., et al. 2012). Los macrófagos reclutados fagocitan restos celulares, y durante los primeros días cambian de su fenotipo M1 inflamatorio inicial a un fenotipo M2 pro-reparación, apoyando la proliferación de células supervivientes (Lee, S., et al. 2011). Las fases finales de esta etapa de reparación dan como resultado que las nuevas células tubulares pierdan marcadores de la superficie mesenquimatosa y recuperen los marcadores del epitelio tubular maduro (Hader, C., Marlier, A., & Cantley, L. 2009). Esto va acompañado de una resolución del infiltrado inflamatorio a bajas concentraciones basales (Jang, H. R., & Rabb, H. 2009). En la reparación adaptativa prototípica no debe haber pérdida de microvasculatura o cicatrización (Bonventre, J. V., & Yang, L. 2011) y ningún cambio permanente en el número o la morfología de las poblaciones de células periciticas

adyacentes a la vasculatura (Basile, D. P., & Sutton, T. A. 2012). Sin embargo, en estados de hiperglicemia, dislipidemia y resistencia a insulina, la agresión es constante por lo que, la regeneración tubular a menudo es incompleta, ya sea por señales intrínsecas o extrínsecas que no pueden soportar la proliferación y la diferenciación en curso (Yang, L., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. 2011).

Un infiltrado inflamatorio persistente (en lugar de uno que se resuelve después de la reparación de la lesión) caracteriza y se asocia con cicatrices progresivas (Burne-Taney, M. J., Yokota, N., & Rabb, H. 2005). Esto refleja la experiencia en humanos, donde la presencia de inflamación crónica en curso en las biopsias renales es un marcador de peor resultado clínico (Kraus, E. S., et al. 2009). La reparación desadaptativa también se asocia con alteraciones en la ubicación y el número de pericitos renales (Kida, Y., & Duffield, J. S. 2011). En respuesta a la lesión tisular, estas células se activan para convertirse en miofibroblastos responsables de la secreción de la matriz de colágeno (Chen, Y.-T., et al. 2011; Humphreys, B. D. 2012). Por lo tanto, las alteraciones en las poblaciones de pericitos pueden influir tanto en la supervivencia de la microvasculatura como en el depósito de colágeno ubicuo en la ERC, lo que lleva a cambios crónicos que desarrollan fibrosis renal, como lo observamos en nuestros grupos experimentales. El daño renal crónico también se asocia con una expresión alterada de enzimas pro y antifibróticas, con una expresión reducida de metaloproteinasas de matriz y un aumento de la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Hirt-Minkowski, P., et al. 2014; Wang, Z., et al. 2014; Meng, X. M., et al. 2010), que inhiben aún más los mecanismos de adaptación diseñados para limitar, o incluso reabsorber, fibrosis después de insultos renales posteriores.

Sin la capacidad de regular la función de la nefrona en respuesta a insultos adicionales, es probable que los cambios en la creatinina y la eTFG sean más marcados en el riñón dañado que experimenta crónicamente agresiones en el entorno diabético, lo que hace que el deterioro de la función en el riñón previamente dañado sea más fácil de detectar. Es probable que, bajo estas circunstancias, la tasa real de reparación desadaptativa continúe siendo subestimada. Claramente,

muchas características de la reparación desadaptativa pueden afectar la capacidad posterior del riñón para responder de manera apropiada a otros insultos agudos (Figura 17).

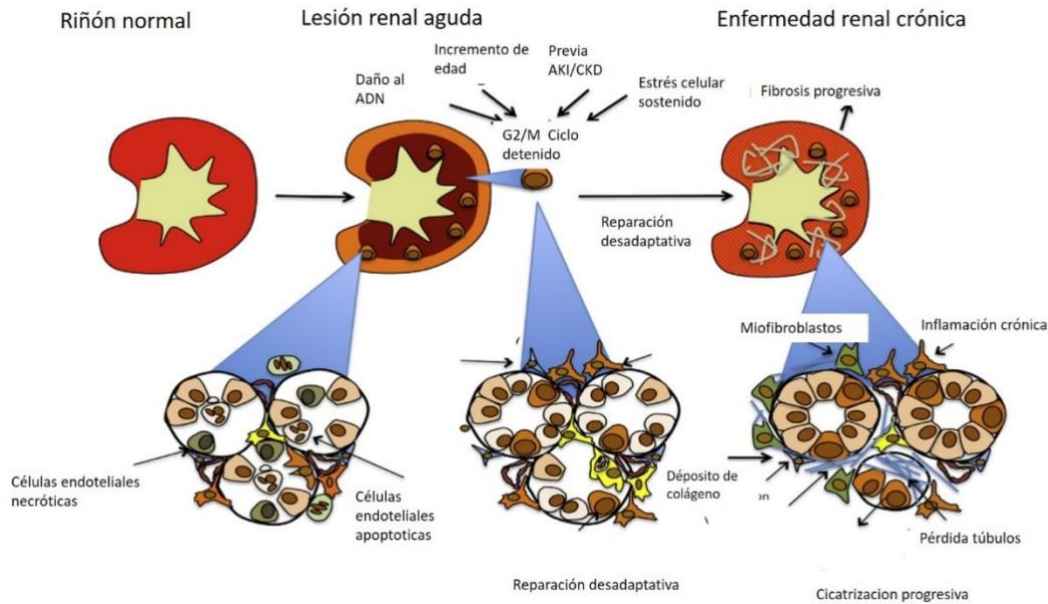


FIGURA 17. Ciclo celular y enfermedad renal crónica asociada a fibrosis progresiva. En la fase de reparación inicial después de la lesión, las células pueden detenerse en la fase G2 / M, liberando citocinas y factores de crecimiento que promueven la retención de células inflamatorias dentro del riñón y la inflamación continua. Los estímulos conducen a la disociación del pericito del endotelio, lo que lleva a la rarefacción microvascular y al depósito progresivo de colágeno I por los miofibroblastos que surgen de los pericitos activados. Reparación desadaptativa que ocurre después de una IRA adicional en el contexto de la enfermedad renal crónica (ERC). Figura modificada de Ferenbach y Bonventre, Nat Rev Nephrol.

Particularmente, en la ND, los macrófagos y las células T se acumulan en los glomérulos y el intersticio, incluso en las primeras etapas de la enfermedad. El reclutamiento de células inflamatorias está en función del espectro inflamatorio característico de las citocinas proinflamatorias, que son producidas tanto por el tejido renal y redundantemente por los leucocitos residentes e infiltrados, y establecen un ciclo inflamatorio. Las citocinas e interleucinas más relevantes son la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el interferón- γ (INF- γ) pueden inducir a las células renales residentes a producir quimiocinas. Los elementos del medio diabético, como la glucosa alta y los productos finales de glicación avanzada (AGE), también son potentes estimuladores de la producción de

quimiocinas. Las quimiocinas más importantes incluyen interleucina-8 (CXCL8), proteína quimio-atrayente de monocitos-1 (MCP-1), proteína inducible por interferón (CXCL10), proteína inflamatoria de macrófagos-1 (MIP-1/CCL3) y RANTES (CCL5) (García, P.M., et al. 2014; Donate, J., et al. 2015).

Diferentes acciones de las citocinas han estado involucradas en la patogénesis de la ND (Navarro-Gonzalez, J. F., et al. 2008; 2011). IL-1 β estimula la producción de prostaglandina E y la liberación de fosfolipasa A2, participando en el desarrollo de anomalías hemodinámicas intraglomerulares. La actividad de IL-1 β también está relacionada con una mayor permeabilidad de las células endoteliales vasculares. La IL-6 desempeña un papel en facilitar la infiltración de neutrófilos del túbulo-intersticio, influye en la dinámica de la matriz extracelular y promueve la hipertrofia renal general, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, la hipertrofia de los podocitos y la detención del ciclo celular, que se correlaciona con la albuminuria. IL-18 estimula la liberación de interferón gamma y otras citocinas, aumenta la expresión de moléculas de adhesión e induce apoptosis de células endoteliales. Se han observado niveles séricos elevados de IL-18 en pacientes con macroalbuminuria, lo que sugiere un papel en el desarrollo de complicaciones microvasculares renales. Temprano en el curso de la diabetes, tanto las células glomerulares como las tubulares muestran niveles aumentados de expresión de ARNm de TNF- α . TNF- α tiene múltiples acciones: inducción y diferenciación de células inflamatorias, citotoxicidad en células renales, activación de apoptosis, hemodinámica glomerular alterada, aumento de la permeabilidad endotelial vascular y aumento del estrés oxidativo. TNF- α ejerce sus acciones biológicas a través de la interacción con 2 receptores de superficie celular, TNF- α receptor 1 (TNFR1) y 2 (TNFR2), que han mostrado un valor prometedor como nuevos biomarcadores pronósticos de ND (Tabla 5) (Hojs, R., et al. 2016).

Tabla 5: Citoquinas involucradas en la inflamación renal diabética.

