



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**“EL CONSUMO DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*
L.) Y SU EFECTO EN GENES EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE EN RIÑÓN DE RATAS
DIABÉTICAS”**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

M. C. MARÍA DEL CONSUELO LOMAS SORIA

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MARZO 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República (PROPAC)

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**"EL CONSUMO DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SU EFECTO EN
GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RIÑÓN DE RATAS DIABÉTICAS**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta

M. C. MARÍA DEL CONSUELO LOMAS SORIA

Dirigido por

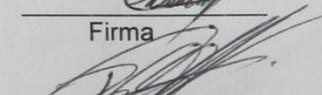
DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

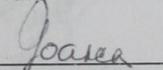
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente


Firma

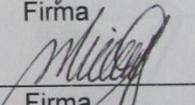
Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario


Firma

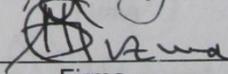
Dra. María Guadalupe Flavia Loarca Piña
Vocal

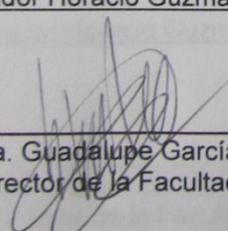

Firma

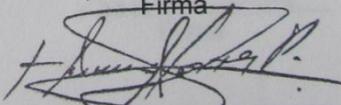
Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente


Firma

Dra. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Suplente


Firma


Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo, 2012
México

RESUMEN

La nefropatía diabética es una complicación de la diabetes y es generada por un desequilibrio en la expresión de ciertos genes que activan o inhiben funciones vitales de la célula. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa con efectos hipoglucemiantes, antioxidantes y previene el daño renal en un modelo de diabetes. Sin embargo, hasta el momento el mecanismo molecular de dicha protección no ha sido elucidado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de frijol sobre genes expresados diferencialmente relacionados con la protección renal. Se trabajó con frijol cocido: Peruano (P), Flor de mayo (FM), Flor de Junio (FJ), Negro (N) y Negro 8025 (N8025). Mediante la técnica de hibridación sustractiva (SSH) se elaboró el banco de genes en riñón de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. De acuerdo al análisis bioinformático la distribución de las EST's inhibidos y sobreexpresados fue de 9% y 4% canales y transportadores, 10% y 6% relacionados con factores de transcripción, 20% y 21% relacionados con el metabolismo celular, 19% y 17% proteínas hipotéticas y finalmente 24% y 17% sin función conocida, respectivamente. Para evaluar el efecto del consumo de frijol, animales diabéticos fueron alimentados durante cuatro semanas con alimento suplementado con frijol al 10%. Algunas variedades de frijol como FM y FJ disminuyeron los niveles de glucosa en ratas diabéticas; así como, algunos marcadores de daño renal en suero y orina. En cuanto a la expresión de genes relacionados con la función renal, el consumo de frijol incrementó la expresión de algunos genes, tales como, treonina proteína quinasa 1 (PIM-1), y arginino succinato liasa (ASL), y disminuyó la expresión de carbamoil fosfato sintasa subunidad 1 (CpS1) e inositol polifosfato multiquinasa (IPMK), entre otros. Estos genes podrían estar relacionados con la eliminación de grupos amino, regulación de la producción de creatinina y disminución del riesgo de acidosis metabólica. Estos resultados sugieren que el consumo de frijol común cocido puede ser utilizado como alimento alternativo para la regulación del daño renal asociado a la diabetes.

Palabras clave: (Diabetes, *Phaseolus vulgaris* L., daño renal, hibridación sustractiva)

SUMMARY

Diabetic nephropathy (DN) is a major complication of diabetes and is caused by an imbalance in the expression of certain genes that activate or inhibit vital cellular functions of cells. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume that has important health properties, lowers blood glucose levels, antioxidant effects and prevents renal damage in a model of diabetes. However, molecular mechanism of this protection has not been elucidated. The aim of this study was to evaluate the effect of bean consumption on differentially expressed genes associated with renal protection. The cooked beans were: Peruano (P), Flor de mayo (FM), Flor de Junio (FJ), Negro (N) y Negro 8025 (N8025). Therefore, suppression subtractive hybridization (SSH) method was used to generate up- and down-regulated subtracted cDNA libraries in the kidney of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. According to bioinformatics analysis, 20% and 21% of genes were related to metabolism proteins, 9% and 4% to transporters and channels, 10% and 6% to transcription factors, 19% and 17% to hypothetical proteins, and finally 24% and 17% to unknown genes, from the down- and up-regulated libraries, respectively. To evaluate the effect of bean consumption, diabetic animals were fed with diet cooked beans supplemented in to the diet (10%). Some varieties of common beans FM y FJ produced a hypoglycemic effect in diabetic rats as well as a decrease in urine and serum renal damage markers. Regarding the expression of genes related with renal function, consumption of cooked beans increased the expression of threonine-protein kinase (PIM-1) and argininosuccinate lyase (ASL) and lowered the expression of carbamoyl-phosphate synthase subunit 1 (Cps1) and inositol polyphosphate multikinase (IPMK), among others. These genes can be related to eliminate ammonium groups, regulate creatinine production, glutamine synthesis and decrease metabolic acidosis risk. These results suggest that consumption of cooked common beans might be used as an alternative food item for the regulation of diabetic nephropathy.

Keywords: (Diabetes, *Phaseolus vulgaris*, renal damage, subtractive hybridization)

Dedicatorias

A Díos

A mi hija Emma

A mi esposo Julián

A mi madre Consuelo

A mis hermanos Yunnuén,
Andrés y Alejandro

A mi Tía-Abuela Alejandra Soria

A toda mi familia y amigos

Agradecimientos

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en alimentos del Centro de la República, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Lorenzo Guevara Olvera del Tecnológico de Celaya por todo el apoyo, la asesoría, confianza y material brindado en su laboratorio para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Carlos Perales de la Universidad de Barcelona por aceptarme en su laboratorio, por todo el conocimiento impartido.

A Carmelita, Laurita y a todo el personal administrativo, por apoyarme siempre, gracias por enseñarme que siempre hay que ser responsables y por supuesto que todo debe de ser en su debido tiempo, muchas gracias.

A mis sinodales, Dr. Ramón G. Guevara González, Dr. Horacio Guzmán, Dra. Guadalupe Loarca, Dra. Minerva Ramos, por las aportaciones a esta tesis.

A la Dra. Rosalía Reynoso, por aceptarme a estar otros tres años más bajo su dirección, gracias por permitirme aprender de usted a través de todo este tiempo que la he conocido.

A todos mis amigos del laboratorio de Bioquímica molecular, a todos los que durante todo este tiempo han pasado por él y me han dejado muchos recuerdos que ahora guardo con tanto cariño, a los nuevos y los viejos amigos, Germán, Ariadna e Iván porque ellos más que nadie saben todo lo que pase al tomar la

decisión de entrar al doctorado y saben que son importantes en mi vida por todo su cariño mil gracias. Ari, mil gracias por darme hospedaje en tu casa, por permitirme entrar en tu vida y ser la hermana que nunca quisiste tener, te quiero mucho. Iván, sabes que eres como un ejemplo a seguir, eres una de las mejores personas que he conocido, yo sé que la vida te recompensará con todo lo bueno que te mereces, gracias por ser mi amigo y sabes que siempre podrás contar conmigo. A mi gran amiga Magda, que desde el inicio de mi doctorado siempre estuviste ahí dándome apoyo incondicional. A Paola que aún que ya no está en el laboratorio siempre has sido y serás mi pepe grillo, mi hermana, mi amiga. A Diego, que siempre tenía algo que decir, de verdad que sin ti el laboratorio no sería el mismo, gracias por tu amistad. Y sobre todo nada de esta tesis hubiera sido posible sin la gran ayuda de Claudia y Vicky, pues fueron las que me ayudaron con todos los trámites de mi tesis, gracias en verdad, les debo mucho, todo lo que hicieron por mí no se puede pagar con nada, ya allá arriba se los pagarán con creces, y aunque en ocasiones se que llegaron a odiarme, solo piensen que lo hicieron por una buena causa, las quiero un montón. Claudia, se que tuvimos un inicio difícil, pero con nuestra amistad la vida nos enseñó que las apariencias engañan, me siento afortunada de poder contar contigo y que ahora sé que tengo una gran amiga más.

