



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Leopoldo Ardiles A.
INSTITUTO: Medicina. Laboratorio de Nefrología
FACULTAD: Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Alejandro Yáñez C.
INSTITUTO: Bioquímica
FACULTAD: Ciencias

DESARROLLO DE MICRO-ALBUMINURIA EN LA DIABETES EXPERIMENTAL

INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico

PAULINA MARGOT RAMÍREZ MALDONADO

VALDIVIA – CHILE

2007

Agradecimientos:

En primer lugar a Dios por permitirme cumplir uno de mis sueños.

A mi madre, hermana y abuela por apoyarme y esperarme todo este tiempo.

A César por estar a mi lado, apoyarme y acompañarme todas las veces que debía ver mis ratas.

A mi profesor patrocinante, el doctor Leopoldo Ardiles por su constante apoyo, paciencia y sobre todo por confiar en mi para la realización de este trabajo.

A mi profesor copatrocinante, el doctor Alejandro Yáñez por toda su ayuda y paciencia en el desarrollo de esta tesis.

A los estudiantes de Bioquímica: Francisco, Rodrigo y Joel, por toda su ayuda para la realización de las mediciones.

A la doctora Viviana Bustos por enseñarme el manejo fundamental para trabajar con animales.

A las señoras Graciela y Maria Eugenia del laboratorio de Nefrología de la Universidad Austral de Chile por toda su ayuda y enseñanzas que hicieron posible la realización de esta tesis.

A los doctores Claudio Aros y Jorge Mukdsi por su ayuda.

A don Alfredo del bioterio de histología por su paciencia y sobre todo su ayuda en la mantención de mis ratas.

Finalmente le agradezco a una personita que llegó hace poco a compartir su vida conmigo, a mi hermanito Salvador que el cuidarlo un año me ayudo a esforzarme mucho más en la culminación de esta tesis.

Esta tesis fue realizada con financiamiento de los proyectos:

DID-S-2005-42, DID-S-2006-70 y FONDECYT 1051057.

ÍNDICE

1. Resumen	4
Summary	5
2. Introducción	6
2.1. Diabetes mellitus	6
2.1.2 <i>Fisiopatología de la diabetes</i>	7
2.1.3 <i>Complicaciones agudas y crónicas de la diabetes</i>	8
2.1.4 <i>Nefropatía diabética</i>	9
2.1.5 <i>La proteinuria en la diabetes</i>	14
2.1.6 <i>Modelos experimentales para generar diabetes</i>	15
2.2 Objetivos del presente estudio	18
2.3 Hipótesis	18
2.4 Estudio	18
3. Materiales y métodos	19
4. Resultados	25
5. Discusión	38
6. Conclusiones y Proyecciones	45
7. Bibliografía	46
8. Anexos	50

1. RESUMEN

Con el objetivo de encontrar marcadores no invasivos, de fácil obtención y reproducción para la nefropatía diabética se montó un modelo experimental de diabetes por estreptozotocina (STZ).

Se utilizaron 30 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley entre 280 y 350 gramos a las que se les indujo diabetes administrando en forma intravenosa (vena coccígea) 50 mg/Kg de STZ. Transcurridas 72 hrs., a las ratas con glucosuria positiva se les determinó glicemia y aquellas con glicemias sobre 140 mg/dL fueron utilizadas para conformar el grupo diabético. Mensualmente se recolectó orina para estudios de creatinina y albúmina y para los controles periódicos de glicemia se tomó muestras de sangre de la cola. Se mantuvieron en dieta alimenticia libre durante un período de ocho meses, sacrificándose algunas ratas para evaluar lesiones a nivel de tejido renal. Se observó hiperglicemias en un rango de 140 a 622 mg/dL por lo que se hizo necesario separar en grupos según hiperglicemias (leve, moderada y severa), evidenciándose una tendencia a la normalización en el grupo con hiperglicemia leve.

Al mes de inducida la diabetes fue posible encontrar niveles anormalmente elevados de albúmina urinaria en el 50% de las ratas, lo que corresponde a concentraciones de albúmina por sobre 0,48 mg/mg creatinina. Este fenómeno es persistente, en aumento y sólo dos ratas no desarrollaron nunca micro-albuminuria, para el modelo de mg albúmina/mg creatinina, durante el estudio. Histológicamente fue posible observar por microscopia electrónica engrosamiento de membrana basal glomerular y fusión pedicular en ratas con 4 y 6 meses de diabetes.

La aparición de micro-albuminuria persistente acompaña e incluso puede preceder en el tiempo a las alteraciones renales histológicas, por lo que puede ser considerado un marcador útil y precoz de compromiso renal en este modelo.

SUMMARY

Looking for non invasive, easy and reproducible marker of diabetic nephropathy an experimental model based on the induction of diabetes by streptozotocin (STZ) was standardized.

A total of 30 male Sprague-Dawley rats between 280 and 350 grams was used. Diabetes was induced by administration of intravenous (coccigeal vein) of STZ 50 mg/Kg. After 72 hrs., rats with glucosuria positive were studied for blood levels of glycemia and those with glycemia over 140 mg/dL were considered diabetic. Monthly, urine was collected for studies of creatinine and albumin and the blood was collected for controls of glycemia. The rats were observed for eight months and some rats were sacrificed for evaluation of renal tissue. Hyperglycemia in a range of 140-622 were observed prompting to separate in groups according to the degree of hyperglycemia (light, moderate and severe), demonstrating a discrete diminution in the group corresponding to weight hyperglycemia.

As early as at the first month abnormal levels of urinary albumin was found in the 50% of the rats, corresponding to concentrations of albumin over 0,48 mg/mg creatinine in a sustained pattern and only two rats never developed microalbuminuria for mg albumin/mg creatinine method. Histologically it was possible to observe glomerular basal membrane thickening in rats of 4 and 6 months of follow up.

Persistent microalbuminuria coexist or may precede the histological renal alterations and might be considered a good marker of renal involvement in this model.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Diabetes mellitus:

Esta enfermedad se define como un conjunto de síndromes que se caracterizan por un déficit en la secreción de insulina o de su acción, lo que origina trastornos en el metabolismo intermediario de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, y que se caracteriza por múltiples manifestaciones clínicas y anatómicas (Contreras, 1994; Pizzorno y Murria, 1995; Figuerola, 1997; Herrera, 2001). Existen dos tipos de diabetes:

a) ***Diabetes Mellitus Insulino Dependiente*** (DMID): Baynes y Dominiczak (1999) y Herrera (2001), señalan que del número total de diabéticos del mundo, aproximadamente el 10% corresponde a DMID, antiguamente denominada diabetes tipo 1. Este tipo de diabetes se caracteriza básicamente por un inicio en general brusco, antes de los 30 años de edad, tendencia a la cetosis, ausencia de obesidad y evidencia de factores auto-inmunitarios en su etiología (Figuerola, 1997). Es así que al momento del diagnóstico se aprecia una virtual desaparición de las células β del páncreas encargadas de producir la insulina, ya sea por un proceso auto inmunitario o idiopático (Freijanes y Florez, 1997). Este proceso podría comenzar por una susceptibilidad genética y algunos acontecimientos ambientales que inician el proceso destructivo de estas células pancreáticas (Foster, 1998).

b) ***Diabetes Mellitus no Insulino Dependiente*** (DMNID): La DMNID –diabetes tipo 2- corresponde aproximadamente al 90% del número total de diabéticos en el mundo (Baynes y Dominiczak, 1999; Herrera, 2001) y se caracteriza porque suele iniciarse en forma progresiva, después de los 40 años (aunque en obesos puede desarrollarse anticipadamente), no tiende a la cetosis, frecuentemente cursa con obesidad y presenta una pronunciada agregación familiar (Figuerola, 1997). En este caso, el páncreas secreta cantidades muy variables de insulina, de

forma que su concentración plasmática puede ser normal e incluso superior a la normal, pero relativamente insuficiente para mantener niveles normales de glicemia (Freijanes y Florez, 1997). La alta frecuencia de la diabetes tipo 2 (afecta hasta un 7% de la población de Estados Unidos), y su aumento, se debe –entre otros factores- al aumento de la vida media de la población en general y al estilo de vida de ésta (obesidad, dieta rica en grasas y sedentarismo) (Figuerola, 1997; Freijanes y Florez, 1997; Herrera, 2001).

2.1.2 Fisiopatología de la Diabetes Mellitus

La insulina es una proteína constituida por dos cadenas de aminoácidos (A y B), las que están unidas por dos puentes disulfuro (Figuerola, 1997; Greco y Stabenfeldt, 1999). Se sintetiza en el interior de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas en forma de un precursor, la “pro insulina”, que en el momento de su liberación a la sangre, se rompe en sus dos componentes, “insulina” y “péptido C” (Arteaga, 1992; Figuerola, 1997). Esta liberación en el páncreas está sometida a múltiples factores de regulación, químicos, nerviosos y hormonales, pero, como es lógico, son las modificaciones de los principales sustratos energéticos (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos) los que inducen modificaciones inmediatas en la respuesta (Freijanes y Florez, 1997). Los efectos de la insulina corresponden principalmente a una disminución de las concentraciones sanguíneas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, promoviendo la conversión intracelular de éstos en sus formas de almacenamiento en el organismo, como lo son glucógeno, triglicéridos y proteínas (Greco y Stabenfeldt, 1999).

Cuando ocurre un déficit secretor de insulina (insulinopenia), una disminución de la sensibilidad periférica a la insulina (insulinorresistencia) o una combinación de ambos mecanismos, se llega a la hiperglicemia (Figuerola, 1997). Esta es la causante de los síntomas clásicos de la diabetes: polidipsia, polifagia y poliuria (Foster, 1998; Velásquez, 2001). Otro

síntoma considerado como clásico es la astenia, que se caracteriza por falta de fuerzas y ánimo por el defecto metabólico producto de la falta o ineficaz acción de la insulina, la principal hormona anabólica (Jara y col., 2001). El adelgazamiento, signo clásico de la DMID, es producido por la ineficacia del metabolismo glucídico, proteico y graso, debido a la falta o disminución importante de insulina. En lo que respecta a la DMNID, como aún existe una reserva importante de insulina (o incluso niveles altos), suele haber tendencia a la obesidad, la que acentúa aún más el proceso de resistencia insulínica característico de esta variedad. La tendencia a las infecciones no suele incluirse entre los signos clásicos, pero es frecuente, al igual que el retraso de la cicatrización de las heridas en estados avanzados, en especial en los pies (Jara y col., 2001).

2.1.3 Complicaciones agudas y crónicas de la Diabetes Mellitus

Las complicaciones de la diabetes mellitus se clasifican en agudas y crónicas (Figuerola, 1997; Choate, 1998; Velásquez, 2001). Además de la hiperglicemia, los diabéticos están expuestos a dos complicaciones metabólicas agudas importantes: la cetoacidosis diabética y el coma hiperosmolar no cetósico (Foster, 1998). En cuanto a las complicaciones crónicas, se pueden mencionar alteraciones neurológicas y de los vasos pequeños (microangiopatía), tanto de la retina (retinopatía) como de los glomérulos renales (nefropatía) (Figuerola, 1997; Velásquez, 2001). Este compromiso micro vascular es causa de ceguera y de insuficiencia renal crónica, respectivamente. La micro-albuminuria es definida, en el ser humano, como la excreción urinaria de 30 a 300 mg/día de albúmina y es una condición que antecede al desarrollo de una nefropatía irreversible. Esta última se evidencia por una excreción urinaria de albúmina creciente y progresiva, compromiso de la velocidad de filtración glomerular que aparece habitualmente después de 10 a 15 años de enfermedad.

El mal control de la diabetes conduce también a la macroangiopatía, definida por Lobón y Escobar (2001) como una afección global de los grandes vasos con características singulares que la distinguen de la aterosclerosis. La macroangiopatía puede afectar las arterias coronarias, cerebrales y periféricas incrementando las complicaciones cardiovasculares en estos pacientes (Gedaps, 2000; Velásquez, 2001).