Citoquinas	Papel en la inflamación renal diabética
ICAM-1	Molécula de adhesión que facilita la adhesión e infiltración leucocito-endotelial en el riñón diabético.
VCAM-1	Molécula de adhesión que facilita la adhesión e infiltración leucocito-endotelial en los riñones diabéticos.
MCP-1	Quimio-atrayente que promueve el reclutamiento de macrófagos en los riñones diabéticos.
TNF- α	Promueve la producción de especies reactivas de oxígeno, induce lesiones celulares y aumenta la permeabilidad endotelial.
IL-1 β	Estimula la expresión de moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento profibróticos y aumenta la permeabilidad endotelial
IL-6	Promueve la proliferación mesangial, la hipertrofia glomerular, la producción de fibronectina y aumenta la permeabilidad endotelial.
IL-18	Aumenta la producción de otras citocinas (ICAM-1, IL-1 β , TNF- α) e induce la apoptosis de las células endoteliales.
Adiponectina	Reduce el estrés oxidativo, la producción de TNF- α y la adhesión endotelial leucocitaria
Leptina	Induce el estrés oxidativo, la inflamación, la hipertrofia y la proliferación de las células vasculares del músculo liso, y altera la función endotelial.
Resistina	Promueve la expresión de MCP-1, VCAM-1, endotelina-1 y la proliferación de células vasculares del músculo liso

Tabla tomada y modificada de Andy K. H. Lim and Gregory H. Tesch, Mediators of Inflammation.

Nuestros resultados muestran que existe un incremento importante en la producción de citocinas e interleucinas proinflamatorias glomerulares (Figura 11 y 12), que correspondieron a la IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β y MCP-1, así como en menor medida a la interleucina anti-inflamatoria IL-10, en el grupo DHC. Como ya se mencionó,

dichas citocinas presentan efectos pleiotrópicos y pueden ser mayormente e sintetizadas por las diferentes células que conforman al glomérulo, tras una estimulación adecuada, sin embargo se producen constitutivamente. Al incrementarse, estas permiten no sólo la propagación temprana sino también respuestas y adecuaciones celulares que con relación al estímulo lleven a la resolución de la respuesta inflamatoria. Las citocinas exhiben una interacción extremadamente compleja entre ellas y con otros mediadores: (1) cascadas, es decir, una citocina que induce o activa una segunda, (2) bucles de amplificación, es decir, factores que regulan su propia síntesis; (3) modulación inducida por citocinas de la expresión, afinidad o función del receptor; (4) efectos biológicos aditivos o sinérgicos de las citocinas individuales; (5) efectos inhibitorios de un factor sobre las acciones de otro, ya sea directa o indirectamente a través de la inducción de antagonistas de receptores biológicamente inactivos, receptores solubles o moléculas de unión, y (6) cambios en las tasas de transcripción y modificaciones tanto traduccionales como postraduccionales de la citocina (Ostendorf, T., Burg, M., & Floege, J. 1996).

El incremento sostenido de las citocinas en los glomérulos parecen desempeñar un papel importante en el proceso de cicatrización o reparación celular, al promover factores estimulantes de colonias (CSFs, por sus siglas en inglés). Los CSFs, son producidos por las células glomerulares, contribuyen al reclutamiento, la maduración, la proliferación y la supervivencia de los macrófagos. (Kelley, V. R. et al. 1994). Por lo tanto, se ha demostrado que la adición de CSF granulocitos-macrófagos a los co-cultivos de células mesangiales y monocitos mejora la adherencia de los monocitos a las células mesangiales, y los granulocitos-macrófagos exhiben una mayor actividad citotóxica en estas células. (Brady, H. R., et al. 1992). Lo anterior en conjunto a nuestros resultados sugiere fuertemente que durante el proceso de reparación glomerular (Figura 9F) asociados al daño generado por los diferentes efectores de la ND, regulan la infiltración, maduración y el número de macrófagos renales (Neugarten, J., et al. 1995). Además, las citocinas e interleucinas en este sitio específico pueden afectar directamente a las células

mesangiales, regulando al alza el número y la su expresión de receptores Fc para complejos inmunes IgG (Santiago, A., et al. 1991).

Existe una gran cantidad de datos disponibles para invocar las llamadas citocinas inflamatorias en la propagación de la lesión glomerular, dos citocinas importantes a este respecto son IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), los cuales pueden ser producidos por células glomerulares residentes e infiltradas. IL-1 β y TNF- α exhiben propiedades similares y acciones sinérgicas (D. H. Lovett, et al. 1985). También están altamente regulados a través de antagonistas de los receptores y receptores solubles con el fin de limitar espacial y temporalmente sus acciones. A través de sus diversos efectos sobre los leucocitos circulantes, IL-1 β y TNF- α favorecen su localización en los tejidos, también activan el endotelio y otras células residentes (como las células mesangiales) para liberar factores quimiotácticos (Cotran, R. S., & Pober, J. S. 1989). Dentro de los factores quimiotácticos recientemente descritos se encuentra la proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP-1), esta es uno de los biomarcadores nuevos recientemente estudiados. Esta proteína se expresa en sitios de lesión e inflamación y dirige el reclutamiento de macrófagos, que se unen al receptor de quimiocinas para promover la adhesión de macrófagos. Hasta la fecha, se ha demostrado la sobre expresión de MCP-1 durante patologías renales. Los estudios que han demostrado el incremento de MCP-1 han incluido trastornos renales metabólicos (diabetes mellitus), inmunológicos (nefritis lúpica) y genéticos (enfermedad renal poliquística autosómica dominante) (Barbado J, et al. 2012; Murea. M, et al. 2012; Hanemann, A. L. P., et al. 2013). De igual forma MCP-1 puede estimular directamente a los macrófagos para que secreten TGF- β lo cual promueve la producción de matriz extracelular. Por otra parte, la señalización de MCP-1 a través de CCL2 en células mesangiales humanas induce la síntesis de ARNm y proteína de fibronectina mediante un mecanismo que implica la producción de TGF- β 1 y la activación de NF- κ B en estas células, contribuyendo de manera importante la acumulación de matriz mesangial y fibrosis. MCP-1 juega un papel importante en la glomeruloesclerosis diabética, sin embargo, no siempre afecta la acumulación de macrófagos glomerulares (Tesch, G. H. 2008).

Dentro del panel de citocinas, el TGF- β es una molécula efectora catalogada como un importante mediador en la fibrosis renal, regulada por las vías de señalización dependientes y no dependientes de Smad (Sutariya, B., Jhonsa, D., & Saraf, M. N. 2016). En las células no estimuladas, los Smads se desplazan constitutivamente entre el citoplasma y el núcleo. Tras la estimulación del ligando, los Smads se acumulan en el núcleo como la formación del complejo R-Smad/Co-Smad, lo que conduce a una disminución en su tasa de exportación nuclear (Sutariya, B., et al. 2016; Wada, J., et al. 2015; Zhang, Z., et al. 2016). El complejo Smad se une al ADN junto con otros factores de transcripción e interactúa con la maquinaria de transcripción general para regular la expresión de aproximadamente 100-300 genes diana (Zi, Z., Chapnick, D. A., & Liu, X. 2012). Entre estos genes diana se incluyen los que son importantes en el desarrollo de la fibrosis, el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el colágeno tipo I y la fibronectina. Diversos estudios sugieren que una alta concentración de glucosa sensibiliza a las células mesangiales a los efectos de TGF- β , y esto contribuye a los cambios patológicos que se observan en la ND como la acumulación de matriz extracelular y la fibrosis glomerular, tubular y medular, que a su vez afectan la función renal provocando hiperfiltración y proteinuria (Isono, M., et al. 2002).

Por otro lado, se ha reconocido que IL-6 posee propiedades antiinflamatorias, además de un importante estimulador de la proliferación de células mesangiales, por lo que está íntimamente vinculada con el desarrollo de nefritis mesangio-proliferativa, sin embargo, estos estudios ilustran el problema de atribuir un fenómeno biológico a una causa específica. Además, otros estudios han descrito que el incremento de IL-6 en riñón observa una imagen que se asemeja al riñón de mieloma humano. Datos en cultivos celulares sobre la actividad proliferativa de IL-6 para las células mesangiales han arrojado resultados controvertidos (Horii, Y., et al 1989; Floege, J., et al. 2008; Abbott, F. 1992; Ikeda, M.1992). Sin embargo, la mayor cantidad de evidencias concluyen que IL-6 es un mediador importante, pero poco probable en la proliferación de células mesangiales y la acumulación de matriz mesangial. Asimismo, La IL-10 es producida por las células T helper 2 (Th2) y desempeña un papel importante en la limitación de la cascada de activación de

citocinas proinflamatorias y la regulación negativa de las respuestas inmunes mediadas por células T (Myśliwska J, et al. 2005). Se ha demostrado que el tratamiento a ratas con IL-10 reduce la proteinuria, el estado inflamatorio y la lesión renal (Huang, X.R., et al. 2000) El polimorfismo genotipo CG IL-10 -1082G / A, se relaciona con una mayor expresión de esta citocina, se asoció con nefropatía en DM2. En nuestro estudio, el grupo con HCD presentaron niveles glomerulares más altos de IL-10 que el grupo DNC, lo cual está de acuerdo con otros estudios. Este resultado podría explicarse parcialmente por un mecanismo compensatorio, en el que los niveles plasmáticos de IL-10 aumentan como consecuencia de los niveles plasmáticos más altos de citocinas proinflamatorias INF- γ , TNF- α e IL-6 en pacientes y modelos con nefropatía para regular el estado inflamatorio, ya que IL-10 es una citocina antiinflamatoria. La correlación significativa entre las citocinas proinflamatorias y la IL-10 observada en este estudio puede corroborar esta hipótesis. Este aumento compensatorio en los niveles de IL-10 también podría prolongar el curso de la nefropatía en pacientes con DM.