A todos mis amigos de Celaya, no saben lo agradecida que estoy con Dios que los haya puesto en mi camino, son un grupo de amigos extremadamente extraordinario, así es, como se los dije un día, les agradezco por haberme dejado entrar, jamás había tenido amigos como ustedes, preocupados por mi cuando eran las diez de la noche y no llegaba del laboratorio, por escaparme con ustedes a comidas, chelas, cine, y mil cosas, por enseñarme a valorar la amistad y que sin ustedes, mi estancia en Celaya nunca hubiera sido igual, gracias Dianita por tus asesorías, por los experimentos fallidos y por quedarte conmigo en el laboratorio todo el día y no desistir..... a memo por pelearme conmigo, te quiero mucho a ti y a Faby.....a Raquel por compartir tu cuarto conmigo, tanto en Celaya como en Querétaro por tus platicas y asesorías aún en la noche, a Antonio (pikus) por ser

tan responsable y motivarme a serlo yo también, a Lilia mi compañera de casa que buenos tiempos aquellos... a Vicky mi ahora hermana de laboratorio que siempre peleamos pero sabes que te quiero con todo mi corazón niña...también a ti ingrato mando.....a Rafa, Tere, Adrián, Daniel a todos ustedes....gracias a por su ánimo, sus sonrisas diarias, no puedo evitar llorar de nostalgia al recordarlos, siempre los recuerdo con mucho cariño.

A las primas Nadia Tess y Raquel, ya ven que al final del camino de los bancos de genes si hubo una luz, después de todo nuestro esfuerzo valió la pena, gracias Tess por tu elocuencia, tu locura, esas desveladas a Celaya valieron la pena, todo por ir de madrugada con "ojitos", gracias Raquel por nunca abandonarnos en nuestra locura prima, se les quiere.

A Mariana y Marcelo muchas gracias por su amistad durante todos estos años voy a extrañar nuestras pláticas.

A todos los que conocí en mi estancia en Barcelona, tal vez no llegarán a ver mi tesis, pero saben que encontré muy buenas personas en mi camino, Ana, Jordi, Xavi, mi niña Tania te quiero mucho, y sobre todo a Shanna, mi brasileña gracias por enseñarme a ser fuerte y sobre todo porque contigo aprendí que la amistad no tiene fronteras, tienes un enorme corazón.....los quiero mucho.

A Sandy, por tu hospitalidad porque siempre en todo momento que lo necesité estuviste ahí para apoyarme.

A mi nueva familia Emma y Julián, mis dos amores los amo con todo mi corazón. Gracias mi pequeña, te amé desde la primera vez que escuché latir tu corazón, desde que sentí tu primera patadita y en el instante en que te vi nacer. Julián no sabes que feliz me hace tenerlos a mi lado, después de todos los contratiempos que tuvimos, después de todas las pruebas que hemos pasado y superado, y aunque sé que aun nos esperan muchas pruebas ahora como padres se que las

superaremos, el estar a tu lado es complementar esa parte que hacía falta en mi vida y el tener a nuestra pequeña completa todo, TE AMO gracias por amarme y por permitirme amarte.

A toda mi familia, principalmente a mi madre porque ahora que yo soy madre comprendo todo lo que ella dio por mí para que yo pudiera llegar a ser lo que soy, porque ahora que soy madre entiendo mas todo los sacrificios, los desvelos y todo el amor que me tiene y que gracias a ello soy la mujer más feliz del mundo por tenerla a mi lado, por su apoyo incondicional en todo momento, gracias porque con su ejemplo de vida, su fuerza, sus consejos y su tenacidad me ayudarán a ser una mejor madre, gracias señora porque sin usted no sería nada, la amo

A mis tías consentidas Brenda y Olga, a mis sobrinas Camila, Valeria, Mayvi, mi sobrino gordo bello Iker, Jonathan, mis primas Brenducha, Diana, José, mi Tío Chuy y su familia, mi Tío Robe y su familia, a mi Tía Ana y su familia porque cada vez que iba de vacaciones a mi casa me hacían sentir querida y me motivaban a seguir adelante a luchar y por hacerme saber que todo lo que hacía valía la pena, agradezco a Dios y a la vida por tener una familia como ustedes. Tía Brenda sabes que siempre te he querido mucho, gracias por tu sonrisa, por tu alegría porque con tu hermosa familia llenan de felicidad mi casa, tío Olga como decirte que para mi eres como una hermana, eres mi confidente mi amiga sabes que amo a tus hijas, que son lo mejor que me ha pasado, las quiero demasiado.

A mis hermanos Andrés y Alejandro y a sus nuevas familias por todo su apoyo y amor incondicional, porque cuando me sucede algo bueno o malo siempre están a mi lado, no tengo palabras para agradecerles por amarme tanto, los quiero hermanitos.

A toda la familia de mi esposo, a mi suegro Joaquín por su apoyo, a la Tía Arge, a Erick, al Tío Noé y su familia, al Tío Ale y su familia, a Sergio Alma y sus pequeñas, a Joaquín y su familia, a Ana y Charly y a sus hermosos gemelos, mi

gordo bello Leonardo y mi princesa Eugenia, gracias a todos por su apoyo, porque me hacen sentir en familia, la señora Arge con sus comidas deliciosas y su amabilidad, al señor Alejandro con sus bromas, ana y charly con su apoyo en todo momento, en fin no terminaría, en verdad que me siento afortunada de haber llegado a una familia como ustedes, muchas gracias. Al primo Flavio y Gaby saben que son como nuestra familia, gracias amigos los quiero mucho.

A todos los que olvidé, por que se que me perdonarán.....muchísimas gracias.

La verdad me fue muy difícil escribir mis agradecimientos no quería hacerlo por todos aquellos que me ayudaron en muchas formas y que olvidé en el camino, porque no puedes escribir en unas cuantas líneas todo lo que sientes por aquellas personas que significan mucho en tu vida y sobre todo porque después de estos largos años recorridos de subidas y bajadas creo que lo más importante que tuve que decir, ya lo hice, todas esas personas que estuvieron a mi lado, las disfruté, las amé las viví y no me arrepiento de ningún instante compartido, de los desvelos, de las largas horas en laboratorio, de las personas que ayudé, de las que me ayudaron, de las tristezas, las alegrías, también las idas al cine, los momentos de ocio y los momentos en los que crees que ya no puedes más y quieres desistir, cada una de todas las personas estuvieron en su debido momento para no decaer, para seguir luchando y todo se resume a hoy, al día en que termino un paso más en mi vida, los quiero a todos gracias por poner su granito de arena en esta, mi pequeña vida para engrandecerla y llenarme de muchos recuerdos que guardaré para siempre. Porque al final de todo este largo camino que recorrí para llegar hasta aquí aprendí una valiosa frase:

“Trabaja como si no necesitaras el dinero, ama como si nunca te hubieran herido, y baila como si nadie te estuviera viendo”.... creo que solo así disfrutas la vida.