2.1.4 Nefropatía diabética:

Síndrome caracterizado por alteraciones morfológicas y funcionales renales como hiperfiltración glomerular, hipertrofia renal con incremento en la excreción de albúmina conocida como micro-albuminuria, incremento del grosor de la membrana basal glomerular (MBG) y expansión mesangial con acumulación en la matriz extracelular de proteínas como colágeno, fibronectina y laminina.

Las alteraciones glomerulares que cursan en la nefropatía diabética son de dos tipos:

a) Glomerulosclerosis difusa, que consiste en un engrosamiento difuso y homogéneo de la membrana basal de los capilares glomerulares. Esta alteración siempre se halla presente y puede ser la única lesión detectable en las fases precoces o preclínicas de la glomerulopatía diabética.

b) Glomerulosclerosis nodular, representa una lesión más específica, es menos frecuente que la forma difusa; esta lesión glomerular consiste en nódulos eosinófilos sin proliferación celular y rodeados en su periferia por capilares glomerulares de aspecto normal.

Otro grupo de lesiones glomerulares asociadas con frecuencia a la nefropatía diabética lo constituyen las lesiones hialinas, que consiste en el depósito local de sustancia eosinófila en la pared de algunos capilares glomerulares o en el seno de la cápsula de Bowman.

Entre las lesiones vasculares destacan la arteriolosclerosis hialina que no se distingue de la de los pacientes no diabéticos, excepto por su intensidad y porque no siempre se relaciona con la co-existencia de hipertensión arterial o de edad avanzada, siendo muy común que se afecten arteriolas glomerulares eferentes.

Cuando la enfermedad renal se detecta en sus comienzos (durante la micro-albuminuria), existen varios tratamientos que pueden ayudar a evitar que la enfermedad renal progrese. A medida que la enfermedad renal progresa se destruye un mayor número de glomérulos superando el límite de la micro-albuminuria se llama macro-albuminuria. La hipertensión normalmente acompaña a la nefropatía diabética, con disfunción endotelial, anormalidades del metabolismo de lípidos, resistencia a la insulina y glicosilación de proteínas.

Además de ser la manifestación más temprana de la nefropatía, la albuminuria es un marcador de una morbilidad y mortalidad cardíacas aumentadas en los pacientes con diabetes tipos 1 y 2. De esta forma, el hallazgo de micro-albuminuria es una indicación para investigar una posible enfermedad cardiovascular y de una intervención agresiva para reducir los factores de riesgo cardiovasculares. (por ejemplo, reducción de LDLs, tratamiento antihipertensivo, cese del hábito de fumar, institución de ejercicio, etc.). Adicionalmente, existe alguna evidencia preliminar que sugiere que la reducción del colesterol puede también reducir la proteinuria. Estudios han demostrado que con un buen control glicémico por largos periodos llevan a una disminución en las complicaciones micro vasculares crónicas incluyendo la enfermedad renal.

En las primeras etapas se observan riñones hipertróficos, aumento del filtrado glomerular y micro-albuminuria, la que al principio es intermitente y aparece en relación al mal control metabólico y/o el ejercicio físico intenso y luego se presenta en forma permanente. Estas modificaciones precoces pueden ser producidas por una vasodilatación renal, especialmente de la

arteriola aferente, lo que conducirá al aumento del flujo y de la presión intraglomerular, aun cuando deben influir también los cambios estructurales y de superficie que pudieran producirse por la hipertrofia renal concomitante. Es importante resaltar las alteraciones del sistema renina angiotensina, de las prostaglandinas, del sistema calicreína-cinina y de la sustancia natriurética atrial que presenta la mayoría de los pacientes diabéticos. Del desequilibrio entre los sistemas dilatador y vasoconstrictor, resulta un predominio de los primeros que junto con los factores antes mencionados provocan un estado hiperfiltrante y un aumento de la presión intraglomerular. La presión intraglomerular parece ser el factor decisivo en el desarrollo de expansión mesangial y el daño posterior de algunos glomérulos. El daño irreversible de los mismos lleva a modificaciones hemodinámicas del resto, estableciéndose un mecanismo de auto perpetuación de la lesión, independiente de las modificaciones metabólicas.

La clasificación para la enfermedad renal asociada a la diabetes más utilizada es la Mogensen, que la divide en cinco etapas:

Etapa I: en la que se demuestra aumento de la excreción de albúmina basal postejercicio y con un tratamiento optimizado de la diabetes se puede revertir.

Etapa II: aparecen lesiones histopatológicas mínimas, persiste el aumento del filtrado glomerular y la micro-albuminuria aparece en forma intermitente. En esta etapa no se conoce si se pueden revertir estas alteraciones.

Etapa III: (Nefropatía incipiente) se acentúan las lesiones y alteraciones funcionales y se puede demostrar aumento incipiente de la presión arterial. Hay micro-albuminuria persistente.

Etapa IV: corresponde a la nefropatía clínica con el síndrome clínico completo: macroproteinuria, a veces síndrome nefrótico, hipertensión arterial, retinopatía diabética y grados variables de insuficiencia renal.

Etapa V: corresponde a la nefropatía diabética en etapa de insuficiencia renal avanzada con el cuadro clínico del síndrome urémico.

Muchos autores, desde el punto de vista clínico, prefieren dividir la historia clínica de la nefropatía diabética en las siguientes etapas:

1) *Nefropatía incipiente:* se caracteriza por alteraciones funcionales mínimas con aumento del filtrado glomerular y micro albuminuria. Se considera hiperfiltración glomerular cuando la depuración de creatinina se halla por encima de 140 mL/min. El diagnóstico precoz de nefropatía diabética en esta etapa se realiza mediante la determinación de micro-albuminuria. Su medición se puede hacer por métodos químicos (inmunoturbidimetría o nefelometría), por radioinmunoanálisis o por tirillas reactivas (Micraltest Boehringer Mannheim). En el humano, tiene valor diagnóstico cuando supera los 20 mcg/min. o 30 mg/24 hrs. en por lo menos dos determinaciones con un intervalo de seis meses.

Estas alteraciones deben ser investigadas sistemáticamente en todo paciente diabético pues el nivel de micro-albuminuria tiene un valor pronóstico en la evolución a etapas posteriores. Se ha demostrado que valores persistentes superiores a 80 mcg/min. se relacionan con progresión a la nefropatía clínica. Deckert y col. consideran el incremento anual de la micro albuminuria (más de 5% / año) como el método más específico para identificar a los pacientes que desarrollaran nefropatía diabética. En esta etapa se puede demostrar aumento variable de la presión arterial por presurometría; la alteración más precoz es la falta de la disminución nocturna en el ritmo circadiano de la presión arterial.

2) *Nefropatía clínica:* El período clínico se presenta en el 30 a 40% de los diabéticos insulino dependientes. La base histopatológica es una glomerulopatía difusa o nodular. El cuadro clínico se caracteriza por una proteinuria superior a 300 mg/24 hrs. y en algunos casos se traduce

en un síndrome nefrótico propiamente tal. Además presentan hipertensión arterial y retinopatía diabética. La disminución del filtrado glomerular en este período es variable e individual aunque en promedio el descenso es de 1ml/min/mes cuando no se realiza tratamiento adecuado. Los edemas en el diabético pueden responder a otra causa como insuficiencia cardiaca, hipertensión arterial, glomerulopatías primarias, etc.

La hipertensión arterial se presenta en el 58% de los nefrópatas diabéticos en esta etapa. La presencia de micro aneurismas en el fondo de ojo, que corresponde a una micro-angiopatía, debe hacernos sospechar la existencia de una lesión diabética renal pues existen evidencias de una asociación muy intensa entre ambas situaciones. Las pruebas funcionales presentan modificaciones inespecíficas con disminución del filtrado glomerular en la etapa de nefropatía clínica avanzada, del flujo plasmático renal, del transporte máximo de excreción y reabsorción de electrolitos y de la fracción de filtración glomerular.

3) *Nefropatía en insuficiencia renal avanzada*: El período urémico es aquel que se presenta después de más de 20 años de evolución como consecuencia del colapso glomerular con un acelerado descenso del filtrado glomerular y el correspondiente aumento de la creatinina y de la urea. El paciente evoluciona desde un estado de aparente salud hasta un deterioro importante por las complicaciones vasculares, especialmente a nivel retinal y cardiovascular.

En algunos casos el trasplante renal puede ser una alternativa, pero en general la mayoría de los diabéticos que llegan a la fase terminal no se encuentran en condiciones de generales que aseguren una buena calidad de vida después de la cirugía.

2.1.5 La proteinuria en la diabetes:

A la presencia de proteínas en la orina se le denomina proteinuria y es un sensible indicador de disfunción renal, especialmente de daño glomerular. En condiciones normales, no existen proteínas en la orina, ya que los espacios en la membrana filtrante del glomérulo normal son demasiado pequeños como para permitir su paso. Si la membrana glomerular está lesionada como ocurre en la glomerulopatía diabética, los espacios de filtración se agrandan y las proteínas pueden pasar a la orina. Su escape progresivo causa una afección nutricional, acelera el daño de los riñones y es una de las causas del edema, entre otras varias manifestaciones.

En la diabetes, casi todo el almacenamiento de proteínas se detiene (Guyton y Hall, 1997). El catabolismo proteico aumenta, la síntesis proteica se detiene y la concentración plasmática de aminoácidos se eleva considerablemente; la mayor parte de este exceso de aminoácidos se utiliza directamente para obtener energía o como sustrato para la gluconeogenesis (Durruty y García, 1992; Guyton y Hall, 1997). Esta degradación de los aminoácidos también provoca un aumento de la excreción de urea por la orina. La pérdida de proteínas resultante es uno de los efectos más graves de la diabetes mellitus, pudiendo determinar una extrema debilidad, así como alteración de muchas funciones de los órganos (Guyton y Hall, 1997).

En condiciones fisiológicas es normal una excreción urinaria de proteínas que no excede los 150 mg/día en adultos y 140 mg/día en niños. La mayoría de las proteínas excretadas por un individuo normal corresponden a albúmina, inmunoglobulinas, inmunoglobulinas de cadena liviana y a las proteínas de Tam-Horsfall que corresponde a una mucoproteína secretada por los túbulos distales. La cantidad encontrada final se debe a que no toda la proteína filtrada por el glomérulo es reabsorbida por el túbulo proximal (Finco, 1997). Cuando la proteinuria se encuentra sobre el valor considerado como normal, es siempre considerada patológica (Kraft y

Schillinger, 1999). La proteinuria debida a alteración glomerular es en sus inicios relativamente selectiva, siendo la albúmina su principal componente (Finco, 1997).

La proteinuria es un hallazgo característico de la enfermedad diabética humana y cuando alcanza niveles de macro-albuminuria, su presencia en los túbulos renales genera una activación de los fenómenos inflamatorios con tendencia a la fibrosis y potencia el paso a la insuficiencia renal crónica y cualquier esfuerzo para reducirla o anularle, redundará por tanto en un enlentecimiento de la progresión a la cronicidad de la nefropatía diabética y los requerimientos de terapias de sustitución (diálisis o trasplante).

Por otra parte, siendo la proteinuria un marcador no invasivo de los fenómenos patológicos que ocurren en el riñón diabético, y además cuando se ha publicado que la reducción de los niveles de albúmina se correlaciona con un mejor pronóstico de la nefropatía, resulta fundamental conocer si estas mismas consideraciones ocurren en un modelo experimental manipulable y reproducible.

2.1.6 Modelos experimentales para generar Diabetes Mellitus:

Los modelos experimentales que actualmente están siendo utilizados en las investigaciones de diabetes en todo el mundo se basan en el uso de químicos y los animales transgénicos, existiendo para estos últimos una gran variedad de cepas. Para el caso de las ratas, la cepa BB es ampliamente usada como modelo de DMID (Kaneko, 1997) y las cepas Wistar Fatty Rats y las Zucker Fatty Rats como modelo de DMNID, entre muchas otras (Noda y col., 2001).

La inducción de diabetes experimental en animales de laboratorio usando químicos, los cuales destruyen la célula β pancreática, es muy conveniente y de uso bastante simple. Para este

fin, los químicos más utilizados en la actualidad son haloxano y estreptozotocina (STZ) (Szkudelski, 2001).