Por otro lado, el análisis de túbulos de la corteza y médula renal (Figuras 14,15,16,17) mostró que las principales citocinas e interleucinas de inflamación se encontraron significativamente más elevadas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Asimismo, las proteínas quimiotácticas MCP-1 y TGF- β mostraron dicho incremento. Finalmente, el incremento de Kim-1 en tejido y β -2 microglobulina que se consideran moléculas predictoras del daño, mostraron incrementos significativos en sus respectivos sitios de análisis (Figuras 15H y 18D). Lo anterior sugiere fuertemente que, tras 3 meses de administración de una dieta hipercalórica, se crea un microambiente proinflamatorio, que amplifica la lesión tisular y que muestra evidencias de ND en sus estadios tempranos. Esto está en concordancia con algunos estudios encontrados en la literatura (Navarro-Gonzalez, J. F., & Mora-Fernandez, C. 2008; Lim, A. K. H., & Tesch, G. H. 2012).

El tubulointersticio juega un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades renales, y el grado de daño tubulointersticial está fuertemente asociado con el pronóstico renal. Por lo tanto, los marcadores tubulares de lesión

renal pueden ser capaces de reflejar el grado de daño renal sostenido en pacientes diabéticos. En este sentido se sabe que, las células tubulares renales, también son capaces de producir citocinas, como se observa en nuestros resultados (Figura 14, 15) incluida la IL-1 β , que interactúan con otras citocinas y actúa de manera autocrina y paracrina agravando el daño renal. La IL-1 β se une a su receptor IL-1RI, iniciando la transducción de la señalización de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), reclutamiento del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6) y la activación del factor nuclear kappa B (NF κ B) del complejo con I κ B. Posteriormente NF κ B migra y se transloca en el núcleo lo que finalmente conduce a varios eventos, como la acumulación de matriz extracelular y tubulofibrosis (Murray, K. N., et al. 2015), lo cual pudimos observar en nuestros resultados (Figura 10 E,F). Además, esta cascada de señalización incrementa la producción de TNF- α , el cual puede actuar de forma autocrina y paracrina sobre sus receptores TNFR-1 y TNFR-2 a lo largo de la nefrona. TNFR-1 también se expresa en todos los tipos de células, mientras que TNFR-2 se expresa limitado a las células inmunes.

Los desencadenantes tanto autocrinos como paracrinos que comprometen la integridad capilar y activan los precursores de miofibroblastos durante la ERC pueden derivar de células inflamatorias / inmunes y del epitelio del túbulo estresado, lo cual está mediado por MCP-1 (Hanemann, A. L. P., et al. 2013). Debido a que los túbulos y los capilares pueden lesionarse simultáneamente durante el o los estímulos censados, puede producirse isquemia, por lo que es difícil elucidar y distinguir el orden, en este contexto, de el o los factores de activación más proximales que impulsan la disociación endotelial-pericito/fibroblastos, la rarefacción capilar y la proliferación de miofibroblastos (Lan, R., et al. 2012; Suzuki, T., et al. 2001).

Sobre la base de estas observaciones, postulamos que los túbulos sometidos a múltiples factores de daño durante la regeneración, no logran diferenciarse correctamente, lo que provoca que exista una señalización indirecta a través de

múltiples vías profibróticas y secretar péptidos fibrogénicos en el intersticio, instigando fibrosis (Venkatachalam, M. A., et al. 2010), obligando a estados de desdiferenciación, migración y proliferación. Para este propósito, el epitelio superviviente produce y secreta factores de crecimiento, citocinas e interleucinas como lo observamos en nuestros resultados (Figura 14 B,F) (Bonventre, J. V., & Yang, L. 2011; 2003; 2004) Estos eventos de señalización y secreción son necesarios para la regeneración normal, pero deberían cesar cuando los túbulos se recuperen, sin embargo, esto no sucede ya que los animales acondicionados con dieta hipercalórica, no cesan en los estímulos. Por lo tanto, la persistencia de la señalización proliferativa en el epitelio indiferenciado detenido en crecimiento que sufre atrofia es inherentemente anormal. Se ha demostrado que los túbulos atróficos están involucrados en una señalización patológicamente aumentada a través de las vías en las cuales se involucra insulina, así como otras hormonas implicadas en SMet y DM, tal como las vías de PI3K-Akt-mTOR, ERK-MAPK, JNK-MAPK y TGF- β , con una expresión notablemente aumentada de péptidos profibróticos PDGF-B, CTGF y TGF- β , como se ha demostrado en otros estudios (Lan, R., et al. 2012; Geng, H., et al. 2009; Geng, H., et al 2012).

Sin embargo, el daño del túbulo, por sí solo, puede ser suficiente para producir el espectro completo de la patología intersticial. Los infiltrados de miofibroblastos y monocitos / macrófagos se desarrollaron exclusivamente alrededor de los túbulos proximales dañados selectivamente como se ha observado en secciones teñidas para α -SMA mostraron claras relaciones de epitelio regenerador con miofibroblastos en el intersticio circundante con fibrosis desarrollada alrededor de los túbulos afectados en ambientes hipóxicos (Fujigaki, Y., et al. 2004; Yuan, H.-T., et al. 2003). Los túbulos lesionados, los capilares peritubulares y las células intersticiales a través de mecanismos activados localmente tienen la ventaja de circunscribir la respuesta fibrótica y minimizar la disociación de la función de la nefrona y la perfusión vascular, como se puede observar en las microfotografías del grupo DHC tanto con la tinción de PAS (Figura 10E) como con la tricrómica de Masson (Figura 10F).