“Cada historia tiene un final, pero en la vida, cada final es un nuevo comienzo”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Diabetes mellitus	4
2.1.1 Definición y prevalencia	4
2.1.2 Clasificación y síntomas	5
2.1.3 Alteraciones metabólicas	7
2.2 Complicaciones de la diabetes mellitus	7
2.3 Función y fisiología de los riñones	8
2.4 Nefropatía diabética	10
2.5 Mecanismos moleculares de la nefropatía diabética	11
2.5.1 Inflamación y diabetes mellitus	12
2.5.2 Proteínas antiinflamatorias	16
2.6 Nefropatía diabética y estrés oxidativo	17
2.7 Sistema de defensa antioxidante	19
2.8 Genómica funcional	21
2.9 Estrategias para el estudio de la expresión diferencial de genes	22
2.9.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	24
2.10 Control de la diabetes mellitus	27
2.10.1 Dieta y diabetes mellitus	27
2.11 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	28
2.11.1 Variedades de frijol con mayor consumo en México	28
2.12 Componentes del frijol y su capacidad hipoglucémica, antioxidante y antiinflamatoria	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general	34

5.2 Objetivos específicos	34
6. METODOLOGÍA	35
6.1 Materiales	35
6.1.1 Material biológico	35
6.1.2 Material químico	36
6.1.3 Medios de cultivo	37
6.1.4 Plásmido	37
6.2 Métodos	37
6.2.1 Modelo experimental para construir bibliotecas sustractivas	37
6.2.1.1 Inducción de diabetes y protocolo experimental	37
6.2.1.2 Determinación de glucosa	37
6.2.1.3 Determinaciones semanales	38
6.2.1.4 Sacrificio y obtención de muestras	38
6.2.1.5 Parámetros bioquímicos en orina	38
6.2.1.6 Parámetros bioquímicos en suero	39
6.2.1.7 Evaluación histopatológica del riñón	39
6.2.2 Metodología para la realización de bibliotecas de expresión diferencial de genes	39
6.2.2.1 Extracción y purificación de ARN	39
6.2.2.2 Síntesis de ADNc de cadena sencilla	40
6.2.2.3 Síntesis de ADNc de doble cadena por LD PCR	40
6.2.2.4 Purificación de ADNc de doble cadena	42
6.2.3 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	42
6.2.3.1 Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima <i>Rsa</i> I	42
6.2.3.2 Ligación de adaptadores	42
6.2.3.3 Primera hibridación	43
6.2.3.4 Segunda hibridación	43
6.2.3.5 Primera amplificación por PCR	43
6.2.3.6 Segunda amplificación por PCR	44
6.2.3.7 Purificación de fragmentos en geles de agarosa	44
6.2.3.8 Ligación de los insertos en el vector TApCR4 TOPO®	44

6.2.3.9 Transformación de células de <i>E. coli</i> TOP 10 F' con los plásmidos TApCR4 TOPO®	44
6.2.4 Construcción de la biblioteca sustractiva	45
6.2.4.1 Selección de colonias conteniendo el inserto de interés	45
6.2.4.2 Digestión con la enzima <i>Eco RI</i>	45
6.2.5 Confirmación del banco sustractivo mediante análisis tipo Northern	45
6.2.6 Obtención de la secuencia de algunas clonas diferenciales	46
6.2.7 Elaboración de harinas de frijol cocido	46
6.2.8 Extracción de compuestos fenólicos	47
6.2.9 Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	47
6.2.9.1 Cuantificación de fenoles totales	47
6.2.9.2 Cuantificación de taninos condensados	48
6.2.9.3 Cuantificación de flavonoides	48
6.2.9.4 Cuantificación de antocianinas	49
6.2.9.5 Determinación de la capacidad antioxidante	49
6.2.10 Evaluación del efecto del frijol sobre daño renal	50
6.2.11 Parámetros bioquímicos en suero y orina	51
6.2.12 Parámetros bioquímicos en riñón	51
6.2.12.1 Extracción de proteínas totales en riñón	51
6.2.12.2 Oxidación de proteína en riñón	52
6.2.12.3 Peroxidación lípidica en la fracción post-mitocondrial (PMS) de tejido de riñón	53
6.2.12.4 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón	53
6.2.12.5 Determinación de la actividad de la catalasa (CAT) en Riñón	54
6.2.12.6 Determinación del factor glutatión reducido (GSH) en Riñón	55

6.2.13 Evaluación del efecto del consumo de frijol a nivel transcriptoma	56
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
8.1 Diferencias a nivel bioquímico entre ratas sanas y diabéticas	57
8.1.1 Histopatología del riñón	59
8.2 Elaboración de bibliotecas de expresión diferencial de genes	61
8.2.1 Calidad de ARN total	62
8.2.2 Síntesis de ADN complementario	62
8.2.3 Purificación del ADNc de doble cadena	63
8.2.4 Digestión con <i>Rsa</i> I	64
8.2.5 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	65
8.2.6 Obtención de la biblioteca sustractiva	67
8.2.7 Confirmación de la biblioteca sustractiva mediante análisis Northern blot	69
8.2.8 Análisis de los EST's diferenciales obtenidos por medio del software Blast	72
8.2.9 Función de los transcritos seleccionados de las bibliotecas de genes	77
8.2.9.1 Genes de metabolismo	77
8.2.9.2 Transportadores y canales	85
8.2.9.3 Factores de transcripción	86
8.2.9.4 Función desconocida	87
8.3 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido	90
8.4 Niveles de glucosa e insulina en sangre de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol	93
8.5 Peso corporal de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol	97
8.6 Consumo de agua de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol	99

8.7 Parámetros bioquímicos de daño renal en orina y suero de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol	100
8.7.1 Parámetros bioquímicos en orina	100
8.7.2 Parámetros bioquímicos en suero	103
8.7.2.1 Perfil de lípidos	103
8.7.2.2 TNF- α , adiponectina y proteína c reactiva (PC-R)	105
8.7.3 Parámetros bioquímicos en riñón	107
8.7.3.1 Oxidación de proteínas y lípidos	107
8.7.3.2 Contenido de glutatión-S-transferasa, catalasa y glutatión reducido en riñón	109
8.8 Efecto del consumo de frijol sobre el transcriptoma diferencial del riñón de ratas diabéticas	111
9. CONCLUSIONES	121