El haloxano es un agente antineoplásico que ocasiona diabetes tipo 1 por destrucción selectiva de células β en el páncreas. Los animales de experimentación utilizados son la rata, el mono, el perro y el sapo.

La STZ es una nitrosourea sintetizada por el microorganismo *Streptomyces achromogenes*, se le han atribuido propiedades antineoplásicas y antibióticas, y es comúnmente utilizado en la inducción de diabetes mellitus debido a su efecto tóxico específico de la célula β pancreática (Konrad y col., 2001; Szkudelski, 2001; Bolzan y Bianchi, 2002). La STZ entra a la célula β vía transportador de glucosa GLUT2 y causa alquilación del ADN. El daño a este ADN induce la activación de poli ADP-ribosilación, un proceso que es más importante en la actividad diabetogénica de la STZ que el daño mismo al ADN. La poli ADP-ribosilación produce una disminución del NAD⁺ y ATP. Aumentada la desfosforilación del ATP, después de un tratamiento con STZ, se provee de un sustrato para la xantina oxidasa, resultando en la formación de radicales súper óxidos. Consecuentemente, también son producidos peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. Además, la STZ libera cierta cantidad tóxica de óxido nítrico, el que inhibe la actividad celular y también participa en el daño al ADN. Como resultado de la acción de STZ, se produce la destrucción de la célula β pancreática por necrosis y el consecuente estado diabetogénico (Szkudelski, 2001).

La acción de STZ en la célula β produce hiperglicemia y una disminución de los niveles de insulina circulantes a las 2 horas después de administrada, sin embargo, 6 horas post-administración, se presenta hipoglicemia e hiperinsulinemia y finalmente, los niveles de insulina disminuyen y se produce hiperglicemia mantenida (West y col., 1996).

El rango de dosis utilizada es bastante amplio. En el caso de las ratas, lo más frecuente es que se utilice una dosis endovenosa (IV) única de 40 a 60 mg/Kg de peso. Este rango también es eficaz cuando se aplica dosis única intraperitoneal, pero dosis menores a 40 mg/Kg pueden ser insuficientes para la inducción de diabetes (Szkudelski, 2001). Zhang y col. (2003), asegura que previo a una alimentación hipercalórica durante 2 meses, la administración IV de STZ en dosis única de 15 mg/Kg bastaría para inducir DMNID en ratas. Thibault y col. (1992), analizó el poder diabetogénico de STZ en dosis de 20, 27, 30 y 35 mg/kg IV, obteniendo grados de intolerancia a la glucosa que aumentaban a medida que se incrementaba la dosis.

Nosotros utilizamos una dosis de 50 mg/kg de STZ ya que es la mínima dosis que produce diabetes en el mayor número de ratas con una baja tasa de mortalidad, esperando encontrar alteraciones metabólicas e histológicas similares a las típicas de la nefropatía diabética de larga evolución en el ser humano, en un período acotado en ratas.

Este modelo que ha sido probado en otras oportunidades nos permite producir una buena experimentación de lo que ocurre con la enfermedad en humanos.

2.2 Objetivos del presente estudio

2.2.1 OBJETIVOS GENERALES:

1. Demostrar la aparición de alteraciones urinarias y sanguíneas propias de la diabetes mellitus en el modelo de estreptozotocina.
2. Evaluar el perfil temporal de aparición de micro-albuminuria en el modelo experimental como un marcador precoz de nefropatía diabética.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Montar el modelo de diabetes mellitus tipo 1 inducida por estreptozotocina y establecer un paralelo con la enfermedad en humanos.
2. Evaluar el método de azul de bromofenol como método en la determinación de micro-albuminuria en la diabetes mellitus experimental.
3. Familiarizar al estudiante con la toma de muestras, el proceso de laboratorio y la evaluación de los resultados obtenidos proyectando los datos para ser utilizados en futuras experimentaciones.

2.3 Hipótesis

La inyección de una dosis de estreptozotocina induce diabetes mellitus con hiperglicemia sostenida en el tiempo y manifestaciones clínicas e histológicas de nefropatía diabética. La micro-albuminuria es un marcador de enfermedad en este modelo experimental y puede aparecer precozmente una vez inducida la diabetes.

2.4 Estudio

Prospectivo, secuencial de análisis de orina y sangre por métodos bioquímicos en ratas probadamente diabéticas. Evaluación de cambios histológicos renales por microscopía óptica y electrónica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico:

Se utilizaron 30 ratas macho cepa Sprague Dawley, con un peso entre 280-350 grs., procedentes del bioterio del Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Las ratas se mantuvieron en jaulas colectivas, en condiciones estandarizadas de luz, temperatura y humedad, durante un periodo de 8 meses, separándose en jaulas metabólicas en los periodos establecidos para la toma de muestras.

3.1.2 Material Farmacológico:

- Estreptozotocina (Laboratorio Sigma)
- Buffer citrato 0,05 M, pH 4
- Éter (Laboratorio MERCK)
- EDTA 0,3 M

3.1.3 Otros materiales:

- Jaulas metabólicas
- Tiras reactivas Human Test combina 10 (Laboratorio Human)
- Balanza
- Glucosa PAP liquiform (Laboratorio Labtest)
- Albúmina humana
- Material de laboratorio
- Material para cortes histológicos

3.2 Métodos

Con el fin de establecer los valores basales de todos los animales en estudio, previo a la inducción de diabetes, se sometieron a un control de valores sanguíneos correspondientes a glicemia y urinarios tales como creatinina, glucosa, diuresis, proteína, electrolitos y albúmina, para determinar si se encontraban dentro de los rangos de referencia para la especie lo cual se cumplió.

Las ratas fueron mantenidas por ocho meses para estudiar las variaciones en sus parámetros bioquímicos.

3.2.1 Inducción de diabetes:

Las ratas fueron inyectadas vía IV (vena coccígea) con 50 mg/Kg de STZ, disuelta en buffer citrato pH= 4 al 0,05 M (1 ml/Kg de peso vivo) (adaptado del protocolo de Degenhardt y col., 2002 y Shenoy y Goyal, 2002). Para inyectarlas las ratas fueron previamente anestesiadas con éter y la cola fue sometida a calor para lograr la dilatación venosa.

Transcurridas 48 horas post-administración de STZ, se determinó glucosuria a través de tiras reactivas y los animales que la presentaron fueron separados y evaluados 24 horas después determinando los valores de glicemia. Las ratas con valores sanguíneos de glucosa sobre 140 mg/dl se usaron para el presente estudio.

3.2.2 Recolección de muestras:

Sanguíneas: Las muestras se extrajeron mensualmente, previo ayuno de 24 horas con un corte en la punta de la cola, la sangre se recolectó en tubos Eppendorf que contenían EDTA 0.3 M como anticoagulante.

Urinarias: Se recolectó orina de 24 horas, mensualmente según la sobrevivencia de los animales, para control de proteínas, creatinina, electrolitos, diuresis y albúmina, en cajas

metabólicas individuales, período durante el cual los animales recibieron hidratación ad libitum, pero no la alimentación, para reducir la contaminación fecal de las muestras.

3.2.3 Determinación de los niveles de glicemia:

La sangre extraída fue centrifugada a 5.500xg por cinco minutos para obtener el suero, el cual fue analizado con el test Glucosa PAP liquiform. Este se basa en que la glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de la glucosa transformándola en Ácido Glucónico y peróxido de hidrógeno, en donde este peróxido reacciona con 4-amino antipirina y fenol bajo la acción catalizadora de la peroxidasa, a través de una reacción oxidativa de ligazón, formando una antipirilquinonimina roja cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

Se utilizan como mínimo 3 tubos; uno se marca como blanco, otro como patrón y el último como muestra. Al tubo blanco se le agrega 1 mL de reactivo 1 (que trae el test), el tubo patrón lleva 1 mL de reactivo 1 y 10 µL de reactivo patrón (glucosa 100 mg/dL) y finalmente al tubo muestra 1 mL de reactivo 1 y 10 µL de suero.

Estos tubos se mezclan vigorosamente y se colocan en un baño maría a 37°C durante 15 minutos. Se determina la absorbancia a 505 nm llevando a cero con el blanco y se aplica finalmente la siguiente fórmula para la determinación de la concentración de glucosa en la muestra de sangre:

$$\text{Glucosa (mg/dL)} = \frac{\text{absorbancia muestra} \times 100}{\text{Absorbancia patrón}}$$

3.2.4 Determinación de los niveles de albúmina urinaria:

Para la determinación de micro-albuminuria se utilizó el método del azul de bromofenol que se basa en una reacción colorimétrica entre la albúmina y el compuesto anteriormente mencionado.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

Usando agua se lleva a cero el espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm, entonces se lee la absorbancia de la solución de trabajo de azul de bromo fenol (A_b). Se pipetea 3 mL de azul de bromo fenol a cada tubo y se le agrega 100 μ L de estándar de albúmina humana 0.5 g/L o de muestra de orina, según corresponda, se mezclan y a los 30 segundos se miden en el espectrofotómetro (A_s y A_u , para el estándar y la muestra de orina respectivamente). Para muestras muy turbias o altamente coloreadas se preparan otros tubos con 3 mL de buffer glicina a pH 3.0 y 100 μ L de la muestra de orina y se lee la absorbancia de la misma manera (A_{ub}).

Luego para encontrar la concentración de albúmina contenida en la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Albúmina (g/L)} = [A_u - (A_b + A_{ub})] \times 0.5 / (A_s - A_b)$$

Donde 0.5 es la concentración de la solución estándar de albúmina humana en gramos por litro

Esta reacción es lineal hasta una concentración de albúmina de 6 g/L.

3.2.5 Sacrificios y fijación del tejido renal:

Algunos animales fueron sacrificados en periodos establecidos de tiempo (4, 6 y 8 meses desde la inducción de la diabetes) para verificar a nivel histológico renal si las alteraciones urinarias encontradas presentaban una correlación morfológica en los estudios histopatológicos.

3.2.6 Técnicas de análisis del tejido renal:

Riñones de ratas diabéticas sacrificadas a los 4, 6 y 8 meses y de ratas normales, fueron analizados a nivel de microscopía óptica y electrónica utilizando un individuo por cada estadio temporal de la diabetes.

Microscopía óptica:

Los riñones fueron fijados en formalina al 4% en buffer fosfato salino (PBS), deshidratados en etanoles de graduación creciente, aclarados en xiloles e incluidos en parafina. Se realizaron secciones de 4µm las que fueron teñidas con hematoxilina- eosina y observadas en un microscopio, obteniéndose microfotografías a un aumento 200x.

Microscopía Electrónica:

El tejido renal fue fijado por inmersión en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato (pH 7,3) y pos-fijadas con tetróxido de osmio al 1%. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en acetonas de graduación creciente y embebidas en Epon-araldita. Las secciones finas fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo siendo observadas en un microscopio Philips EM200.

El espesor de las membranas basales glomerulares (MBG) fue determinado midiendo la distancia existente entre el límite mas externo de la células endoteliales glomerulares y la base de un pedicelo. Las mediciones fueron realizadas en asas capilares periféricas obteniéndose seis medidas por cada asa capilar analizadas (total de tres asas por cada animal analizado). Las microfotografías electrónicas fueron analizadas a una magnificación de 6430x.

A los fines de obtener el espesor de las MBG se utilizó la siguiente fórmula (Foster 2005)

$$\text{Espesor MBG} = \frac{\text{Espesor de MBG medido en fotografía}}{\text{Magnificación} \times \text{Ampliación fotográfica}}$$

3.2.7 Análisis estadístico de los datos:

Los datos fueron analizados por el Test de Wilcoxon matched-pairs y el Test de Mann-Whitney utilizando el software comercial Graphpad 3.0 1998, San Diego California, USA.

Se utilizó nivel de $p < 0.05$ como significativo

4. RESULTADOS

Se presentan los valores obtenidos de glicemia y albuminuria como resultado del análisis de las muestras de sangre y orina respectivamente.