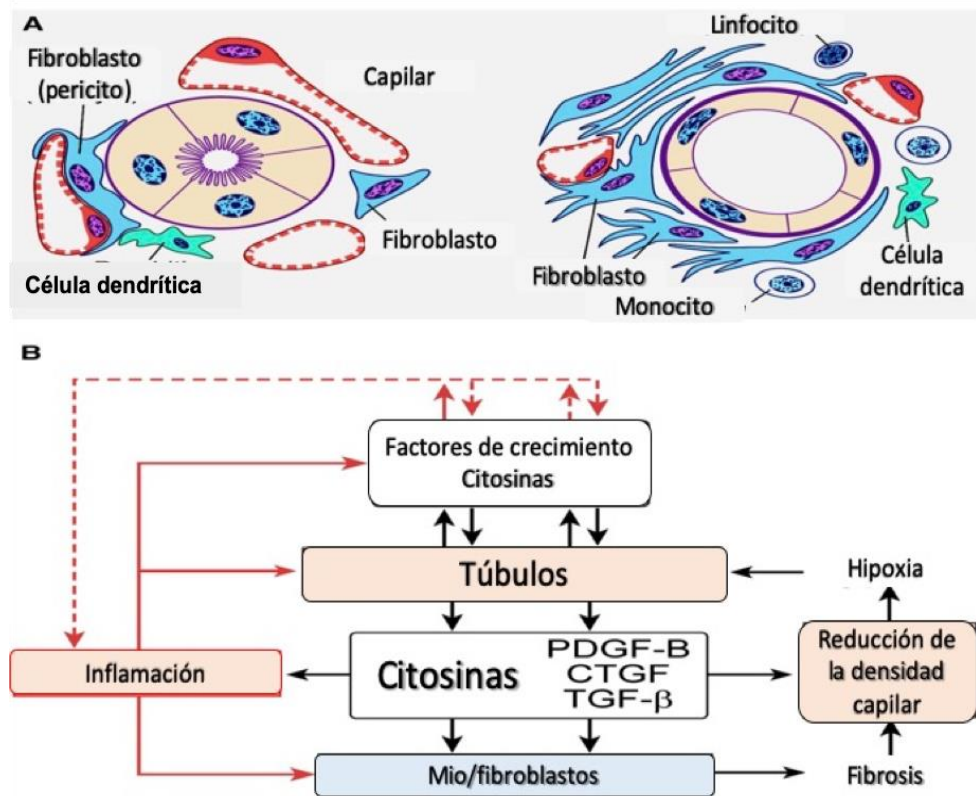
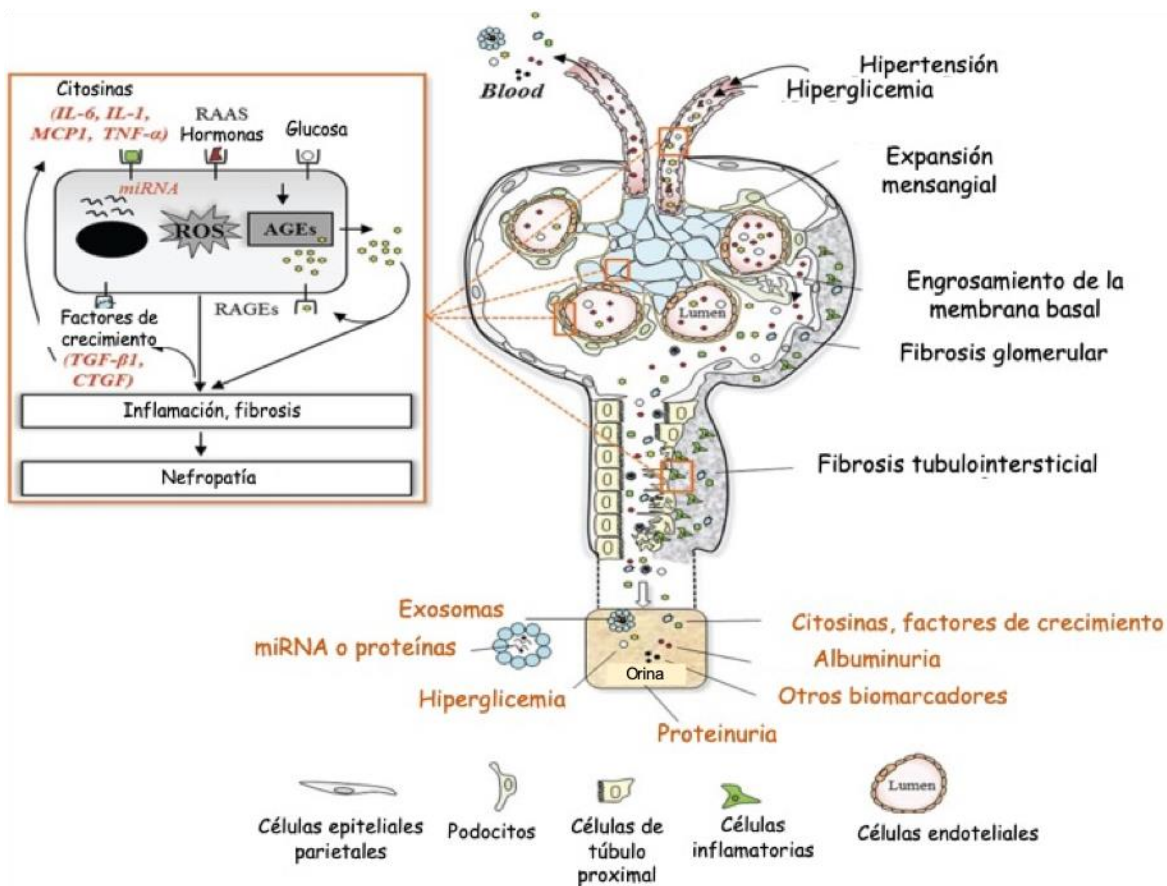


FIGURA 18. Inflamación y enfermedad renal crónica asociada a fibrosis progresiva. Los eventos patológicos en túbulos e intersticio interactúan para producir fibrosis tubulointerstitial. (A) Diagrama esquemático de (panel izquierdo) túbulo-intersticio normal y (panel derecho) fibrosis tubulointerstitial temprana. Los fibroblastos residentes en el intersticio pueden o no tener relaciones íntimas con los capilares peritubulares y las membranas basales de los túbulos. El primer tipo también se ha denominado pericito. Después de la lesión, este tipo de fibroblastos / pericitos se desprende de los capilares, iniciando eventos patológicos que causan desintegración capilar y rarefacción, así como la transformación y proliferación de miofibroblastos. Este proceso es ayudado e impulsado por células inflamatorias, principalmente monocitos y células inmunes residentes, incluidas las células dendríticas. (B) Diagrama esquemático que ilustra las interacciones de retroalimentación del ciclo vicioso entre la patología del túbulo y la patología intersticial que potencian la atrofia del túbulo. Modificado de referencia. Figura tomada y modificada de Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. Am J Physiol Renal Physiol.

Por otro lado, KIM-1 una proteína que se ha establecido como biomarcador tubular, se ha reportado como detector temprano de lesión renal tubular. Esta es una glucoproteína transmembrana tipo 1 marcadamente regulada en las células

epiteliales del túbulo proximal renal lesionado y en regeneración. Aunque se expresa predominantemente en áreas con daño tubulointersticial, caracterizado por la presencia de macrófagos, dilatación tubular y fibrosis (Van Timmeren, M. M., et al 2006). La proteína KIM-1 se localiza principalmente en la membrana apical de las células y la expresión de esta molécula en los túbulos renales media la fagocitosis de las células apoptóticas, de igual forma protege al riñón después de una lesión aguda al regular a la baja la inmunidad innata y la inflamación. Las células epiteliales renales que expresan KIM-1 están típicamente desdiferenciadas, caracterizadas por una pérdida de la membrana del borde en cepillo y la expresión de proteínas mesenquimatosas como la proteína de filamento intermedio vimentina (Zhang, Z., & Cai, C. X. 2016). Como biomarcador KIM-1 es una proteína expresada en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal y refleja el daño tubular en las etapas tempranas de la enfermedad renal en pacientes diabéticos (Han, W. K., et al. 2002; Van Timmeren, M., et al. 2007). Aunque en nuestro trabajo se vio expresada en las etapas tempranas del desarrollo de la ND. En algunos estudios se ha demostrado que los niveles urinarios de este marcador tubulares durante la progresión de ND reflejan no solo la gravedad de la lesión renal sino también el grado de fibrosis tubulointersticial. Además, los estudios han demostrado que el tratamiento con agentes bloqueantes del sistema renina angiotensina redujo la excreción urinaria de KIM-1 en paralelo con una reducción de la presión sanguínea y la excreción de albúmina en la orina (Nielsen, S. E., et al. 2012; Nielsen, S. E. et al., 2009). En el presente estudio, la expresión de KIM-1 aumentó en concordancia con el estado dismetabólico. Esta manifestación de elevación del nivel detectable de KIM-1 muestra claramente que, con la progresión y duración de la ND, hay una interrupción de la función renal y un aumento en la gravedad de la inflamación renal, que al parecer supera el umbral de anti inflamación (IL-10), la inflamación y daño tubular fue corroborada con los niveles de cistatina C y β -2 microglobulina urinaria, los cuales incrementaron significativamente en conjunto con el ratio albúmina/creatinina. Por lo que, los resultados sugieren fuertemente que estos marcadores urinarios pueden ser útiles para detectar pacientes con mayor riesgo de progresión a ERC en la práctica clínica.



Descripción general de la patogénesis de DN y biomarcadores asociados. En glomérulos sanos, la capa de células endoteliales fenestradas, la membrana basal y los podocitos forman una fuerte barrera de filtración que es impermeable a las proteínas de alto peso molecular como la albúmina. Los factores hemodinámicos y metabólicos relacionados con la ND, como la dislipidemia, la hiperglucemia, resistencia a insulina y los AGEs generados, inducen cambios fenotípicos progresivos que conducen a la eliminación de los podocitos, el engrosamiento de la membrana basal, la acumulación de matriz extracelular glomerular y la fibrosis tubulointersticial. Estos factores inician cambios patológicos a través de la activación de una cascada de mediadores en diferentes etapas durante la progresión sistemática de la enfermedad, como las citocinas, los factores de crecimiento, las proteínas de alto peso molecular y los exosomas. La evidencia del papel de estos mediadores en el inicio y la progresión de la ND puede revelarse en la orina y usarse como biomarcadores predictivos para evaluar la condición. ND = nefropatía diabética; AGE = productos finales de glicación avanzada; IL-6 = interleucina-6; IL-1 = interleucina-1; MC-P1 = proteína quimioatrayente de monocitos 1; TNF-α = factor de necrosis tumoral alfa; RAAS = sistema renina-angiotensina-aldosterona; miRNA = microRNA; ROS = especies reactivas de oxígeno; RAGEs = receptor para AGEs; TGF-β1 = factor de crecimiento transformante-β1; CTGF = factor de crecimiento del tejido conectivo. Tomada y modificada de Campion CG, Sanchez-Ferraz O and Batchu SN. Can J Kidney Health Dis.

10. Conclusión

En el presente estudio tras alimentar por 3 meses con una dieta hipercalórica a ratas macho de la cepa Wistar se logró establecer un modelo de características dismetabólicas y diabetogénicas tipo 2.

En dichos animales al evaluar la función renal se pudo establecer cambios de la citoestructura de los glomérulos, túbulos corticales y túbulos medulares, que concuerdan con estadios tempranos de nefropatía diabética. Además, la evaluación de la función renal mostró un decaimiento de la selectividad glomerular y la reabsorción tubular.