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Acción de las citocinas proinflamatorias en la nefropatía diabética	15
2	Ventajas y desventajas de las estrategias para el estudio de la expresión diferencial de genes	23
3	Grupos experimentales para la evaluación del efecto del consumo de frijol cocido sobre daño renal	51
4	Parámetros fisiológicos y bioquímicos de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina	58
5	Genes reprimidos en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ e identificados con la técnica de SSH	73
6	Genes sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ e identificados con la técnicas SSH	75
7	Contenido de compuestos fenólicos de las harinas de frijol cocido	91
8	Efecto de la dieta suplementada con frijol cocido sobre parámetros funcionales renales de ratas diabéticas	102
9	Concentración de perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido	104
10	Efecto de dietas suplementadas con frijol cocido sobre marcadores de inflamación en ratas diabéticas	105
11	Actividad de enzimas antioxidantes y concentración de glutatión reducido en riñón de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol	110
12	Efecto del consumo de frijol cocido sobre genes reprimidos en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	115
13	Efecto del consumo de frijol cocido sobre genes sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Factores que afectan la homeostasis de la glucosa en la diabetes tipo 1 y 2	6
2	Estructura funcional del riñón	8
3	Procesos básicos en el riñón para la formación de la orina	9
4	Principales vías iniciadas por hiperglicemia que contribuyen a las complicaciones de la diabetes	12
5	Activación de NF- κ B por hiperglicemia y desarrollo de complicaciones de la diabetes	13
6	Papel de los triglicéridos en la nefropatía diabética	16
7	Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno	20
8	Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	26
9	Producción y preferencias de frijol por variedades de acuerdo a la zona geográfica	29
10	Efecto del frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado en la dieta (3 y 50%) sobre la concentración de albúmina en la orina de ratas Wistar diabéticas tratadas durante 3 semanas	31
11	Efecto del frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado en la dieta (3 y 50%) sobre la concentración de IL-6 y TNF- α en suero de ratas Wistar diabéticas tratadas durante 3 semanas	31
12	Variedades de frijol empleadas en el experimento	35
13	Estrategia general para la realización de bibliotecas de expresión diferencial de genes	41
14	Análisis histopatológico de las alteraciones renales en ratas (a) sanas y (b) diabéticas	61
15	Gel representativo del ARN total extraído de riñón de ratas (1) sanas y (2) diabéticas	62
16	Gel representativo de la optimización del número de ciclos de PCR con el procedimiento SMART LD-PCR	63

17	Gel representativo de la purificación del ADNc de doble cadena	64
18	Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima <i>Rsa</i> I	65
19	Segunda amplificación del producto de la hibridación sustractiva (SSH)	66
20	Confirmación de inserto para la construcción de las bibliotecas sustractivas de aproximadamente 500pb	68
21	Confirmación de inserto para la construcción de las bibliotecas sustractivas de aproximadamente 750pb	68
22	Comprobación del marcaje de las sondas	69
23	Análisis Northern en macroarreglo de clonas reprimidas en el riñón de ratas diabéticas, empleando como sonda el ADN complementario de la condición sana (A) y condición diabética (B).	70
24	Análisis Northern en macroarreglo de clonas sobreexpresadas en el riñón de ratas diabéticas, empleando como sonda el ADN complementario de la condición sana (A) y (B) condición diabética.	71
25	Análisis de Northern de genes seleccionados del banco de genes reprimidos del riñón de ratas diabéticas	79
26	Regulación del transporte de sodio y potasio en la nefrona distal	80
27	Papel de la isoforma WNK1 en la regulación del transporte de sodio y potasio en el riñón	82
28	Representación de las reacciones de acidificación de la orina a partir de la secreción de amonio, en las células distales de la nefrona.	83
29	Análisis de Northern-blot de genes seleccionados del banco de genes sobreexpresados del riñón de ratas diabéticas	85
30	Distribución de las clonas secuenciadas de acuerdo a su probable función (a) inhibidos y (b) sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ.	89
31	Capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido	93

	determinada por el método ABTS	
32	Niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10 %).	95
33	Concentración de insulina en suero de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%).	97
34	Peso corporal de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%).	98
35	Consumo de agua en ratas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%).	99
36	Contenido de TBARS en el riñón de ratas diabéticas alimentadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%).	108
37	Oxidación de proteínas en el riñón de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con diferentes variedades de frijol cocido	108
38	Representación del arreglo de clonas inhibidas en el riñón de ratas diabéticas para hibridar mediante Northern blot con sondas de los diferentes ADNc de riñón de ratas alimentadas con frijol.	112
39	Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre a) ASL y b) GS en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	113
40	Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre PPARD en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	114
41	Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre IMPK en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	119
42	Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre CPS1 en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ	120

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las principales causas de mortalidad en México (Rivera y col., 2004; Secretaría de Salud, 2004). Actualmente existen entre 6 y 10 millones de diabéticos (con una prevalencia nacional de 10.7 % en personas entre 20 y 69 años) (Aguilar-Salinas y col., 2003; Rull y col., 2005; Ávila-Curiel y col., 2007).

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones microvasculares más frecuentes de la diabetes mellitus, y se desarrolla en el 15-40% de los pacientes con diabetes tipo 1 (DM1) y diabetes tipo 2. Esta complicación se asocia con un aumento considerable en la morbilidad y la mortalidad siendo la causa principal de insuficiencia renal en etapa terminal (Caramori y Mauer, 2003; Reutens y Atkins, 2011; Wada y col., 2011). Esta complicación se relacionan con determinadas alteraciones renales morfológicas y funcionales y se caracteriza en las primeras etapas por un aumento de la excreción urinaria de albúmina y en la fase avanzada por proteinuria, que también se considera un deterioro de la función renal (Wolf, 2004).

En los últimos años, se ha reportado que diversos factores hemodinámicos y metabólicos están involucrados en la patogénesis de la ND (Kanwar y col., 2008), como por ejemplo, los productos finales de la glicación avanzada y la vía de la poliol/aldosa reductasa, factores vasoactivos como la angiotensina II y la endotelina, así como los factores vasodilatadores como el óxido nítrico. Además, la proteína cinasa C, una molécula de señalización intracelular, puede ser activada por muchos de estos factores metabólicos y hemodinámicos para estimular la producción de citocinas y prostaglandinas. Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento derivado de plaquetas también están implicados en la patogénesis de la enfermedad renal diabética (Schirijvers y col., 2004).

A pesar de los recientes avances, la patogénesis de la ND es poco clara (Raptis y Viberti, 2001). Por lo tanto, hay interés actual para la identificación de

moléculas de señalización que desempeñan un papel clave en el desarrollo de la ND. Esto podría lograrse con el uso de técnicas modernas como los microarreglos, proteómica y transcriptómica. Diversas patologías, como ND, muestran un patrón de genes expresados diferencialmente que podrían ser identificados por estas técnicas. Por lo tanto, la hibridación sustractiva (SSH) se puede utilizar para identificar dichos genes. Utilizando la técnica de SSH y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la población de ARNm en una condición se resta a los ARNm de otra condición contrastante, aislando así a los genes expresados diferencialmente, los cuales pueden ser caracterizados (Young y col., 2010). En base a lo anterior, en este proyecto se planteó el uso de SSH para la identificación de genes relacionados con la ND en ratas diabéticas inducidas con STZ.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertas poblaciones, entre las cuales se encuentra la de México, muestran una fuerte predisposición genética al desarrollo de la diabetes (Hayes y col., 2007). Sin embargo, éste no es el único parámetro del cual depende la presencia de la enfermedad, ya que existen estudios que demuestran que la diabetes resulta de la interacción de la susceptibilidad genética y el estilo de vida (Schultz y col., 2006). Con respecto a la dieta, estudios epidemiológicos han reportado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas tienen una menor incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Wahle y col., 2004). Estas propiedades se han relacionado con alimentos que contienen compuestos fenólicos y ácido graso omega 3, entre otros. Por lo tanto, patrones dietarios tradicionales pueden ayudar a reducir el riesgo de obesidad, diabetes y sus complicaciones, debido a un adecuado balance de calorías y una ingesta recomendable de fitoquímicos.

En la dieta mexicana existen una serie de alimentos que han sido recomendados para el control de la diabetes, tal es el caso del frijol, el cual es una de las leguminosas más importantes para la población mexicana (Paredes López y Valverde, 2006). El consumo de frijol ha recibido recientemente mayor interés, ya que se considera como un alimento nutracéutico (Cavallé de Moya y col., 2003). Sus efectos benéficos se han atribuido a fitoquímicos, tales como, los compuestos

fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas), fibra, ácidos grasos insaturados, inhibidores de tripsina, entre otros (Adams y Standridge, 2006).