Glicemia:

Gráfico N° 1: Evolución glicemias en el tiempo

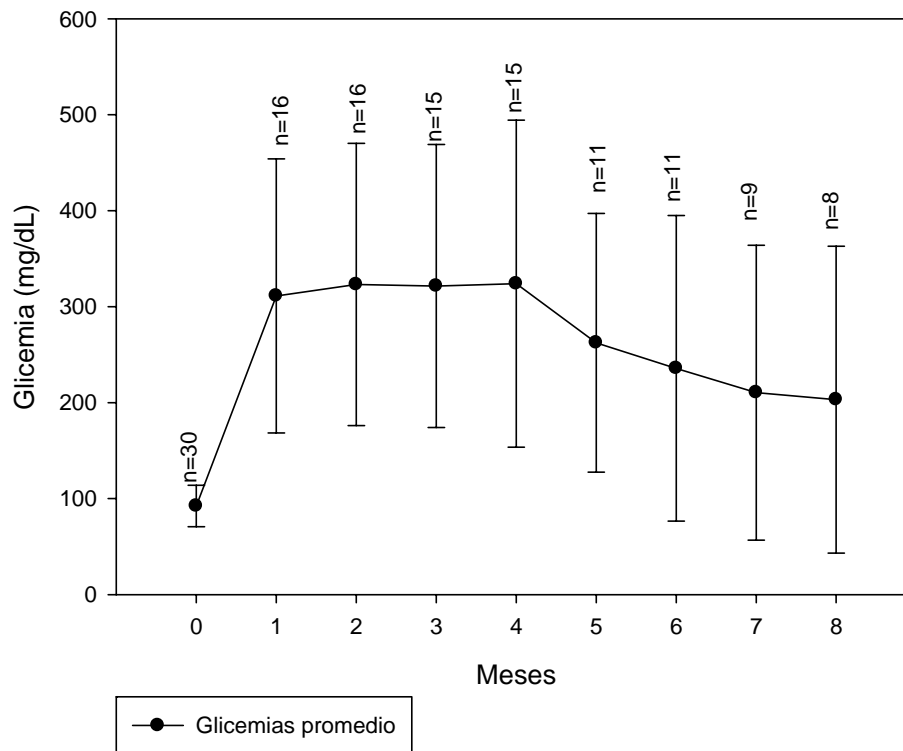


Gráfico N°1: Evolución de las glicemias de las ratas con sus respectivas desviaciones estándar en los diferentes meses de recolección de muestras.

Se pudo observar que los valores de glicemia pueden tener una amplia variabilidad por lo que se clasificaron en tres grupos distintos de acuerdo al nivel de hiperglicemia alcanzado durante el estudio. Los grupos fueron establecidos con hiperglicemia leve (sobre 140 y hasta 290 mg/dL), moderada (entre 291 y hasta 450 mg/dL) y severa (entre 451 y 622 mg/dL).

Gráfico N° 2: Hiperglicemias leves

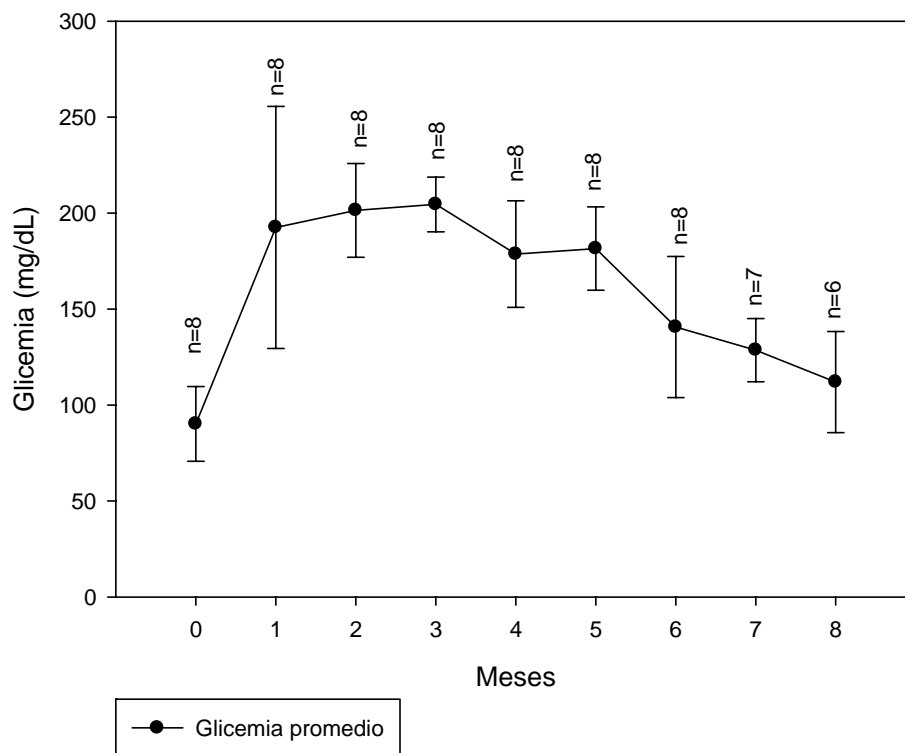


Gráfico N°2: Evolución de glicemias de las ratas pertenecientes al grupo hiperglicémico leve con sus respectivas desviaciones estándar.

Gráfico N° 3: Hiperglicemias moderadas

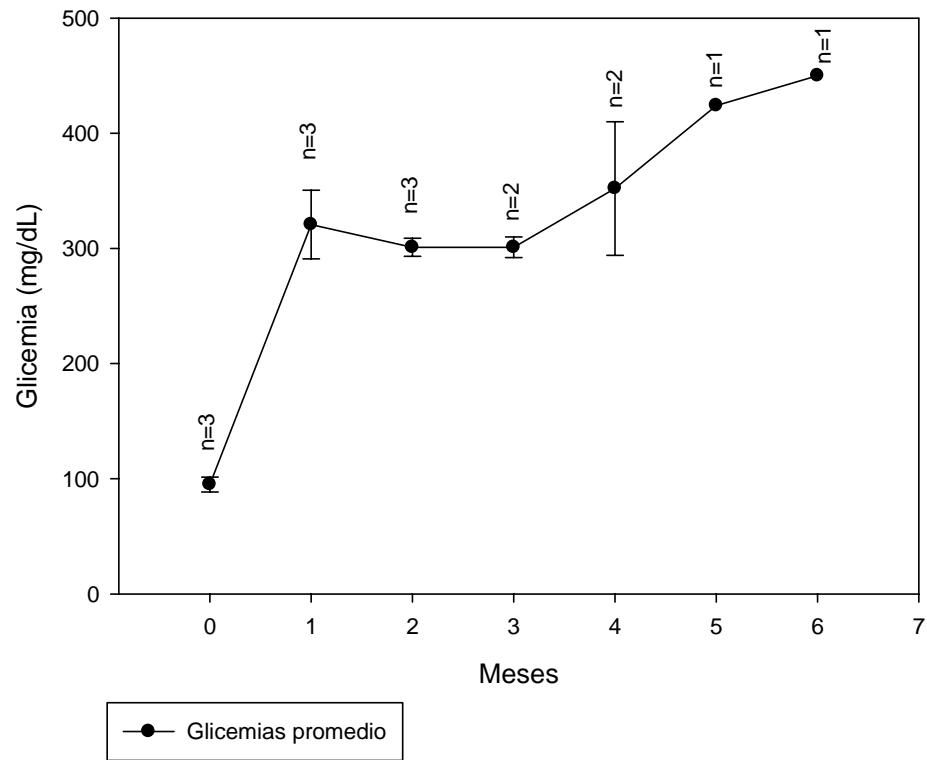


Gráfico N°3: Evolución de glicemias de las ratas pertenecientes al grupo hiperglicémico moderado con sus respectivas desviaciones estándar.

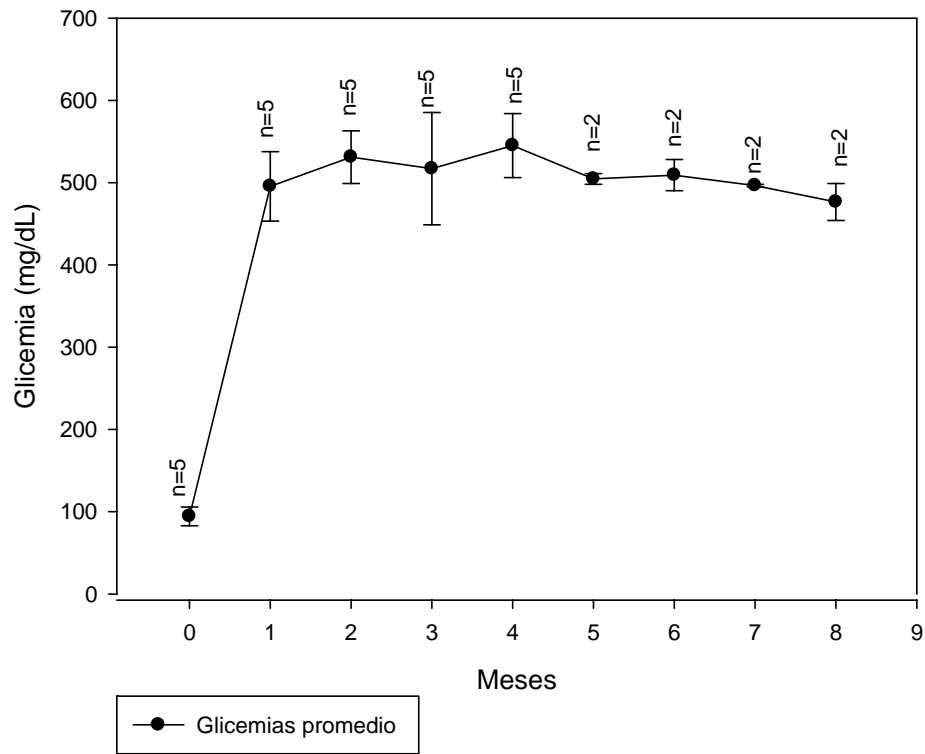
Gráfico N° 4: Hiperglicemias severas

Gráfico N°4: Evolución de glicemias de las ratas pertenecientes al grupo hiperglicémico severo con sus respectivas desviaciones estándar.

Gráfico N° 5: Evolución Albuminuria en todo el estudio

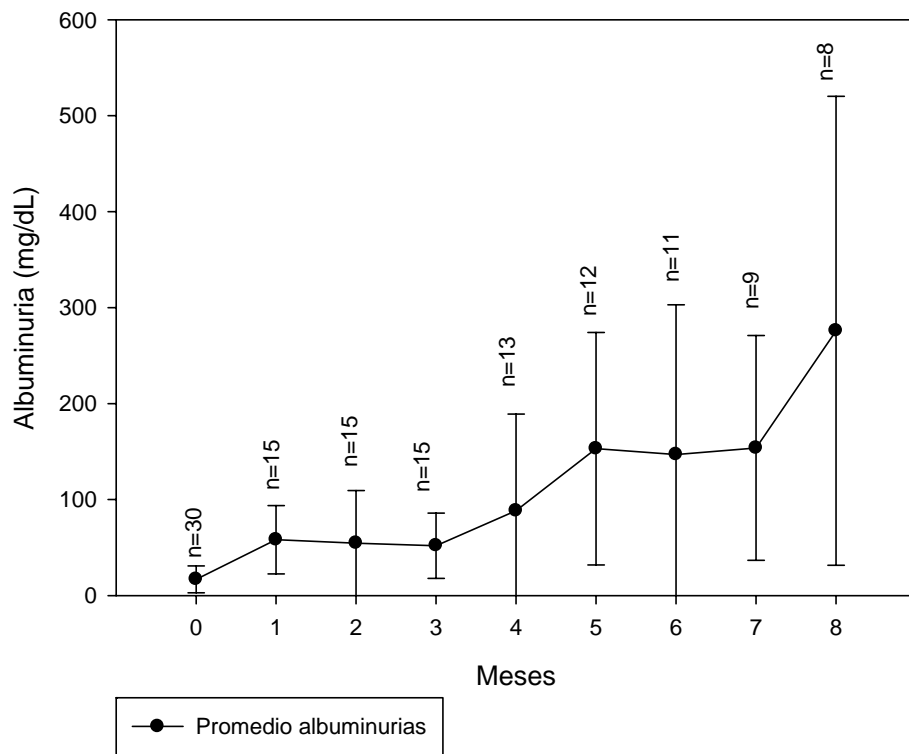


Gráfico N°5: Evolución de las albuminurias de las ratas con sus respectivas desviaciones estándar en los diferentes meses de recolección de muestras.