Estos cambios estructurales y funcionales se asociaron fuertemente con un estado inflamatorio – profibróticos estipulado por las diferentes citocinas e interleucinas estudiadas, las cuales se incrementan de manera importante en los glomérulos, túbulos corticales y túbulos medulares.

Finalmente, estos cambios estructurales – funcionales – inflamatorios incrementan biomarcadores urinarios de detección temprana, lo cual no se ha reportado en etapas tempranas del desarrollo de nefropatía diabética y los cuales pueden ser útiles para detectar pacientes con mayor riesgo de progresión a ERC en la práctica clínica.

11. Bibliografía:

1. Corio, R. Arbonés, L. (2009). Nutrición y salud. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, (35), 443-449,
2. FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS. (2018). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en áreas de la seguridad alimentaria y la nutrición*. FAO, Roma.
3. Chopra, M., Galbraith, S., & Darnton-Hill, I., (2002). *A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition* / Mickey Chopra, Sarah Galbraith and Ian Darnton-Hill. *Bulletin of the World Health Organization: the International Journal of Public Health* 2002; 80(12) : 952-958
4. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 8th edn*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.
5. OMS. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes*. Ginebra, Suiza: OMS.
6. Navarro-González, J. F., Mora-Fernández, C., de Fuentes, M. M., & García-Pérez, J. (2011). *Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Nature Reviews Nephrology*, 7(6), 327–340
7. Duran-Salgado, M. (2014). *Diabetic nephropathy and inflammation*. *World Journal of Diabetes*, 5(3), 393.
8. Sulaiman, M. K. (2019). *Diabetic nephropathy: recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management*. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 11(1).
9. Dronavalli, S., Duka, I., & Bakris, G. L. (2008). *The pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 4(8), 444–452.
10. Brewster, U. C., & Perazella, M. A. (2004). *The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease*. *The American Journal of Medicine*, 116(4), 263–272.
11. Yamagishi S. & Matsui T., (2010). *Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3:2, 101-108
12. Dunlop, M. (2000). *Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy*. *Kidney International*, 58, S3–S12.
13. Toth-Manikowski, S., & Atta, M. G. (2015). *Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets*. *Journal of Diabetes Research*, 1–16.
14. Roshan, B. Stanton Robert C. (2013) *A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy*. *Journal of Nephropathology*, 2(4): 234-240.
15. Tervaert, T. W. C., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B. (2010). *Pathologic Classification of Diabetic*

- Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 21(4), 556–563.
16. Sharma, K., & Ziyadeh, F. N. (1995). *Hyperglycemia and Diabetic Kidney Disease: The Case for Transforming Growth Factor- β as a Key Mediator*. *Diabetes*, 44(10), 1139–1146.
 17. Grupo Español de Estudio de la Nefropatía Diabética (GEENDIAB)., González J. et al., (2008) *Fisiopatología de la nefropatía diabética*. *NefroPlus* 1:1, 1-55.
 18. Powell, D., Kenagy, D., Zheng, S., Coventry, S., Xu, J., Cai, L., Epstein, P. N. (2013). *Associations between structural and functional changes to the kidney in diabetic humans and mice*. *Life Sciences*, 93(7), 257–264.
 19. Rosolowsky, E., Niewczas, M., Ficociello, L., Perkins, B., Warram, J., & Krolewski, A., (2008). *Between hyperfiltration and impairment: Demystifying early renal functional changes in diabetic nephropathy*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82, S46–S53.
 20. Lehmann, R., & Schleicher, E. D. (2000). *Molecular mechanism of diabetic nephropathy*. *Clinica Chimica Acta*, 297(1-2), 135–144.
 21. Grabias, B. M., & Konstantopoulos, K. (2014). *The physical basis of renal fibrosis: effects of altered hydrodynamic forces on kidney homeostasis*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(5), F473–F485.
 22. Fraser, S., & Blakeman, T. (2016). *Chronic kidney disease: identification and management in primary care*. *Pragmatic and Observational Research*, Volume 7, 21–32.
 23. Barton, K. T., Kakajiwala, A., Dietzen, D. J., Goss, C. W., Gu, H., & Dharnidharka, V. R. (2018). *Using the newer Kidney Disease: Improving Global Outcomes criteria, beta-2-microglobulin levels associate with severity of acute kidney injury*. *Clinical Kidney Journal*.
 24. Devarajan, P. (2011). *Biomarkers for the early detection of acute kidney injury*. *Current Opinion in Pediatrics*, 23(2), 194–200.
 25. Azushima, K., Gurley, S. B., & Coffman, T. M. (2017). *Modelling diabetic nephropathy in mice*. *Nature Reviews Nephrology*, 14(1), 48–56.
 26. Morris, J. L., Bridson, T. L., Alim, M. A., Rush, C. M., Rudd, D. M., Govan, B. L., & Ketheesan, N. (2016). *Development of a diet-induced murine model of diabetes featuring cardinal metabolic and pathophysiological abnormalities of type 2 diabetes*. *Biology Open*, 5(8), 1149–1162.
 27. Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Muros-de-Fuentes, M., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2015). *Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy*. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 1–9.
 28. Shikata, K., & Makino, H. (2013). *Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(2), 142–149.

29. Lenz, O., Fornoni, A., Ijaz, A., & Tejada, T. (2008). *Role of Inflammation in Diabetic Nephropathy*. *Current Diabetes Reviews*, 4(1), 10–17.
30. Kato, M., & Natarajan, R. (2014). *Diabetic nephropathy—emerging epigenetic mechanisms*. *Nature Reviews Nephrology*, 10(9), 517–530.
31. Wada, J., & Makino, H. (2015). *Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy*. *Nature Reviews Nephrology*, 12(1), 13–26.
32. Wada, J., & Makino, H. (2013). *Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Clinical Science*, 124(3), 139–152.
33. Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., & Smith, S. C. (2009). *Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 120(16), 1640–1645.
34. Kaur, J. (2014). *A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome*. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21.
35. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). *Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. *Diabetic Medicine*, 23(5), 469–480.
36. Bee YT Jr., Haresh KK., Rajibans S. (2008). *Prevalence of Metabolic Syndrome among Malaysians using the International Diabetes Federation, National Cholesterol Education Program and Modified World Health Organization Definitions*. *Malays J Nutr.*, 14(1):65-77
37. Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). *Rodent Models for Metabolic Syndrome Research*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–14.
38. Reaven, G. (2004). *The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals*. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2), 283–303.
39. Reaven, G M. (2005). *Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease*. *Panminerva Medica*, 47(4), 201–210.
40. McLaughlin, T., Allison, G., Abbasi, F., Lamendola, C., & Reaven, G. (2004). *Prevalence of insulin resistance and associated cardiovascular disease risk factors among normal weight, overweight, and obese individuals*. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 53(4), 495–499.
41. Tschritter, O., Fritsche, A., Shirkavand, F., Machicao, F., Häring, H., & Stumvoll, M. (2003). *Assessing the shape of the glucose curve during an oral glucose tolerance test*. *Diabetes Care*, 26(4), 1026–1033.
42. Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223.

43. Treviño, S., Sánchez-Lara, E., Sarmiento-Ortega, V. E., Sánchez-Lombardo, I., Flores-Hernández, J. Á., Pérez-Benítez, A., ... González-Vergara, E. (2015). *Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate (H₂Metf)₃ [V₁₀O₂₈].8H₂O using hypercaloric induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as biological model*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147, 85–92.
44. Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., ... Diaz, A. (2015). *A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats*. *Synapse*, 69(9), 421–433.
45. Yecies, J. L., Zhang, H. H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A. I., ...Manning, B. D. (2011). *Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel mTORC1-Dependent and Independent Pathways*. *Cell Metabolism*, 14(1), 21–32.
46. Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). *The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes*. *Nature*, 510(7503), 84–91.
47. Cases, A., & Coll, E. (2005). *Dyslipidemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients*. *Kidney International*, 68, S87–S93. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.09916.x
48. Weiner, D. E., & Sarnak, M. J. (2004). *Managing dyslipidemia in chronic kidney disease*. *Journal of General Internal Medicine*, 19(10), 1045–1052.
49. Shurraw S, Tonelli M. (2006). *Statins for treatment of dyslipidemia in chronic kidney disease*. *Perit Dial Int.*; 26:523–539.
50. Moorhead JF, Elnahas M, Chan MK, Varghese Z. (1982). *Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease*. *Lancet*, 2: 1309–1311.
51. Kasiske B.L., Odonnell M.P., Cleary M.P., Keane W.F. (1988). *Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats*. *Kidney International*; 33: 667–672.
52. Keane W.F., Mulcahy W.S., Kasiske B.L. (1991). *Hyperlipidemia and progressive renal disease*. *Kidney International Suppl*; 31: S41–S48.
53. Dominguez JH, Tang NJ, Xu W et al. (2000). *Studies of renal injury III: Lipidinduced nephropathy in type II diabetes*. *Kidney International*; 57: 92–104.
54. Maddox, D.A., Alavi, F.K., Santella, R.N., Zawada, E.T. (2002). *Prevention of obesity linked renal disease: age-dependent effects of dietary food restriction*. *Kidney International*; 62: 208–219.
55. SHAFRIR E. (1958). *Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern*. *The Journal of clinical investigation*, 37(12), 1775–1782.
56. Joles JA, Kunter U, Janssen U, Kriz W, Rabelink TJ, Koomans HA, Floege J. *Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats*. *Am Soc Nephrol*. 2000 Apr; 11(4):669-83.