El efecto hipoglucemiante del frijol se ha reportado en diversos estudios realizados con conejos y con ratones diabéticos (Román-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002), sin embargo en estos estudios se han evaluado extractos de frijol crudo. Por otro lado, en un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo con ratas diabéticas, inducidas con STZ, se demostró el efecto hipoglucemiante del frijol cocido, ya que los frijoles reducen de manera importante (30%) los niveles de glucosa en ayuno. Por otro lado, en animales con niveles de glucosa superiores a 350 mg/dL, en donde el consumo de frijol no disminuye los niveles de glucosa, mejora parámetros relacionados con daño renal como albúmina y proteína en orina, así como una disminución en los niveles en suero de citocinas proinflamatorias relacionadas con daño renal, tales como, IL-6 y TNF- α . Sin embargo, existe poca información acerca de los posibles mecanismos de acción a través de los cuales el frijol cocido disminuye la glucosa en torrente sanguíneo, así como, los mecanismos involucrados en la protección del daño renal.

En este proyecto se planteó identificar posibles transcritos relacionados con las alteraciones renales de la diabetes y su regulación por el consumo de diferentes variedades de frijol cocido.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Definición y prevalencia

La diabetes mellitus es un desorden metabólico crónico caracterizado por niveles persistentemente elevados de glucosa en la sangre (≥ 126 mg/100mL ó 7.0 mmol/L), la que a su vez es consecuencia de una deficiencia en la secreción de insulina o en el efecto biológico de la misma (Ramos y Domingo, 1994). Es una enfermedad que incapacita al cuerpo para metabolizar o usar eficazmente los carbohidratos, las proteínas y las grasas (Islas y Revilla, 2005).

La prevalencia de la diabetes es mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo; sin embargo, el incremento proporcional será mayor en países en vías de desarrollo. En Latinoamérica y el Caribe la prevalencia global es de 5.7%, para el año 2025 se espera un 8.1%. El país latinoamericano con mayor incremento en la prevalencia es México (7.7-12.3%) y en el mundo es la India (Moreno-Altamirano, 2001).

La diabetes y las complicaciones propias de la enfermedad están consideradas como una de las principales causas de mortalidad en México (Rivera y col., 2004; Secretaría de Salud, 2004). Actualmente existen entre 6 y 10 millones de diabéticos (con una prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años) (Aguilar-Salinas y col., 2003; Rull y col., 2005; Ávila-Curiel y col., 2007).

Aunque la terapia de insulina puede revertir muchas de las alteraciones metabólicas y se han propuesto numerosas mejoras en el manejo de la misma, la enfermedad ha alcanzado proporciones epidémicas. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, parece ser una de las amenazas más importantes para la salud humana en el siglo 21 (Permutt y col., 2005).

2.1.2 Clasificación y síntomas

De manera general se ha clasificado como diabetes mellitus tipo 1, en la cual el páncreas no produce insulina, como resultado de la destrucción autoinmunitaria de las células β pancreáticas, lo que se traduce en un déficit absoluto de insulina y una dependencia vital a la insulina exógena. Por lo tanto, la glucosa no puede entrar a la célula y se acumula en el torrente sanguíneo elevando el valor de la glicemia (Guía Mexicana de Diabetes, 2005).

La diabetes mellitus tipo 2 es la más prevalente, también es llamada diabetes mellitus no insulino dependiente. Cuando hay diabetes mellitus tipo 2, el páncreas produce poca insulina o bien esta hormona no es reconocida por las células, por lo tanto la glucosa no puede ingresar a los órganos que dependen de ella y se acumula en el torrente sanguíneo elevando el nivel de la glicemia (Guía Mexicana de Diabetes, 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que la homeostasis de la glucosa es un balance entre la producción de insulina, determinado por la cantidad y/o función de las células β pancreáticas así como de la acción de la insulina. Algunos de los factores reportados que afectan a este proceso tanto en humanos como en modelos experimentales de animales se muestran en la **Figura 1** (Permutt y col., 2005).

Para establecer el diagnóstico de diabetes mellitus en su fase clínica, es indispensable demostrar hiperglicemia en ayunas, o bien postprandial, así como glucosa en la orina (Islas y Revilla, 2005).

El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de Diabetes recomendó el uso de la glucosa plasmática en ayunas como prueba para el diagnóstico de la enfermedad, sugiriendo niveles de glucosa de 110 mg/dL. El tiempo en el que se establece el diagnóstico, así como, el control de la enfermedad modificará la evolución clínica de la diabetes (Arreola y Partida, 2005).

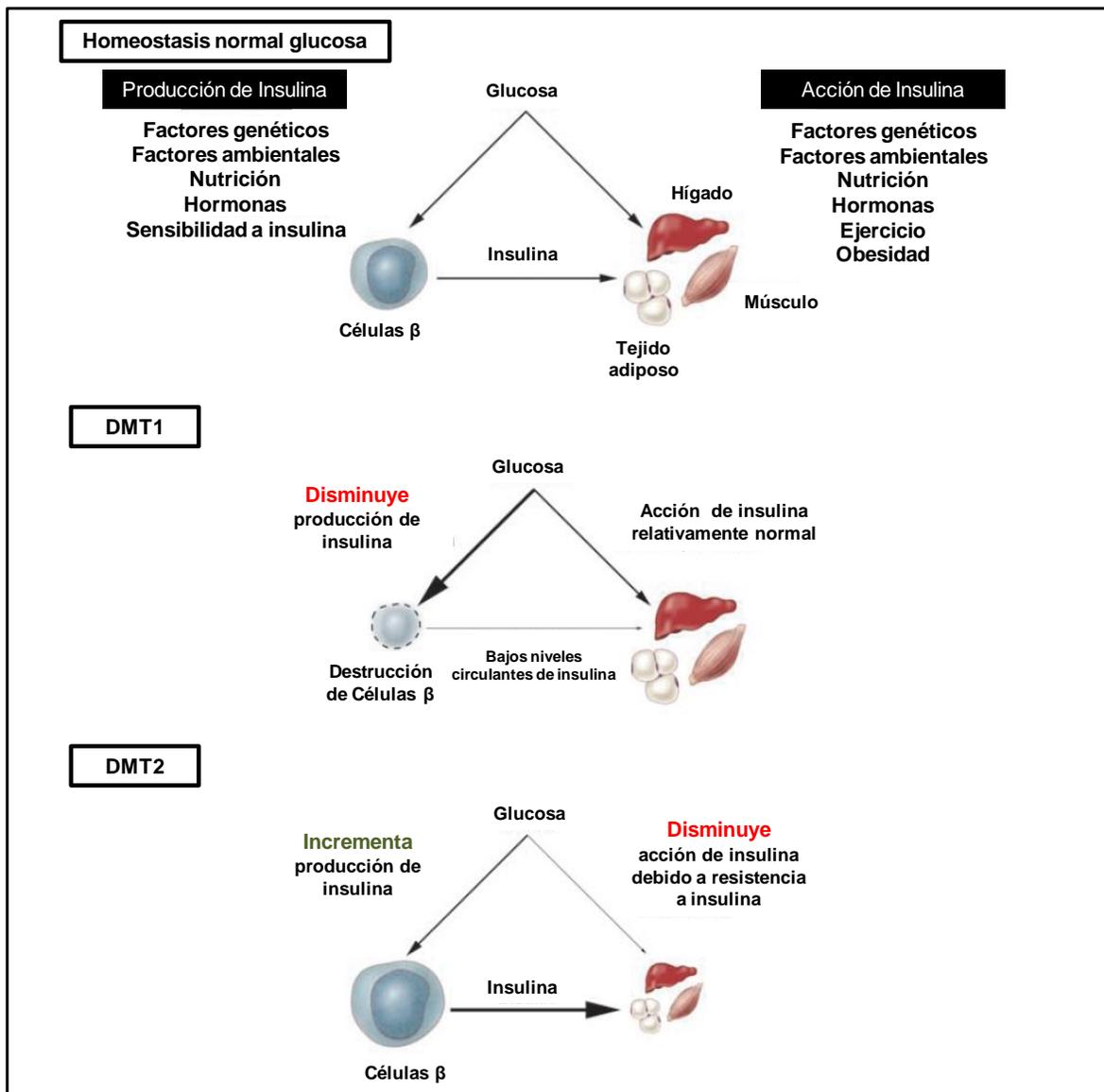


Figura 1. Factores que afectan la homeostasis de la glucosa en la diabetes tipo 1 y 2 (Modificado de Permutt y col., 2005).