Gráfico N° 6.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia leve

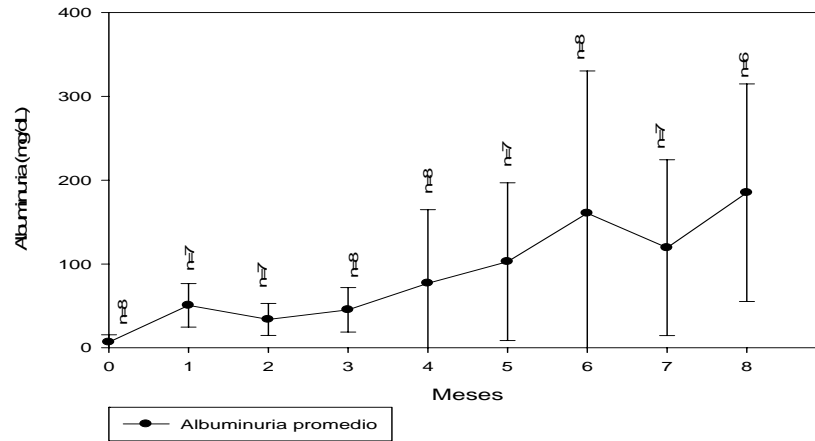


Gráfico N° 6.2: Albuminuria/ creatinuria ratas con hiperglicemia leve

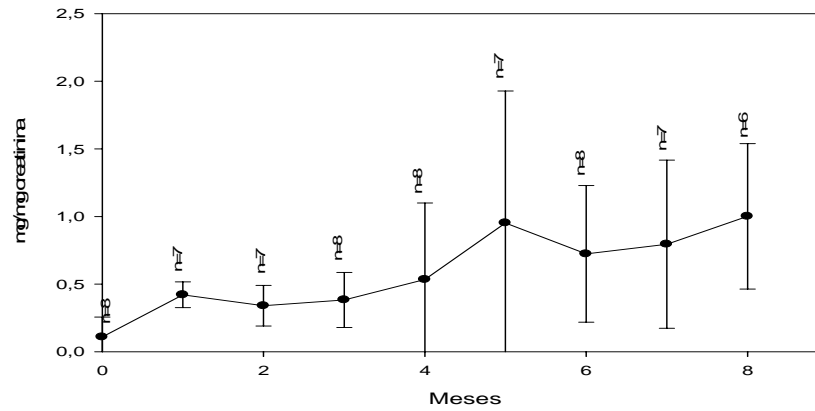
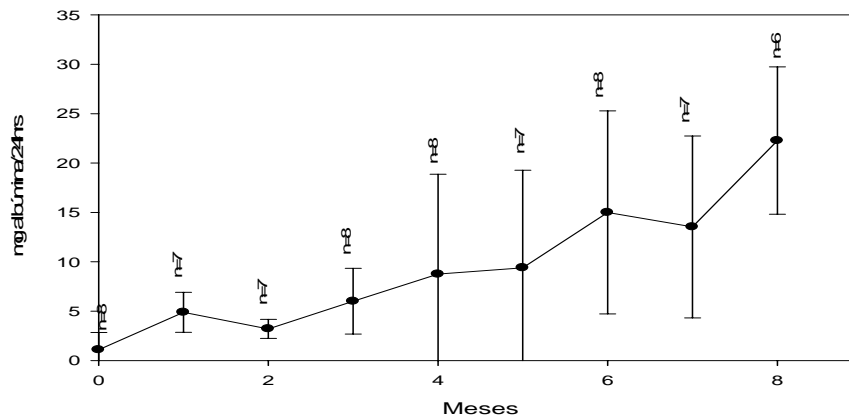


Gráfico N° 6.3: Albúmina /24 hrs ratas con hiperglicemia leve



Gráficos 6.1, 6.2 y 6.3: Comparación entre las diferentes formas de expresión de la albuminuria con sus respectivas desviaciones estándar en el grupo de ratas con hiperglicemia leve

Gráfico N° 7.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia moderada

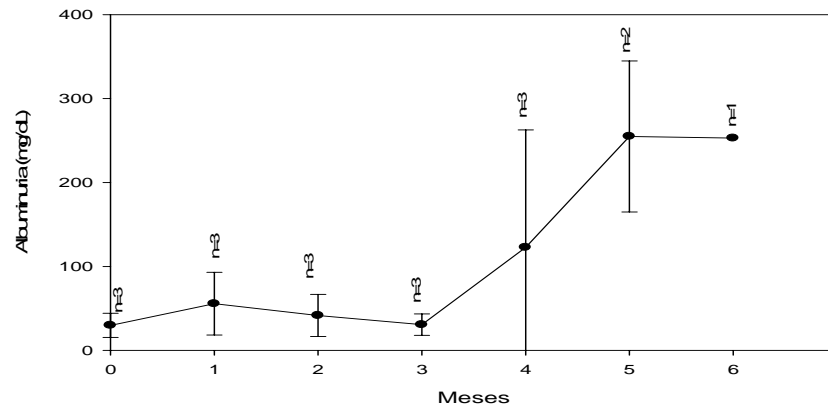


Gráfico N° 7.1: Albuminuria/Creatinuria ratas con hiperglicemia moderada

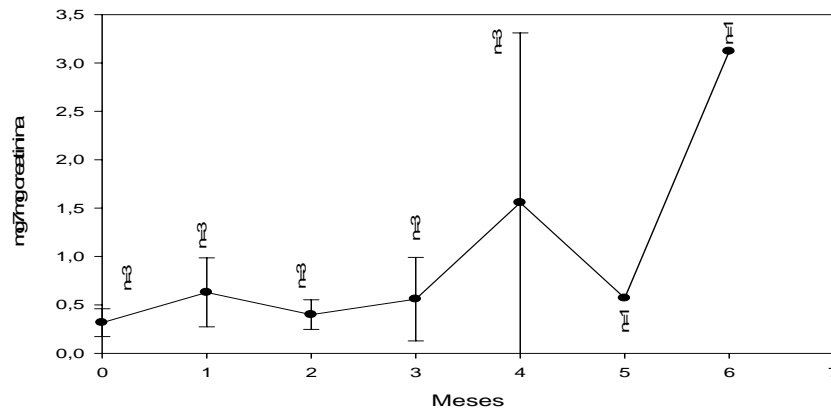
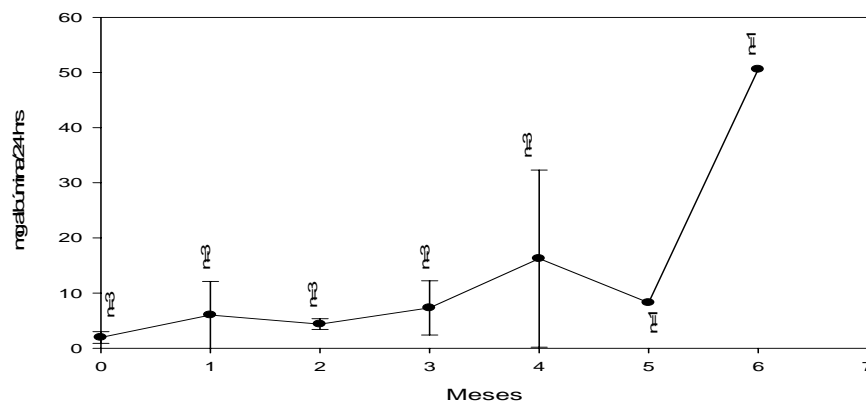


Gráfico N° 7.3: Albuminuria/24 hrs ratas con hiperglicemia moderada



Gráficos 7.1, 7.2 y 7.3: Comparación entre las diferentes formas de expresión de la albuminuria con sus respectivas desviaciones estándar en el grupo de ratas con hiperglicemia moderada.

Gráfico N° 8.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia severa

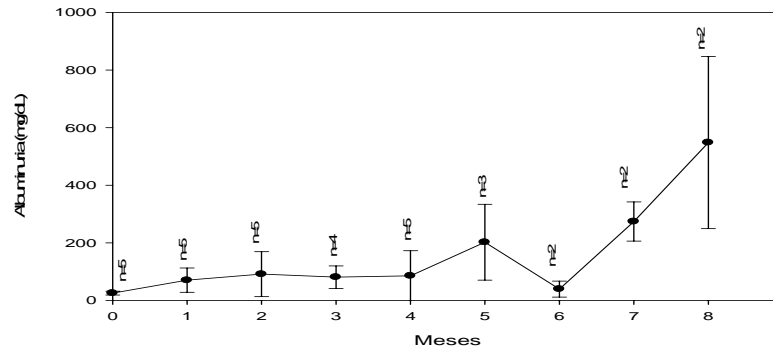


Gráfico 8.2: Albuminuria/Creatinuria ratas hiperglicemia severa

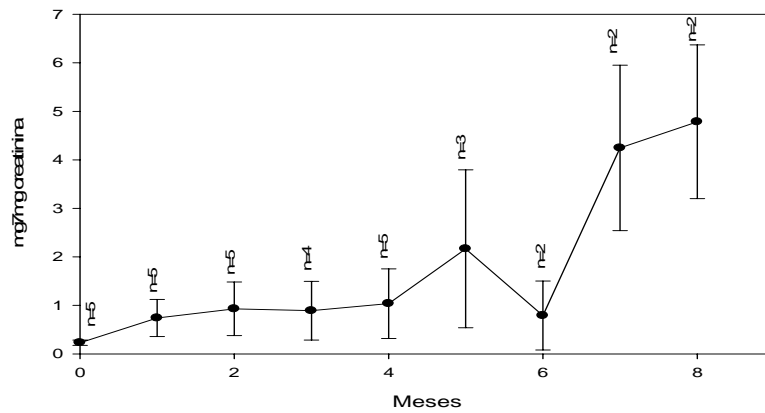
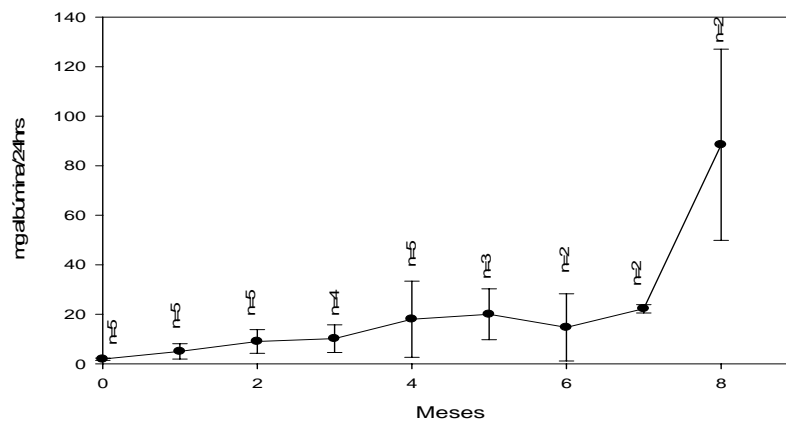


Gráfico N° 8.3: Albuminuria/24 hrs ratas con hiperglicemia severa



Gráficos 8.1, 8.2 y 8.3: Comparación entre las diferentes formas de expresión de la albuminuria con sus respectivas desviaciones estándar en el grupo de ratas con hiperglicemia severa.

Microscopía óptica

El análisis morfológico de los riñones de ratas diabéticas a los 4, 6 y 8 meses a nivel glomerular no exhibió alteraciones de significación comparadas con los grupos controles (Figura 1a-b). A nivel túbulo-intersticial los animales diabéticos mostraron leve infiltrado mononuclear focal y a los 8 meses de inducida la diabetes se observaron cilindros hialinos intratubulares.