57. Welsh, G. I., & Saleem, M. A. (2011). *The podocyte cytoskeleton—key to a functioning glomerulus in health and disease*. *Nature Reviews Nephrology*, 8(1), 14–21.
58. Machuca, E., Benoit, G., & Antignac, C. (2009). *Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology*. *Human Molecular Genetics*, 18(R2), R185–R194.
59. Leeuwis, J. W., Nguyen, T. Q., Dendooven, A., Kok, R. J., & Goldschmeding, R. (2010). *Targeting podocyte-associated diseases*☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(14), 1325–1336.
60. Mundel, P., Reiser, J., Borja, A. Z. M., Pavenstädt, H., Davidson, G. R., Kriz, W., & Zeller, R. (1997). *Rearrangements of the Cytoskeleton and Cell Contacts Induce Process Formation during Differentiation of Conditionally Immortalized Mouse Podocyte Cell Lines*. *Experimental Cell Research*, 236(1), 248–258.
61. Lavin, P. J., Gbadegesin, R., Damodaran, T. V., & Winn, M. P. (2008). *Therapeutic targets in focal and segmental glomerulosclerosis*. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(4), 386–392.
62. Chuang, P. Y., & He, J. C. (2009). *Signaling in Regulation of Podocyte Phenotypes*. *Nephron Physiology*, 111(2), p9–p15.[doi:10.1159/000191075](https://doi.org/10.1159/000191075)
63. Ha, T.-S., Hong, E.-J., & Han, G.-D. (2015). *Diabetic conditions downregulate the expression of CD2AP in podocytes via PI3-K/Akt signalling*. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 31(1), 50–60.
64. Mundel, P. (2002). *Podocyte Biology and Response to Injury*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12), 3005–3015.
65. Bijian, K., Takano, T., Papillon, J., Le Berre, L., Michaud, J.-L., Kennedy, C. R. J., & Cybulsky, A. V. (2005). *Actin cytoskeleton regulates extracellular matrix-dependent survival signals in glomerular epithelial cells*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(6), F1313–F1323.
66. Ichimura, K., Kurihara, H., & Sakai, T. (2007). *Actin filament organization of foot processes in vertebrate glomerular podocytes*. *Cell and Tissue Research*, 329(3), 541–557.
67. Ichimura, K., Kurihara, H., & Sakai, T. (2003). *Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(12), 1589–1600.
68. Coward, R. J. M., Welsh, G. I., Yang, J., Tasman, C., Lennon, R., Koziell, A., ... Saleem, M. A. (2005). *The Human Glomerular Podocyte Is a Novel Target for Insulin Action*. *Diabetes*, 54(11), 3095–3102.
69. GUH, J.-Y. (2010). *Proteinuria versus albuminuria in chronic kidney disease*. *Nephrology*, 15, 53–56.
70. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of CKD-MBD.
71. Klahr, S., Levey, A. S., Beck, G. J., Caggiula, A. W., Hunsicker, L., Kusek, J. W., & Striker, G. (1994). *The Effects of Dietary Protein*

- Restriction and Blood-Pressure Control on the Progression of Chronic Renal Disease. New England Journal of Medicine, 330(13), 877–884.*
72. Boersma, C., Postma, M. J., Visser, S. T., Atthobari, J., de Jong, P. E., ... de Jong-van den Berg, L. T. W. (2008). *Baseline albuminuria predicts the efficacy of blood pressure-lowering drugs in preventing cardiovascular events. British Journal of Clinical Pharmacology, 65(5), 723–732.*
 73. Levey, A. S., Cattran, D., Friedman, A., Miller, W. G., Sedor, J., Tuttle, K., ... Hostetter, T. (2009). *Proteinuria as a Surrogate Outcome in CKD: Report of a Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration. American Journal of Kidney Diseases, 54(2), 205–226.*
 74. Fioretto, P., Steffes, M. W., Brown, D. M., & Mauer, S. M. (1992). *An Overview of Renal Pathology in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Relationship to Altered Glomerular Hemodynamics. American Journal of Kidney Diseases, 20(6), 549–558.*
 75. Wolf, G. (2000). *Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. Kidney International, 58, S59–S66.*
 76. Wolf, G. (2005). *Role of reactive oxygen species in angiotensin II mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. Antioxidant & redox signaling, 1337-1345.*
 77. Wolf, G., et al. (1997). *High glucose stimulate expression of p27kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. American physiological society, 348-56*
 78. Zhang, Y., et al. (2007). *Growth pattern switch of renal cells and expression of cell cycle related proteins at the early stage of diabetic nephropathy . Biochemical and Biophysical research communication, 159-64.*
 79. Zhang, G., et al. (2012). *SSeCKS sequesters cyclin D1 in glomerular parietal epithelial cells and influences proliferative injury in the glomerulus. Laboratory Investigation, 499-510.*
 80. Mudaliar, H., Pollock, C., et al. (2014). *The role of TLR2 and 4-Mediate inflammatory pathways in Endothelial Cells Exposed to High Glucose. PLOS ONE, 1-14.*
 81. Ovidiu Vaduva, A., Glameanu, C., & et al. (2017). *In vivo cofocal microscopy quantification of reactive oxygen species: a working mode in rat kidney. Journal Morology and Embriology, 953-960.*
 82. Gurley, S. B., Ghosh, S., et al. (2018). *Inflammation and immunity pathways regulate genetic suceptibility to diabetic nephropathy. Diabetes journals, 2096-2106.*
 83. Awazu, M., et al. (2003). *The lack of cyclin kinase inhibitor p27kip1 ameliorates progression of diabetic nephropathy. Journal of American Society of Nephrology, 699-708.*
 84. Wolf, G., et al. (2003). *Erk 1,2 phospholylates p27kip1: functional evidence for a role in high glucose induced hypertrophy of mesangial cells. Diabetologia, 1090-1099.*

85. Sataranatarajan, K., & et al. (2007). Regulation of Elongation Phase of mRNA Translation in Diabetic Nephropathy. *Cardiovascular, Pulmonary and Renal Pathology*, 1733-42.
86. Mori, H., & et al. (2009). The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471-475.
87. Yang, Y., & et al. (2007). Rapamycin prevents early steps of the Development of Diabetic Nephropathy in rats. *American Journal of nephrology*, 495-502.
88. Zhu, D., & et al. (1994). Glomerular distribution of type IV collagen in diabetes by high resolution quantitative immunohistochemistry. *kidney international*, 425-33.
89. Funabiki, K., & et al. (1998). Dissociated Expression of Collagen type IV subchains in diabetic kidneys of KKAy Mice. *Nephron*, 208-13.
90. Caramori, M. L., & et al. (2002). Study Design and Renal Structural–Functional Relationships in Patients With Long-Standing Type 1 diabetes. *Cellular Basis of Diabetic Nephropathy*, 507-14.
91. Bonventre, J. V., & Yang, L. (2011). *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4210–4221.
92. Jang, H. R., & Rabb, H. (2009). *The innate immune response in ischemic acute kidney injury*. *Clinical Immunology*, 130(1), 41–50.
93. Yang, L., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. (2011). *Pathophysiology of Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease: Maladaptive Repair. Controversies in Acute Kidney Injury*, 149–155.
94. Hader, C., Marlier, A., & Cantley, L. (2009). *Mesenchymal–epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2*. *Oncogene*, 29(7), 1031–1040.
95. Humphreys, B. D., Valerius, M. T., Kobayashi, A., Mugford, J. W., Soeung, S., Duffield, J. S., ... Bonventre, J. V. (2008). *Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury*. *Cell Stem Cell*, 2(3), 284–291.
96. Humphreys, B. D., Czerniak, S., DiRocco, D. P., Hasnain, W., Cheema, R., & Bonventre, J. V. (2011). *Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9226–9231.
97. Schrimpf, C., Xin, C., Campanholle, G., Gill, S. E., Stallcup, W., Lin, S.-L., ... Duffield, J. S. (2012). *Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(5), 868–883.
98. Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H. K., Choi, B.-S., ... Cantley, L. G. (2011). *Distinct Macrophage Phenotypes Contribute to Kidney Injury and Repair*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(2), 317–326.