Algunas manifestaciones y síntomas más importantes del padecimiento para ambos tipos de diabetes son: poliuria (excreción excesiva de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso, algunas veces polifagia (ingestión excesiva de alimentos), visión borrosa, disminución de la fuerza muscular, con menor frecuencia somnolencia, cefalea, entre otros (Braunwald y col., 1998).

2.1.3 Alteraciones metabólicas

La diabetes mellitus tipo 1 se manifiesta inicialmente con tres secuelas esenciales: 1) hiperglicemia, 2) aumento del metabolismo de las grasas con fines energéticos e incremento en la síntesis de colesterol en el hígado y 3) reducción de las proteínas musculares (Flores y col., 2005).

En la diabetes, la utilización de glucosa es baja debido a que la insulina, la cual es el estímulo hormonal para la incorporación y metabolismo de la glucosa, es deficiente. Como consecuencia de ello, la glucosa está presente en cantidades excesivas en sangre. Las células hepáticas intentan generar más glucosa mediante la estimulación de la gluconeogénesis, en donde la mayor parte de los sustratos proceden de los aminoácidos, que a su vez provienen en gran parte de la degradación de las proteínas musculares.

Así mismo, cuando hay niveles bajos de insulina, existe una liberación de proteínas y triglicéridos tanto del músculo como del tejido adiposo, respectivamente, lo que lleva a un incremento en los niveles de sustratos de la gluconeogénesis, tales como, alanina (Bennett y Knowler, 2001), lo que finalmente conduce a un desequilibrio metabólico en la diabetes mellitus.

2.2 Complicaciones de la diabetes mellitus

Los niveles elevados de glucosa (hiperglicemia), que caracterizan a la diabetes, eventualmente generan una serie de complicaciones irreversibles, que de no ser tratadas, provocan la muerte (Reusch, 2003). Dentro de las complicaciones más comunes en la diabetes mellitus se encuentran las macrovasculares, como la aterosclerosis y las microvasculares como retinopatía, neuropatía y nefropatía diabética (Moreno-Altamirano, 2001).

La ND es una enfermedad secundaria de la diabetes en la cual el riñón pierde la capacidad para funcionar apropiadamente. Dicha alteración constituye

una de las principales causa de morbi-mortalidad en estos pacientes (Aguilar y col., 2000; Salido y col., 2001).

2.3 Función y fisiología de los riñones

Los riñones están constituidos por pequeñas unidades funcionales ubicadas en la corteza del riñón llamadas nefronas, compuestas por un conjunto de hasta cincuenta capilares sanguíneos organizados en paralelo llamado glomérulo. El glomérulo se encuentra envuelto en una especie de copa llamada cápsula de Bowman y por un sistema tubular en forma de U rodeado de pequeñas venas y arterias llamado túbulo, el cual está constituido de túbulo proximal, asa de Henle (cuya parte inferior tiene una pared muy delgada denominándose segmento delgado), túbulo distal y túbulo colector, que es el colector de la orina. Cada riñón contiene alrededor de un millón de nefronas (**Figura 2**) (Douglas y Pooler, 2006).

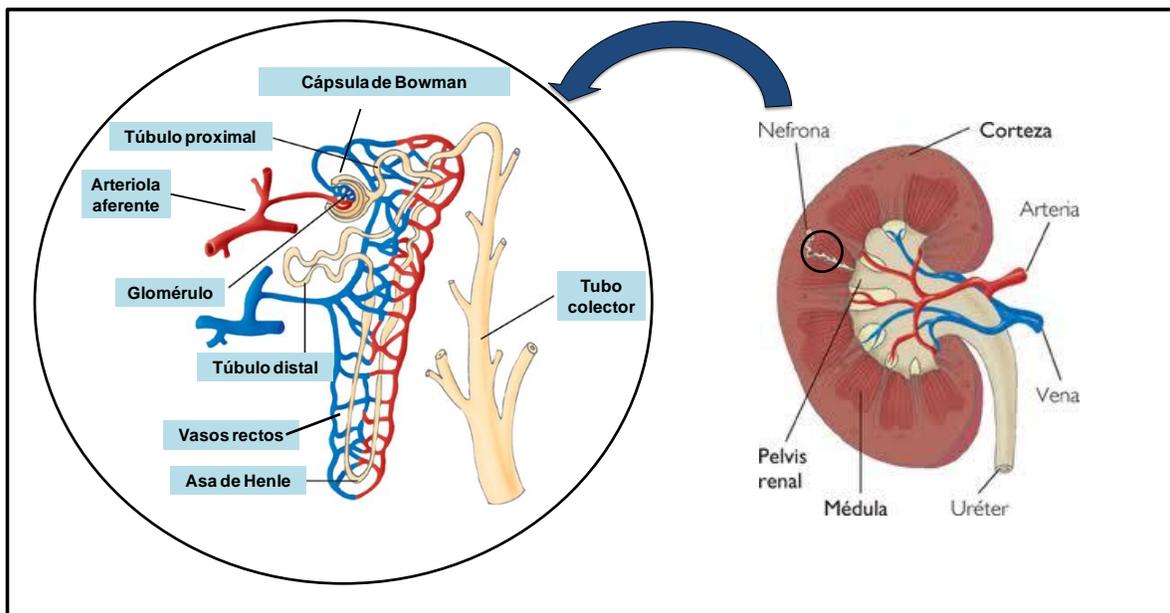


Figura 2. Estructura funcional del riñón

El túbulo colector recoge líquido de varias nefronas y desemboca finalmente en la pelvis renal, la cual a su vez continúa con los uréteres que alcanzan la vejiga

urinaria. La orina depositada en la vejiga saldrá al exterior en el acto de micción a través de la uretra (Gal y col., 2007).

La estructura de la membrana glomerular impide que en condiciones normales sean filtradas células sanguíneas, estructuras moleculares complejas como proteínas (inferiores al tamaño de la seroalbúmina). Sin embargo, moléculas de menor peso molecular (ciertas proteínas, péptidos, agua, glucosa, aminoácidos, minerales y otras sustancias de pequeño peso molecular) sí son filtradas. La filtración a través de la membrana glomerular de las pequeñas moléculas es indiscriminada, de tal modo que igualmente pasan sustancias necesarias para el organismo como la glucosa, los aminoácidos o los minerales, que otras sustancias de desecho como la urea, ácido úrico y creatinina (**Figura 3**).