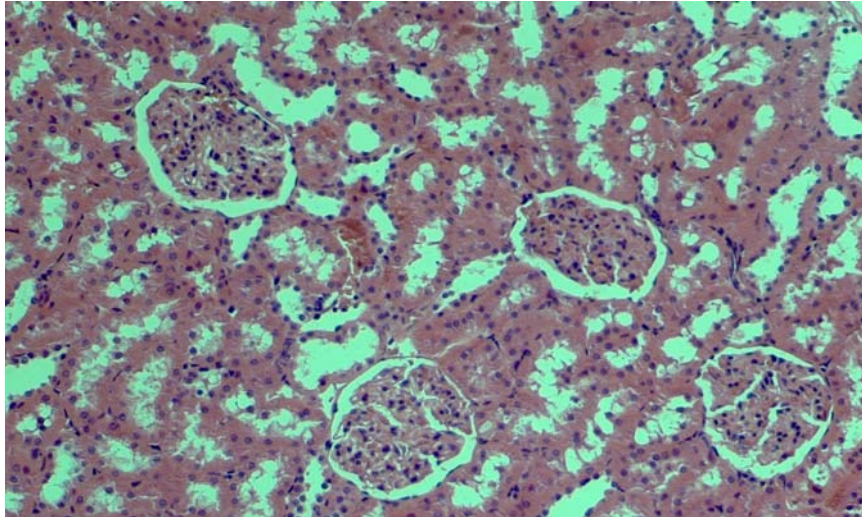


Figura 1a

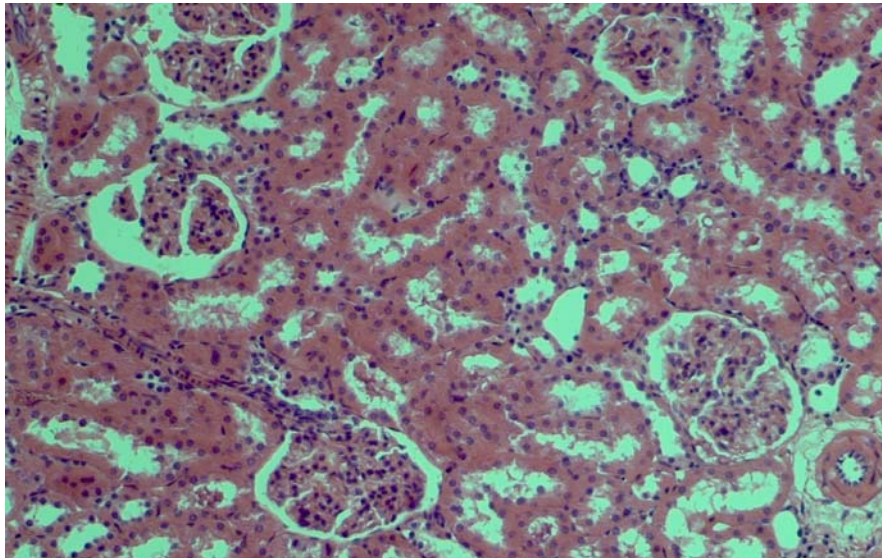


Figura 1b

Figura 1 a-b: Microscopia óptica de rata control (a) y diabética durante 2 meses. A nivel glomerular no se detectan cambios morfológicos significativos entre ambos grupos. 200x

Microscopía Electrónica

En los modelos de diabetes inducida por STZ hubo un incremento moderado pero significativo ($p=0,0008$) del espesor del las MBG comparadas con el grupo control (Tabla 1 anexo 4) (Figura 2a-b-c).

Un animal diabético exhibió zonas de fusión pedicular focal (Figura 3).

En las ratas diabéticas no se evidenciaron modificaciones a nivel mesangial respecto a los no tratados (normales).

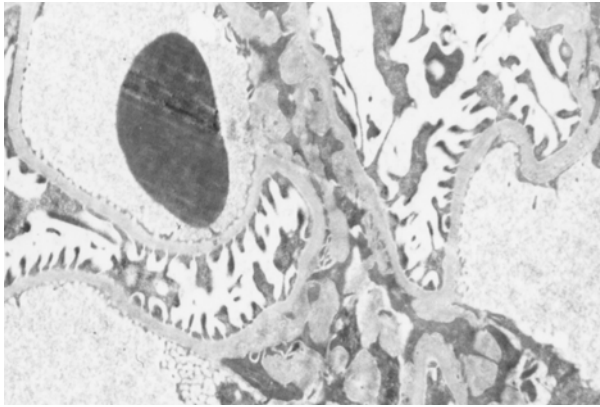


Figura 2a

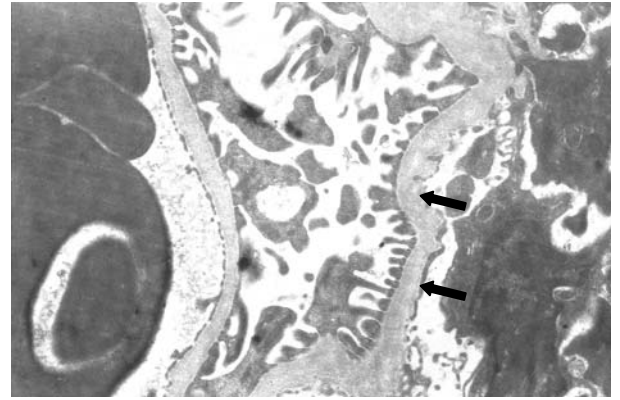


Figura 2b

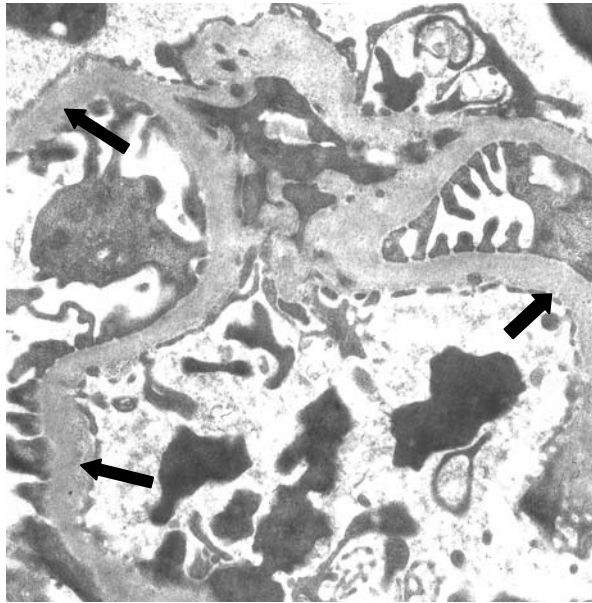


Figura 2c

Figura 2- Marcado engrosamiento en forma segmentaría (b) o difusa (c) de las MBG (flechas), en rata diabética de cinco meses en comparación con un animal control (a). 6430x.

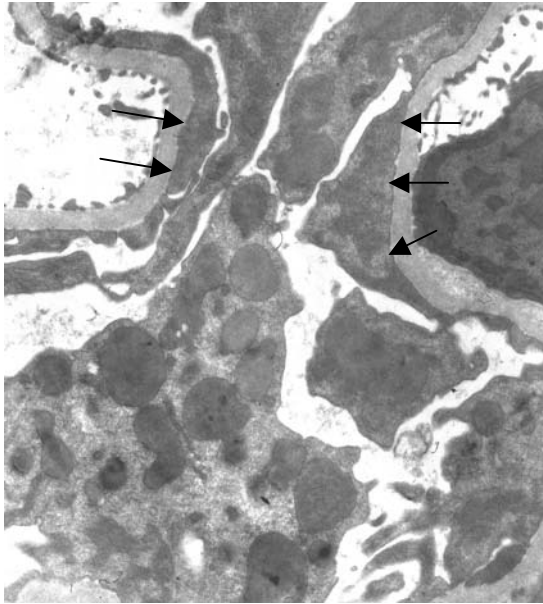


Figura 3

Figura 3- Microfotografía electrónica de riñón de rata diabética (6 meses) que muestra extensa fusión pedicelar (flechas) y engrosamiento de MBG. 6430x

5. DISCUSIÓN

Esta tesis permitió montar un modelo de diabetes mellitus experimental evidenciada por hiperglicemia persistente la cual se asoció a un daño renal evidenciado por albuminuria persistente y alteraciones morfológicas a nivel ultra estructural como son engrosamiento de la MBG, fusión pedicular segmentaria y acumulo de glicógeno en túbulo distal que corresponden a las alteraciones observadas en la nefropatía diabética humana en sus fases iniciales.

El modelo consiste en la administración endovenosa de una dosis de estreptozotocina de hasta 60 mg/Kg. para generar diabetes mellitus en ratas normales y es capaz de inducir una hiperglicemia sostenida que no requiere el uso de insulina para mantener la enfermedad por un periodo de ocho meses. Realizamos controles basales para comprobar que se encontraran dentro de los rangos establecidos para la especie según Kaneko (1997) y Zanoello y col. (2002), que indican un rango entre 47,7 y 107 mg/dL (49,2-107 mg/dL); existen otros rangos considerados como normales por varios autores, entre ellos: Nachar (1994), indica un rango de 119,15 a 122,05 mg/dL; Saso y col. (2000), niveles de aproximadamente 120 mg/dL; Shenoy y Goyal (2002), valores promedio de 143,6; Kędziora-Kornatowska y col. (2003), un rango entre 114,0 y 116,7 mg/dL; Pepato y col. (2003), valores desde 135 a 139 mg/dL. Esta diferencia de los niveles basales de glicemia sería atribuible a las diferentes condiciones de manejo de los animales, específicamente la alimentación, ya que no existe una estandarización de los componentes de la dieta en estudios de glicemia en ratas.

La mortalidad post administración de STZ (dosis utilizada 50 mg/Kg) correspondió a un 46% (14 ratas de las 30 inyectadas murieron antes de cumplir un mes diabéticas); lamentablemente en la literatura revisada se omite el porcentaje de mortalidad de este modelo. Al respecto, vale la pena mencionar que en esta misma Universidad se realizó un estudio previo por

parte del Instituto de Farmacología Veterinaria hace unos años atrás donde se observó que la mortalidad era alrededor del 50% con una dosis similar a la utilizada por nosotros.(Dato no publicado).

A las 48 hrs. post-administración de STZ apareció glucosuria en todas las ratas inyectadas y fue este el parámetro usado como confirmación del estado diabético en concordancia con otros autores (Boros y col., 1998; Bardoux y col., 1999; Lee y Kim, 2000). Shenoy y Goyal (2002) y Akhani y col. (2004), quienes aplicaron STZ a igual dosis y vía de administración que este estudio, obteniendo niveles de glucosuria mayores a 2 g/dL.

A las 72 hrs. post-administración de STZ, pudimos confirmar un alza de los valores de glicemia a un rango de 173 a 500mg/dL que corresponden a un aumento entre un 40 a un 400% en comparación a sus basales. Esto coincide con Lemus y col. (1999), que indican alzas hasta 510,42 mg/dL en el mismo período de tiempo posterior a la administración de STZ, es decir, prácticamente de un 400%. La mantención de la hiperglicemia corrobora la acción de la STZ como inductor de diabetes. Previo a la realización de esta tesis se realizó una estandarización de la dosis de STZ entre 45 a 60 mg/Kg por el Instituto de Farmacología Veterinaria. Nosotros elegimos una dosis de 50 mg/Kg por corresponder a la mínima dosis que producía diabetes en la mayor cantidad de los animales con una mortalidad más baja. La importancia de estandarizar la dosis de STZ radica en que se valida el método para usarlo en futuras investigaciones, siguiendo el mismo protocolo experimental, ya que según Soares y col. (2000) la respuesta hiperglicémica a las distintas drogas diabetogénicas es extremadamente variable. Esta variación es atribuida, entre otros, a las diferentes cepas de ratas utilizadas en los protocolos o a las distintas partidas de inductores químicos de diabetes, ya que una misma dosis utilizada en distintos estudios produce resultados diferentes en términos de glicemia.