99. Basile, D. P., & Sutton, T. A. (2012). *Activated Pericytes and the Inhibition of Renal Vascular Stability: Obstacles for Kidney Repair. Journal of the American Society of Nephrology, 23(5), 767–769.*
100. Burne-Taney, M. J., Yokota, N., & Rabb, H. (2005). *Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury. Kidney International, 67(3), 1002–1009.*
101. Kraus, E. S., Parekh, R. S., Oberai, P., Lepley, D., Segev, D. L., Bagnasco, S., ... Montgomery, R. A. (2009). *Subclinical Rejection in Stable Positive Crossmatch Kidney Transplant Patients: Incidence and Correlations. American Journal of Transplantation, 9(8), 1826–1834.*
102. Kida, Y., & Duffield, J. S. (2011). *Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 38(7), 467–473.*
103. Chen, Y.-T., Chang, F.-C., Wu, C.-F., Chou, Y.-H., Hsu, H.-L., Chiang, W.-C., ... Lin, S.-L. (2011). *Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte–myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. Kidney International, 80(11), 1170–1181.*
104. Humphreys, B. D. (2012). *Targeting Pericyte Differentiation as a Strategy to Modulate Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy. Seminars in Nephrology, 32(5), 463–470.*
105. Hirt-Minkowski, P., Marti, H.-P., Hönger, G., Grandgirard, D., Leib, S. L., Amico, P., & Schaub, S. (2014). *Correlation of serum and urinary matrix metalloproteases/tissue inhibitors of metalloproteases with subclinical allograft fibrosis in renal transplantation. Transplant Immunology, 30(1), 1–6.*
106. Wang, Z., Famulski, K., Lee, J., Das, S. K., Wang, X., Halloran, P., ... Kassiri, Z. (2014). *TIMP2 and TIMP3 have divergent roles in early renal tubulointerstitial injury. Kidney International, 85(1), 82–93.*
107. Meng, X. M., Huang, X. R., Chung, A. C. K., Qin, W., Shao, X., Igarashi, P., ... Lan, H. Y. (2010). *Smad2 Protects against TGF- β /Smad3-Mediated Renal Fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology, 21(9), 1477–1487.*
108. García-García PM, Getino-Melián MA, Dominguez-Pimentel V, Navarro-González JF (2014). Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes; 5: 431–443.*
109. Donate, J., Martín, E., Muros-de-Fuentes, M., Mora, C., Navarro, J.F. (2015). Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res; 2015: 948417.*
110. Navarro-Gonzalez, J. F., & Mora-Fernandez, C. (2008). *The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology, 19(3), 433–442.*
111. Navarro-González J, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J: Inflammatory molecules and pathways in the

- pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 327–340.
112. Hojs, R., Ekart, R., Bevc, S., & Hojs, N. (2016). *Markers of Inflammation and Oxidative Stress in the Development and Progression of Renal Disease in Diabetic Patients*. *Nephron*, 133(3), 159–162.
 113. Lim, A. K. H., & Tesch, G. H. (2012). *Inflammation in Diabetic Nephropathy*. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1–12.
 114. Ostendorf, T., Burg, M., & Floege, J. (1996). *Cytokines and Glomerular Injury*. *Kidney and Blood Pressure Research*, 19(5), 281–289.
 115. Kelley, V.R., Bloom, R.D., Yui, M.A. Martin, C., Price, D. (1994). Pivotal role of colony stimulating factor-1 in lupus nephritis. *Kidney Int*; 45(suppl):83-85.
 116. Brady, H. R., Denton, M. D., Jimenez, W., Takata, S., Palliser, D., & Brenner, B. M. (1992). *Chemoattractants provoke monocyte adhesion to human mesangial cells and mesangial cell injury*. *Kidney International*, 42(2), 480–487.
 117. Neugarten, J., Feith G. W., Assmann, J.K., Shan, Z., Stanley, E. R., Schlondorff, D. (1995). Role of macrophages and colony-stimulating factor-1 in murine antiglomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. May; 5(11): 1903–1909.
 118. Santiago, A., Mori, T., Satriano, J., & Schlondorff, D. (1991). *Regulation of Fc receptors for IgG on cultured rat mesangial cells*. *Kidney International*, 39(1), 87–94.
 119. Tesch, G. H. (2008). *MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 294(4), F697–F701.
 120. Sutariya, B., Jhonsa, D., & Saraf, M. N. (2016). *TGF- β : the connecting link between nephropathy and fibrosis*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(1), 39–49
 121. Horssen RV, Hagen TLMT, Eggermont AMM. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist*. 2006;11:397-408.
 122. Zhang, Z., & Cai, C. X. (2016). *Kidney injury molecule-1 (KIM-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK MAPK signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 416(1-2), 109–116. doi:10.1007/s11010-016-2700-7 +
 123. Wada, J., & Makino, H. (2015). *Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy*. *Nature Reviews Nephrology*, 12(1), 13–26. doi:10.1038/nrneph.2015.175
 124. Zi, Z., Chapnick, D. A., & Liu, X. (2012). *Dynamics of TGF- β /Smad signaling*. *FEBS Letters*, 586(14), 1921–1928.
 125. Isono, M., Chen, S., Won Hong, S., Carmen Iglesias-de la Cruz, M., & Ziyadeh, F. N. (2002). *Smad pathway is activated in the diabetic*

- mouse kidney and Smad3 mediates TGF- β -induced fibronectin in mesangial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 296(5), 1356–1365.*
126. Murray, K. N., Parry-Jones, A. R., & Allan, S. M. (2015). *Interleukin-1 and acute brain injury. Frontiers in Cellular Neuroscience, 9.*
 127. MaCarthy E, Sharma R, Sharma M, Li JZ, Ge XL, Dileepan KN, et al. (1998). TNF-alpha increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide. *J AmSoc Nephrol*;9:433-8.
 128. D. H. Lovett, R. B. Sterzel, J. L. Ryan, E. Atkins, J. (1985). Production of an endogenous pyrogen by glomerular mesangial cells. *Immunol. Feb*; 134(2): 670–672.
 129. Cotran, R. S., & Pober, J. S. (1989). *Effects of cytokines on vascular endothelium: Their role in vascular and immune injury. Kidney International, 35(4), 969–975.*
 130. Barbado J, Martin D, Vega L, Almansa R, Gonçalves L et al. (2012) MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Cytokine* 60: 583-586.
 131. Murea M, Register TC, Divers J, Bowden DW, Carr JJ et al. (2012) Relationships between serum MCP-1 and subclinical kidney disease: African American-Diabetes Heart Study. *BMC Nephrol* 13: 148.
 132. Hanemann, A. L. P., Libório, A. B., Daher, E. F., Martins, A. M. C., Pinheiro, M. C. C., Sousa, M. S., & Bezerra, F. S. M. (2013). *Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) in Patients with Chronic Schistosomiasis Mansoni: Evidences of Subclinical Renal Inflammation. PLoS ONE, 8(11), e80421.*
 133. Horii, Y., Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, et al. (1989). *J Immunol. Dec 15*;143(12):3949-55.
 134. FLOEGE, J., TOPLEY, N., HOPPE, I., BARRETT, T. B., & RESCH, K. (2008). *Mitogenic effect of platelet-derived growth factor in human glomerular mesangial cells: modulation and/or suppression by inflammatory cytokines. Clinical & Experimental Immunology, 86(2), 334–341.*
 135. Abbott F.Tam FWK, RyanJJ. Rees AJ: Human mesangial cells synthesise interleukin-1 a but not interleukin-lb. interleukin receptor antagonist or tumour necrosis factor. *Nephrol Dial Transplant* 19 9 2 : 7 : 9 9 7 - 100 .
 136. Ikeda M. Ikeda U, Ohara T. Kusano F.. Kano S: Recombinant interleukin-6 inhibits the growth of rat mesangial cells in culture. *Am .1 Pathol* 1992:141:327-334
 137. Domingueti, C. P., Fóscolo, R. B., Reis, J. S., Campos, F. M. F., Dusse, L. M. S., Carvalho, M. das G., ... Fernandes, A. P. (2016). *Association of Haemostatic and Inflammatory Biomarkers with*

- Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. Journal of Diabetes Research, 2016, 1–8.*
138. Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Muros-de-Fuentes, M., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2015). *Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. Journal of Diabetes Research, 2015, 1–9.*
 139. Venkatachalam, M. A., Weinberg, J. M., Kriz, W., & Bidani, A. K. (2015). *Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. Journal of the American Society of Nephrology, 26(8), 1765–1776*
 140. Hanemann, A. L. P., Libório, A. B., Daher, E. F., Martins, A. M. C., Pinheiro, M. C. C., Sousa, M. S., & Bezerra, F. S. M. (2013). *Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) in Patients with Chronic Schistosomiasis Mansoni: Evidences of Subclinical Renal Inflammation. PLoS ONE, 8(11), e80421.*
 141. Lan, R., Geng, H., Polichnowski, A. J., Singha, P. K., Saikumar, P., McEwen, D. G., ... Venkatachalam, M. A. (2012). *PTEN loss defines a TGF- β -induced tubule phenotype of failed differentiation and JNK signaling during renal fibrosis. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 302(9), F1210–F1223.*
 142. Suzuki, T., Kimura, M., Asano, M., Fujigaki, Y., & Hishida, A. (2001). *Role of Atrophic Tubules in Development of Interstitial Fibrosis in Microembolism-Induced Renal Failure in Rat. The American Journal of Pathology, 158(1), 75–85.*
 143. Venkatachalam, M. A., Griffin, K. A., Lan, R., Geng, H., Saikumar, P., & Bidani, A. K. (2010). *Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 298(5), F1078–F1094.*
 144. Geng, H., Lan, R., Wang, G., Siddiqi, A. R., Naski, M. C., Brooks, A. I., ... Venkatachalam, M. A. (2009). *Inhibition of Autoregulated TGF β Signaling Simultaneously Enhances Proliferation and Differentiation of Kidney Epithelium and Promotes Repair Following Renal Ischemia. The American Journal of Pathology, 174(4), 1291–1308.*
 145. Geng, H., Lan, R., Singha, P. K., Gilchrist, A., Weinreb, P. H., Violette, S. M., ... Venkatachalam, M. A. (2012). *Lysophosphatidic Acid Increases Proximal Tubule Cell Secretion of Profibrotic Cytokines PDGF-B and CTGF through LPA2- and G α q-Mediated Rho and α v β 6 Integrin-Dependent Activation of TGF- β . The American Journal of Pathology, 181(4), 1236–1249.*
 146. Fujigaki, Y., Muranaka, Y., Sun, D., Goto, T., Zhou, H., Sakakima, M., ... Hishida, A. (2004). *Transient myofibroblast differentiation of interstitial fibroblastic cells relevant to tubular dilatation in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. Virchows Archiv, 446(2), 164–176.*

147. Yuan, H.-T., Li, X.-Z., Pitera, J. E., Long, D. A., & Woolf, A. S. (2003). *Peritubular Capillary Loss after Mouse Acute Nephrotoxicity Correlates with Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Hypoxia-Inducible Factor-1 α* . *The American Journal of Pathology*, 163(6), 2289–2301.
148. Van Timmeren, M. M., Bakker, S. J. L., Vaidya, V. S., Bailly, V., Schuurs, T. A., Damman, J., ... van Goor, H. (2006). *Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(2), F456–F464.
149. Zhang, Z., & Cai, C. X. (2016). *Kidney injury molecule-1 (KIM-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK MAPK signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 416(1-2), 109–116.
150. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R., & Bonventre, J. V. (2002). *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. *Kidney International*, 62(1), 237–244.
151. Van Timmeren, M., van den Heuvel, M., Bailly, V., Bakker, S., van Goor, H., & Stegeman, C. (2007). *Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease*. *The Journal of Pathology*, 212(2), 209–217.
152. Nielsen, S. E., Rossing, K., Hess, G., Zdunek, D., Jensen, B. R., Parving, H.-H., & Rossing, P. (2012). *The effect of RAAS blockade on markers of renal tubular damage in diabetic nephropathy: u-NGAL, u-KIM1 and u-LFABP*. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 72(2), 137–142.
153. Nielsen, S. E., Sugaya, T., Tarnow, L., Lajer, M., Schjoedt, K. J., Astrup, A. S., ... Rossing, P. (2009). *Tubular and Glomerular Injury in Diabetes and the Impact of ACE Inhibition*. *Diabetes Care*, 32(9), 1684–1688.
154. Myśliwska J, Zorena K, Semetkowska-Jurkiewicz E, Rachoń D, Suchanek H, Myśliwski A. *Eur Cytokine Netw.* (2005) High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. *Jun*; 16(2):117-22.
155. Interleukin-10 inhibits macrophage-induced glomerular injury. Huang XR, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb; 11(2):262-9.
156. Vallon, V., & Komers, R. (2011). *Pathophysiology of the Diabetic Kidney*. *Comprehensive Physiology*.
157. Palafox A.C., (2017). *Efecto de la administración de Metformina sobre la función renal en rata Wistar con síndrome diabetogénico tipo 1 y 2*. Tesis de licenciatura.

12. ANEXOS

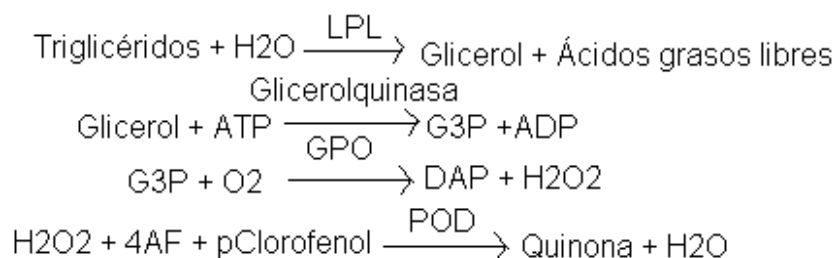
1. Composición de las dietas

Composición porcentual	Dieta normocalorica (DNC) LabDiet 5001 (%)	Dieta hipercalorica (DHC) (MX/E/2013/047377) (%)	% calorico Kcal/g LabDiet 5001	% calorico Kcal/g DHC
Carbohidratos	48.7	71.4	56.36	77.82
Proteínas	23.9	7.3	13.02	7.95
Acidos grasos	5.0	5.8	27.66	14.22
Fibra (cruda)	5.1	0.0	2.95	0.0
Cenizas	7.0	3.5	0.0	0.0
Total	90.4	88.0	99.99	99.99

2. Fundamentos

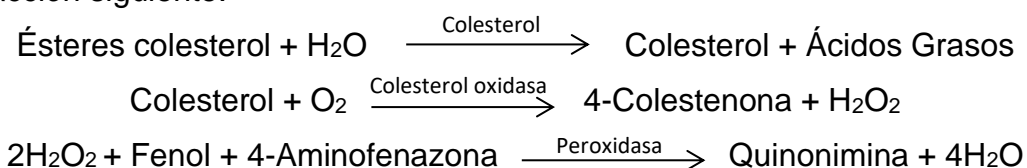
Determinación de la concentración de triglicéridos.

La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es medida a una longitud de onda de 505 nm.



Determinación de la Concentración de Colesterol

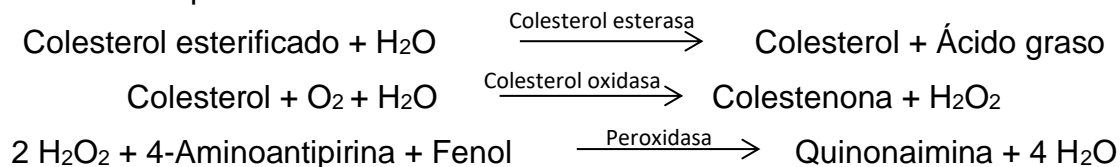
El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada, que es medida a una longitud de onda de 505 nm.

Determinación de Colesterol de Lipoproteínas de alta densidad (HDLc)

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las siguientes reacciones acopladas:



3. Histología

Tinción de Hematoxilina-Eosina

φ Fundamento

Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar los cortes se someten a la acción de la hematoxilina, colorante básico, que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfato del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, los cortes se someten a la acción de la eosina, colorante débilmente ácido, que colorea a las estructuras básicas. Aquellas estructuras con un pH intermedio se teñirán con ambos colorantes. Esencialmente la hematoxilina tiñe los núcleos de color azul negrozco, con buen detalle intracelular, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y la mayoría de las fibras del tejido conectivo con distintas tonalidades de rosa, naranja y rojo

Tinción Tricromica de Masson

φ Fundamento

Esta es una tinción diferencial y policrómica que emplea tres colorantes. Son la hematoxilina (colorante nuclear), la fucsina (colorante citoplásmico) y el azul de anilina (**colorante del conjuntivo**). Esta tinción es útil para poner de manifiesto las fibras de colágeno, y el conectivo en general, en comparación células musculares o epitelios.

Tinción de PAS

φ Fundamento

Esta tinción se utiliza para evidenciar la presencia de grupos aldehídos formados por oxidación previa de los hidratos de carbono.

El fundamento de la reacción consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos. Posteriormente, se trata la muestra con el reactivo de Schiff que

reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos dando lugar a una coloración rojo-púrpura característica.

Inmunología

φ Fundamento

Las técnicas de Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se fundamentan en la reacción Antígeno - Anticuerpo. Un primer anticuerpo se dirige contra la proteína de interés (antígeno) y la reconoce generando una interacción fuerte, el anticuerpo que no interactúa con su antígeno es removido y se coloca un segundo anticuerpo, el cual tendrá como fin reconocer al primer anticuerpo acoplado a su antígeno, como esta reacción es incolora se utiliza, para la IHC: reacción enzima-sustrato, entre el segundo anticuerpo que se acopla a peroxidasa y su sustrato diaminobencidina, que convierten al cromógeno sin color en un compuesto coloreado que permite identificar el lugar donde se depositaron los anticuerpos reaccionantes, en depósitos anaranjados-cafés; y para la IF: anticuerpos conjugados con un fluoróforo que al ser excitados en el microscopio de epifluorescencia nos permiten evidenciar la presencia de los anticuerpos unidos.