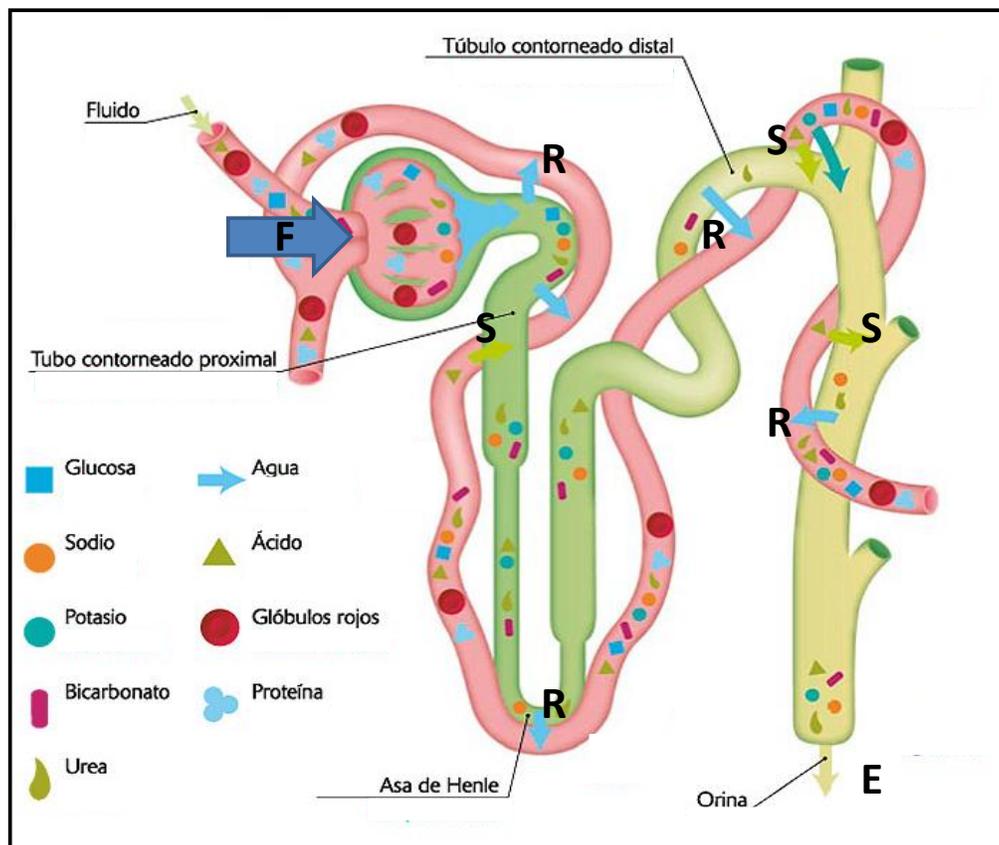


Figura 3. Procesos básicos en el riñón para la formación de la orina

F: filtración, R: reabsorción, S: secreción, E: excreción.

El riñón tiene un papel primordial como órgano excretor, depurador y regulador del metabolismo hidrosalino, regulando la filtración del agua y de distintos iones como el sodio, potasio, calcio, cloruro y fosfatos. Adicionalmente tiene función endocrina, sintetiza la 1,25 dihidroxicolecalciferol (Vitamina D₃) por hidroxilación en el carbono 1 del 25-dihidroxicolecalciferol sintetizado a nivel hepático, esta sustancia es clave en el metabolismo de calcio, produce renina en el complejo yuxtaglomerular, degrada y cataboliza hormonas peptídicas, tales como calcitonina, insulina glucagón y gastrina. En el metabolismo destacan especialmente la gluconeogénesis en condiciones de cetoacidosis y diversos aspectos del metabolismo lipídico (Gal y col., 2007).

2.4 Nefropatía diabética

La ND es la causa más común de insuficiencia renal crónica (Atlas de la diabetes, 2002). La mortalidad en pacientes diabéticos con nefropatía es de 20-40 veces mayor que en pacientes sin nefropatía. Se desarrolla en aproximadamente 40% de los pacientes con diabetes tipo 2, particularmente cuando se presenta descontrol metabólico crónico, además de historia familiar de nefropatía diabética o de hipertensión arterial (Aguilar y col., 2000).

Los principales cambios morfológicos que presenta el riñón diabético ocurren en los glomérulos, en donde los cambios celulares llevan a una disminución del área de superficie disponible para filtrar la sangre y por consiguiente, un decremento en el flujo de filtración glomerular. Además, la hiperglicemia produce una pérdida de glucosa en la orina (glucosuria) (Figuerola, 1999).

La primera manifestación clínica de la ND es la albuminuria, que al principio es intermitente. Esta enfermedad se define por la presencia de albúmina persistente (superior a 30–300 mg/24 horas). La microalbúmina es un poderoso predictor de riesgo renal, así como también un marcador de daño glomerular y considerado como un marcador de nefropatía progresiva. Cuando la proteinuria es

superior a 300 mg/24 h a partir de este punto, la enfermedad puede progresar hacia la insuficiencia renal crónica (Figuerola, 1999). Así mismo, niveles elevados de albúmina en la orina aumentan progresivamente el riesgo de desarrollar macroalbuminuria y de presentar eventos cardiovasculares. Por lo que la disminución de la albúmina en orina no solamente protege al riñón, también al sistema cardiovascular (Wiseman y col, 1985; Userpater e Inserra, 2004).

2.5 Mecanismos moleculares de la nefropatía diabética

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar los efectos patológicos de la diabetes en los cuales la mayor parte de éstos se atribuyen a los niveles elevados y persistentes de glucosa (Evans y col., 2002).

La hiperglicemia persistente ocasiona la activación de vías metabólicas en células endoteliales y vasculares, a través de un aumento en la concentración de radicales libres, especialmente de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), los cuales ocasionan la acumulación de NADH y consecuentemente la activación de cuatro posibles vías.

El incremento de los radicales libres, producidos por la hiperglicemia, inhibe a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que participa en la vía de la glucólisis. Este aumento conlleva a una acumulación de metabolitos río arriba de esta enzima, los cuales activan otras vías metabólicas: a) vía de los azúcares polihidroxilados, b) vía de la hexosamina, c) producción de diacilglicerol (DAG), el cual a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC), y d) síntesis de productos de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), los cuales también estimulan a la PKC (**Figura 4**) (Brownlee, 2001; Evans y col., 2002; Schultz y col., 2005; Yamagishi y col., 2007; Aronson, 2008).

La activación de PKC se ha relacionado con cambios funcionales de las células endoteliales vasculares y renales mediante la participación de factores de transcripción como NF-κB y por alteraciones en la expresión de ciertas proteínas membranales.

Los AGEs producidos por células endoteliales se unen a los receptores AGE (RAGE) de las mismas células endoteliales, células mesangiales, glomerulares y macrófagos, generando ROS y activando NF- κ B, para la expresión de genes, principalmente de algunas citocinas, los cuales son mediadores importantes de la inflamación (Brownlee, 2001).