En el gráfico 1 es posible observar que la distribución de los valores de hiperglicemia es bastante dispersa por lo que se consideró necesario dividir las ratas en distintos grupos según la magnitud de la hiperglicemia (leve, moderada y severa) como puede observarse en los gráficos 2, 3 y 4. Las variaciones en las hiperglicemias observadas pueden atribuirse a diferencias en la técnica de inyección ya que la STZ se descompone rápidamente al ser reconstituida y su administración endovenosa es difícil pudiendo existir extravasación con pérdida de parte de la dosis.

En el análisis estadístico de los datos de las hiperglicemias leves también se encontró que a los 6 meses post inyección, las ratas tendían a normalizar sus valores de glicemias. Esta normalización podría explicarse porque la STZ no destruyó todos los islotes del páncreas haciendo posible una proliferación y recuperación de un número adecuado de islotes funcionantes; en relación con esto es destacable que esta normalización sólo ocurrió en el grupo de hiperglicemia leve.

La micro-albuminuria se evaluó bajo tres diferentes formas de expresión: concentración en mg/dL, excreción diaria (mg/24 hrs.) y corregido por la creatinuria (mg /mg creatinina). Los valores máximos normales fueron obtenidos con el promedio de los valores basales de las ratas antes de la inyección más dos desviaciones estándar resultando 45 mg/dL en el caso de concentración, 4,4 mg/24 horas y 0,48 mg/mg creatinina.

Al mes de inducida la diabetes 9 de las 16 ratas presentaban una concentración de micro-albuminuria sobre lo normal establecido. A los tres meses 3 ratas de las siete que no habían desarrollado micro-albuminuria la presentan en rangos de 46,96 mg/dL – 85,35 mg/dL. Al quinto mes una última rata comienza a presentar micro-albuminuria con un valor de 165 mg/dL.

Dos ratas no desarrollaron micro-albuminuria en ningún momento del estudio una correspondía al grupo de ratas con hiperglicemia leve y la otra al de hiperglicemia severa.

Al analizar la micro-albuminuria en mg de albúmina/24 horas los resultados encontrados fueron los siguientes:

Todas las ratas desarrollan micro-albuminuria, 7 al primer mes (5,7 – 14,6 mg/día); tres ratas al segundo mes (5,727 – 11,666 mg/día); tres ratas al tercer mes (4,7 – 11,7 mg/día); dos al cuarto (4,7 – 5,2 mg/día) y, una rata al quinto mes con un valor de 8,3 mg/día.

Utilizando valores corregidos por excreción de creatinina se encontraron los siguientes resultados:

Ocho animales la presentaron al primer mes con valores que fluctuaban entre 0,49 – 1,02; una rata al segundo mes con un valor de 0,84; dos animales al tercer mes con 0,67 y 0,68; dos al quinto mes con valores de 0,57 y 2,67 y una última rata al séptimo mes con un valor de 0,6 mg albúmina/mg creatinina. Con este modelo de análisis, hubo dos ratas que nunca llegaron a presentar micro-albuminuria, ambas correspondían al grupo de ratas con hiperglicemia leve.

Para la presente tesis se utilizaron estos últimos valores ya existe acuerdo en que la selección puede realizarse más fidedignamente determinando la relación albúmina / creatinina en una muestra aislada de orina. Cuando los resultados se expresan en relación con la creatinina se obvian los posibles problemas inducidos por las variaciones en la concentración y recolección urinaria a diferencia de lo que ocurre con los dos métodos anteriormente nombrados, aunque según los resultados obtenidos es posible observar que el modelo de excreción diaria (mg albúmina/24 horas) parece ser más sensible.

Se estudió el comportamiento de la albuminuria con respecto a los tres grupos de hiperglicemia sin demostrar correlación alguna entre niveles de hiperglicemia y excreción de albúmina.

La detección de una cantidad anormal de albúmina en la orina es un indicador fiable de alteración renal inicial, y es utilizado como buen indicador de riesgo de nefropatía diabética clínica en el ser humano (Schumann y Schweitzer, 1993; Burne y col., 1998).

El aumento significativo y persistente en la albuminuria por parte de las ratas diabéticas podría explicarse por un aumento en la tasa de filtración glomerular, antesala del estado de nefropatía diabética clínica (Esmatjes, 2001) o por un aumento en la permeabilidad de la membrana a esta proteína como un hecho característico de la diabetes mellitus.

La micro-albuminuria se puede definir como la excreción de albúmina superior a los límites normales pero que aún no es detectable en un examen común de la orina. El concepto de micro-albuminuria como marcador de enfermedad renal incipiente fue introducido ya en los primeros años de la década de los años 80. La fase de micro-albuminuria se relaciona con el inicio de las anomalías morfológicas o estructurales de los riñones en la diabetes.

Aproximadamente entre el 5-10% de los individuos sin diabetes tiene micro-albuminuria positiva. Aunque diversos estudios han indicado que la micro albuminuria puede ser un predictor de la mortalidad cardiovascular, no se puede sin embargo concluir si por ella misma es un predictor o es su asociación con otros factores de riesgo conocidos como la hipertensión arterial, disminución del colesterol HDL que puede asociarse a aumento del riesgo cardiovascular, etc.. De otro lado, se ha sugerido por el grupo de Steno en Dinamarca y otros que en realidad la micro albuminuria sería la manifestación de una disfunción endotelial generalizada reflejándose no sólo

a nivel del glomérulo, sino en retina, grandes vasos arteriales, etc., condicionada genéticamente pudiendo ser el nexo de unión entre micro-albuminuria y enfermedad cardiovascular.

Para que se desarrolle micro-albuminuria en el ser humano existen varios factores condicionantes, tales como el mal control glicémico, muy especialmente aquellos individuos quienes presentan un nivel de hemoglobina glicosilada A1c superior al 8 %. En el grupo de población hipertensa la micro-albuminuria se puede ver entre el 20-40%, de igual manera que en fumadores, aquellos con antecedentes familiares de hipertensión arterial, pacientes con insulinoresistencia y quienes presentan elevada concentración en el colesterol LDL sin ser signo único de la nefropatía diabética.

Existen varios métodos para medir la albúmina entre los que se incluyen radioinmunoensayo, enzimo-inmunoensayo, nefelometría, inmunodifusión radial e inmunoturbidometría. Estos métodos se automatizan fácilmente y permiten procesar gran número de muestras en poco tiempo, pero el problema que tienen es su alto costo, su difícil disponibilidad y accesibilidad. Las tiras y pastillas para detectar micro-albuminuria dan un resultado rápido pero semicuantitativo y pueden inducir a error por variaciones en la concentración urinaria y todos los resultados positivos deberán ser confirmados por otros métodos más específicos. Por lo anterior descrito es que el método montado para análisis de micro-albuminuria es conveniente, ya que su costo no es elevado y los resultados encontrados son fiables de acuerdo a la comparación preliminar con un método en uso en el Instituto de Bioquímica.

En la microscopia óptica no se encontró alteraciones significativas en la arquitectura tisular renal tanto a nivel glomerular como a nivel tubulointersticial. Los hallazgos de significación los encontramos en la microscopia electrónica donde se observó engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares en comparación con ratas normales. Para

obtener un valor normal límite de grosor de la MBG se consideró tomando el promedio más dos desviaciones estándar de riñones de ratas normales resultando en 251 nm. Esta alteración puede ser la única lesión detectable en las fases precoces o preclínicas de la glomerulopatía diabética en seres humanos. Los valores encontrados en ratas diabéticas de 4 y 6 meses fueron 300,33 nm y 339,67 nm respectivamente. También fue posible observar fusión pedicelar que, al igual que la lesión anterior aparece en la nefropatía diabética producto de la hiperfiltración a la que son sometidos los riñones en la diabetes humana (Somlo S y Mundel P, 2000).

Pese a que no dispusimos de muestras de tejido renal analizado por microscopia electrónica previo a los cuatro meses de evolución de la diabetes, la precoz aparición de la microalbuminuria sugiere su valor predictivo de las alteraciones histológicas

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En base a los resultados obtenidos y discutidos en el presente estudio, se concluye:

La administración IV de STZ en dosis única de 50 mg/Kg de peso vivo en ratas Sprague-Dawley adultas procedentes del bioterio de Histología de la Universidad Austral de Chile, es efectiva en la inducción de DM. El modelo montado es fácilmente reproducible con un porcentaje de éxito de un 100% en la producción de diabetes y permite su uso en futuros estudios relacionados con esta enfermedad, sus alteraciones histológicas, metabólicas o de comportamiento asociadas.

La aparición de micro-albuminuria al mes de inducida la diabetes hace de ésta un posible marcador precoz y no invasivo de las alteraciones histopatológicas específicas de nefropatía que refleja una alteración en la barrera de filtración glomerular y nos podría permitir su uso para evaluar la utilidad de ciertas drogas en el tratamiento de la nefropatía asociada a la diabetes. Por otra parte, su potencial valor predictivo de las alteraciones histológicas asociadas a la enfermedad, podría permitir utilizarlo como marcador de eventuales cambios, equivalentes a lo que ocurre en la enfermedad humana, en su evolución natural o modificada por terapias o factores agravantes.

7. BIBLIOGRAFIA

- AL-ACHI, A., R. GREENWOOD. 2001. A Brief report on some physiological parameters of streptozotocin-diabetic rat. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27: 465-468.
- ANAVEKAR N, GANS D, BERL T, ROHDE R, COOPER W, BHAUMIK A, HUNSICKER L, ROULEAU J, LEWIS J, ROSENDORFF C, PORUSH J, DRURY P, ESMATJES E, RAZ I, VANHILLE P, LOCATELLI F, GOLDHABER S, LEWIS E, PFEFFER M. 2004. Predictors of cardiovascular events in patients with type 2 diabetic nephropathy and hypertension: A case for albuminuria. *Kidney International.* 66: S50-S55.
- BECKER J, 2004. Which albumin we measure?. *Kidney International.*66: S16-S17
- BIEKE F. SCHRIJVERS, AN S. DE VRIESE, ALLAN FLYVBJERG. 2004. From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines. *Endocrine reviews.* 25(6): 971-2010.
- BLOOMGARDEN Z. 2005. Diabetic nephropathy. *Diabetic cares.* 28: 745-751.
- BOLZAN, A., M. BIANCHI. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.* 512: 121-134.
- BURNE M, PANAGITOPOULOS S, JERUMS G. 1998. Alterations in renal degradation of albumin in early experimental diabetes in the rat: a new factor in the mechanism of albuminuria. *Clinical Science.* 95: 67-72.
- E.P.K. MENSAH-BROWN, E.N. OBINECHE, S. GALADARI, E. CHANDRANATH, A. SHAHIN, I. AHMED, S.M. PATEL, A. ADEM. 2005. Strptozotocin-induced diabetic nephropaty in rats: The role inflammatory cytokines. *Cytokine.*
www.elsevier.com/locate/issn/10434666.

- ESMATJES, E. 2001. Nefropatía Diabética en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- FIGUEROLA, D. 1997. Diabetes. 3ª ed., MASSON, Barcelona. España.
- FISCHER, J., C. TSCHOPE, A. REINECKE, C. GIACHELLI, T. UNGER. 1998. Upregulation of Osteopontin Expression in Renal Cortex of Streptozotocin Induced Diabetic Rats in Mediated by Bradykinin. *Diabetes*. 47: 1512-1518.
- FOSTER, D. 1998. Diabetes Mellitus en Harrison, Principios de Medicina Interna. 14ª ed, McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- GARCÍA, M. 1992. Generalidades en Diabetes Mellitus. 2ª ed., Arancibia Hermanos, Santiago. Chile.
- GROSS M, DIKOW R, RITZ E. 2005. Diabetic nephropaty: Recent insights into the pathophysiology and the progression of diabetic nephropaty. *Kidney international*. 67: S50-S53.
- HERRERA, J. 2001. Diabetes Mellitus en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- HISHAM A, IBRAHIM A, JITEN P. VORA 1999. Diabetic Nephropaty. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 13: 239-264.
- IGLESIAS-DE LA CRUZ M, CHEN S, ZIYADEH F, PANCORBO-ALONSO M. 2003. Patogénesis de la nefropatía diabética. *Ciencia al día internacional*. <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen5/numero1/articulos/articulo1.html>
- JUNOD A, LAMBERT A, STAUFFACHER W, RENOLD A. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 48 (11): 2129-2139.

- KALANTARINIA K, AWAD A, SIRAGY H. 2003. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior of the rise in albuminuria in diabetic rats. *Kidney International*. 64: 1208-1213.
- KONRAD, R., I. MIKOLAENKO, J. TOLAR, K. LIU, J. KUDLOW. 2001. The potential mechanism of the action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNac-selective N-acetyl-B-D-glucosaminidase. *Biochem. J*. 356: 31-41.
- LOBÓN, J., F. ESCOBAR. 2001. Macroangiopatía y diabetes en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- MEYER C, STUMVOLL M, NADKARNI V, DOSTOU J, MITRAKOU A, GERICH J. Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism. *J Clin Invest*. 102:619-24, 1998.
- PIZZORNO, J., M. MURRAY. 1995. Diabetes mellitus. *Diab. Me*. 6: 1-19.
- REDDI, A., R. CAMERINI-DAVALOS. 1990. Diabetic Nephropathy: An Update. *Arch. Intern. Med*. 150: 31-43.
- ROSE B, McCULLOCH D, BAKRIS G. 2006. Microalbuminuria and diabetic nephropathy. *UpToDate*. www.uptodate.com
- SCHENA F, GESUALDO L. 2005. Pathogenic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 16: S30-S33.
- SHEPERD G., CAM M. 1998. Streptozotocin-Induced Diabetes Enhances Cardiac Heparin-Releasable Lipoprotein Lipase Activity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 31: 878-884.
- SOMLO S, MUNDEL P. 2000. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nature Genetics*. 24: 333 – 335.

- SZKUDELSKI, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.
- THIBAUT, C., M.C. LAURY, D. BAILBE, A. KTORZA, B. PORTHA. 1992. Effect of prolonged in vivo glucose infusion on insulin secretion in rats with previous glucose intolerance. *Endocrinology.* 130: 2521-2527.
- TOMINO Y, TSUGE T, SUZUKI Y, GU L, TANIMOTO M, GOHDA T, HORIKOSHI S. 2005. Basic research in progressive glomerulopathies: The role of fibrosing factors in IgA nephropathy and diabetic nephropathy. *Kidney international.* 67: S92-S95.
- VALDIVIESO, A. 1992. Nefropatía Diabética. *Boletín Esc. de Medicina de Pontificia Universidad Católica de Chile.* 21: 42-44.
- WAYNE D, COMPER AND TANYA M. OSIKA. 2004. Albumin-like material in urine. *Kidney International.* 66: S65-S66.
- ZIYADEH F. 2004. Mediators of diabetic renal disease: The case of TGF- β as the major mediators. *J Am Soc Nephrol.* 15: S55-S57.

8. ANEXOS

Anexo N° 1: Tabla gráfico N° 1 Evolución de Glicemias en el tiempo

Ratas	Glicemias (mg/dL)								
	Meses								
	Basal	1	2	3	4	5	6	7	8
1	93	158	191	200	138	173	121	126	88
2	94	140	187	192	157	203	156	154	151
3	93	289	181	199	205	165	125	120	93
4	104	143	198	195	170	162	100	98	90
5	109	142	180	200	160	172	151	125	104
6	101	140	234	240	169	182	99	135	146
7	42	281	190	200	225	229	220		
8	85	247	250	210	205	166	153	142	
9	91	362	291	292	294	424	450		
10	104	293	302	310	410				
11	90	307	310						
12	113	452	475	476	587	498	490	495	499
13	100	459	565	622	554	511	528	498	454
14	88	546	549	455	498				
15	80	547	549	458	501				
16	90	473	517	574	585				
17	96								
18	63								
19	80								
20	49								
21	54								
22	77								
23	63								
24	120								
25	92								
26	108								
27	115								
28	120								
29	126								
30	128								
\bar{x}	92,3	311,2	323,1	321,5	323,9	262,3	235,7	210,3	203,1
σ	21,6	142,8	147,1	147,5	170,4	134,7	159,3	153,6	159,9
n	30	16	16	15	15	12	12	9	8

Anexo N° 2: Tabla Gráfico N° 2 Ratas con hiperglicemia leve

Glicemias (mg/dL)									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	93	158	191	200	138	173	121	126	88
2	94	137	187	192	157	203	156	154	151
3	93	289	181	199	205	165	125	120	93
4	104	143	198	195	170	162	100	98	90
5	109	142	180	200	160	172	151	125	104
6	101	140	234	240	169	182	99	135	146
7	42	281	190	200	225	229	220		
8	85	247	250	210	205	166	153	142	
σ	19,5	63,1	24,4	14,3	27,8	21,7	36,8	16,5	26,3

Tabla Gráfico N° 3 Ratas con hiperglicemia moderada

Glicemias (mg/dL)							
Ratas	Meses						
	0	1	2	3	4	5	6
1	91	362	291	292	294	424	450
2	104	293	302	310	410		
3	90	307	310				
σ	6,4	29,8	7,8	9	58	0	0

Tabla Gráfico N° 4 Ratas con hiperglicemia severa

Glicemias (mg/dL)									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	113	452	475	476	587	498	490	495	499
2	100	459	565	622	554	511	528	498	454
3	88	546	549	455	498				
4	80	547	549	458	501				
5	90	473	517	574	585				
σ	11,4	42,3	32,0	68,2	39	6,5	19	1,5	22,5

Anexo N° 3

Tabla Gráfico N° 6.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia leve

Albuminuria (mg/dL)									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	2,02	23,73	13,64	27,27	12,12	15,65	0	15,2	64,6
2	4,04	64,64	72,22	87,37	125,3	148,9	172	178	211
3	0	45,96	35,86	13,13	11,61	64,65	72,5	81,7	70,1
4	0	27,27	28,28	46,96	42,42	28,28	551,8	185,4	236,6
5	0,5	83,3	37,37	69,69	128,78		118,3	318,9	433,5
6	8,59	87,37	39,39	12,62	17,17	151,01	79,9	46,3	94,5
7	11,1			71,71	272,2	292,4	277		
8	27,27	22,22	9,6	33,84	6,57	18,9	13,4	10,4	
σ	8,7	25,9	19,1	26,5	87,7	94,1	169,6	104,6	133,8

Tabla Gráfico N° 7.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia moderada

Albuminuria (mg/dL)							
Ratas	Meses						
	0	1	2	3	4	5	6
1	30	104,3	76,8	16,7	23,9		252,9
2	12,12	48,98	27,27	47,47	320,7	344,9	
3	47,47	13,63	20,7	27,77	23,74	165	
σ	14,49	37,39	25,05	12,79	139,96	89,95	0

Tabla Gráfico N° 8.1: Albuminuria ratas con hiperglicemia severa

Albuminuria (mg/dL)									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	30,4	70,3	78,3	97,1	71,7	176,1	67,4	205,8	249,3
2	29,3	133	238,4		252,9	376,4		342	847,1
3	23,73	21,72	17,17	17,17	19,19				
4	12,63	27,77	35,35	85,35	69,19				
5	30,1	98,6	87,7	123,9	14,5	55,1	11,6		
σ	6,7	42,2	78,03	39,3	87,08	130,7	27,9	68,1	298,9

Tabla gráfico 6.2: Relación Albuminuria/Cretinuria ratas con hiperglicemia leve

mg/mg creatinuria									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,031	0,38	0,22	0,32	0,19	0,2	0	0,11	0,24
2	0,059	0,58	0,55	0,55	0,48	0,84	0,87	0,86	0,97
3	0	0,45	0,32	0,16	0,11	0,32	0,42	0,6	0,53
4	0	0,35	0,28	0,68	0,32	0,34	1,22	1,11	1,4
5	0,009	0,51	0,46	0,19	0,9		0,82	2,08	1,88
6	0,12	0,41	0,47	0,19	0,33	2,67	0,75	0,67	0,99
7	0,2			0,67	1,88	2,22	1,6		
8	0,46	0,27	0,085	0,31	0,066	0,08	0,11	0,14	
σ	0,15	0,095	0,15	0,20	0,56	0,98	0,50	0,62	0,53

Tabla gráfico N° 7.2: Relación albuminuria/creatinuria ratas con hiperglicemia moderada

mg/mg creatinuria							
Ratas	Meses						
	0	1	2	3	4	5	6
1	0,3430	1,02	0,43	0,26	0,47		3,12
2	0,13	0,71	0,57	1,17	4,03		
3	0,48	0,16	0,2	0,25	0,17	0,57	
σ	0,14	0,36	0,15	0,43	1,75	0	0

Tabla gráfico N° 8.2: Relación albuminuria/creatinuria ratas con hiperglicemia severa

mg/mg creatinuria									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,31	0,5	1,16	0,7	0,75	1,82	1,5	2,54	3,2
2	0,19	1,44	1,86		1,55	4,31		5,95	6,37
3	0,27	0,49	0,3	0,23	0,66				
4	0,16	0,41	0,84	1,88	2,13				
5	0,22	0,86	0,48	0,75	0,09	0,37	0,08		
σ	0,05	0,38	0,55	0,61	0,72	1,63	0,71	1,71	1,59

Tabla gráfico N° 6.3: Albuminuria/24 horas ratas con hiperglicemia leve

mg albúmina/24 hrs									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,202	5,695	2,728	5,454	3,636	3,208	0	3,04	16,796
2	0,404	7,11	3,611	8,737	7,518	11,168	17,2	19,58	23,21
3	0	6,894	3,227	1,444	2,09	3,233	9,063	6,536	12,618
4	0	2,182	3,676	11,74	2,121	6,222	22,072	20,392	28,392
5	0,06	6,248	4,858	3,485	16,098		17,745	28,701	34,68
6	0,773	4,369	2,954	3,155	4,722	9,061	15,98	13,89	17,955
7	1,887			9,322	32,724	32,164	34,625		
8	5,454	1,778	1,44	4,738	1,183	0,756	3,35	2,6	
σ	1,75	2,03	0,97	3,33	10,11	9,88	10,27	9,19	7,46

Tabla gráfico N° 7.3: Albuminuria/24 horas ratas con hiperglicemia moderada

mg albúmina/24 hrs							
Ratas	Meses						
	0	1	2	3	4	5	6
1	3	14,602	3,84	4,342	9,082		50,58
2	0,485	2,449	5,727	14,241	34,484		
3	2,324	1,022	3,519	3,332	1,187	8,25	
σ	1,06	6,09	0,97	4,92	16,05	0	0

Tabla gráfico N° 8.3: Albuminuria/24 horas ratas con hiperglicemia severa

mg albúmina/24 hrs									
Ratas	Meses								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	2,432	3,515	7,83	11,652	11,472	26,415	28,308	20,58	49,86
2	1,758	10,64	16,688		30,348	28,095		23,94	127,065
3	2,373	3,475	2,576	2,404	5,181				
4	1,137	1,666	11,666	17,924	41,514				
5	1,806	5,916	6,578	8,673	1,595	5,51	1,16		
σ	0,47	3,11	4,79	5,59	15,37	10,27	13,57	14,68	38,60

Anexo N° 4 Comparación entre MBG normal y ratas diabéticas

Parámetros	Membranas basales glomerulares de 5 ratas normales en 15 asas	Membrana basal glomerular rata diabética por 4 meses medida en 6 asas*	Membrana basal glomerular rata diabética por 6 meses medida en 6 asas *
Media	166,73 nm	300,33 nm	339,667 nm
Desviación estándar	37,617 nm	61,464 nm	69,425 nm

* El test de Mann-Withney demostró diferencia estadística significativa ($p= 0,0008$) entre los grupos analizados (ratas normales vs. ratas diabéticas).

Tabla: Glucosuria ratas a las 48 horas post inyección

Rata	Glucosuria (mg/dL)
1	300
2	300
3	300
4	1000
5	1000
6	300
7	1000
8	300
9	1000
10	1000
11	1000
12	1000
13	300
14	300
15	300
16	300
17	300
18	1000
19	1000
20	1000
21	1000
22	1000
23	300
24	1000
25	1000
26	300
27	300
28	300
29	300
30	1000