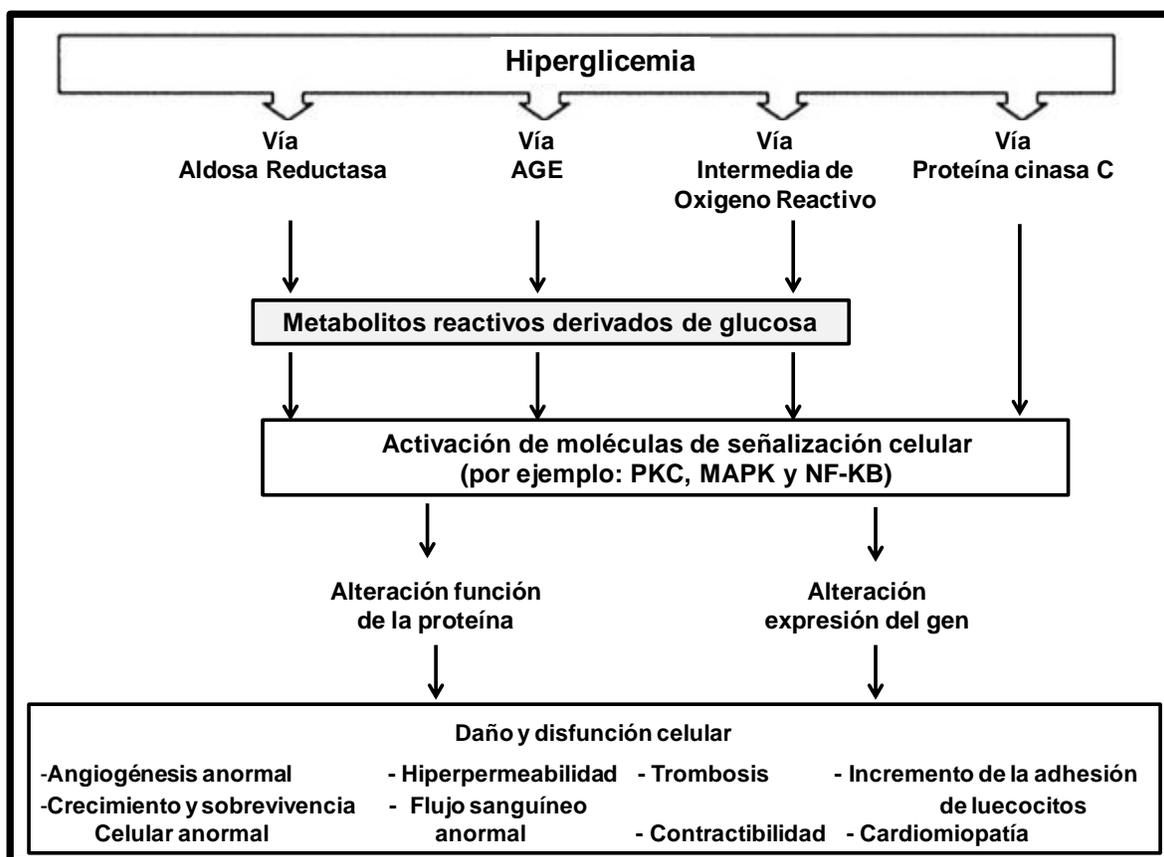


Figura 4. Principales vías inducidas por hiperglicemia que contribuyen a las complicaciones de la diabetes (Modificado de King, 2008).

2.5.1 Inflamación y diabetes mellitus

La expresión de proteínas inflamatorias y el aumento del estado inflamatorio en la enfermedad, contribuyen al desarrollo de las complicaciones de la diabetes. En la **Figura 5** se explica la relación entre el estado de hiperglicemia, estrés

oxidativo y estado inflamatorio durante el desarrollo de las complicaciones de la diabetes como aterosclerosis, nefropatía, neuropatía y retinopatía diabética.

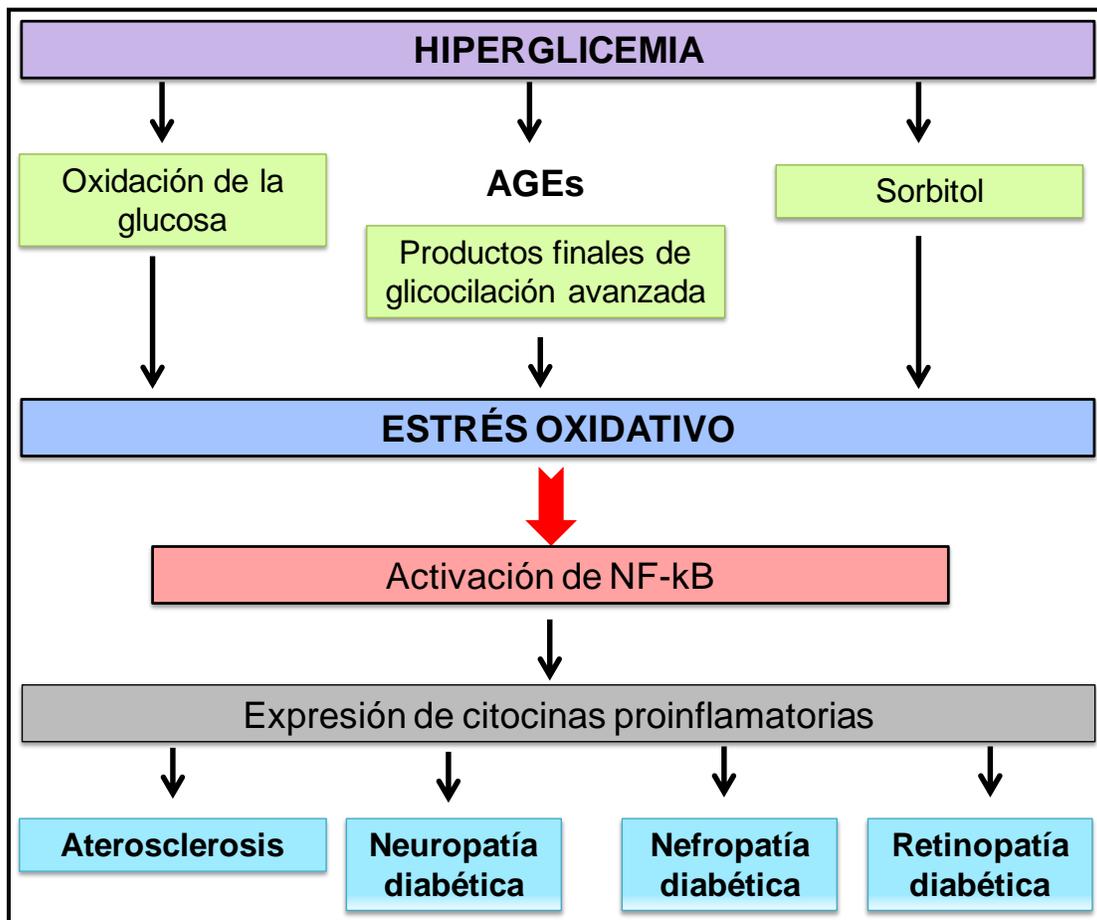


Figura 5. Activación de NF-kB por hiperglicemia y desarrollo de complicaciones de la diabetes (Modificado de Nawroth y col., 2000). NF-kB: factor de transcripción-kB

NF-kB puede ser activado por una amplia gama de estímulos exógenos y endógenos, incluyendo hiperglicemia, ROS, un incremento de ácidos grasos libres, TNF- α , IL-1 β , IL-6 y otras citocinas proinflamatorias (Evans y col., 2002). Posteriormente, activa a los mismos genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, regulando la misma producción de las citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión, como molécula de adhesión intercelular (ICAM) y molécula de adhesión de células vasculares (VCAM) (Muntaner y col., 1999).

De tal forma, que la producción de citocinas desencadenadas por un proceso de inflamación crónico leve ejerce un efecto dañino sobre la acción periférica de la insulina y contribuye la causa del desarrollo de algunas de las complicaciones asociadas con la diabetes, como la ND (Rodríguez y Guerrero, 2005).

La citocina TNF- α está relacionado con la ND y la excreción de ésta en la orina precede al desarrollo de la microalbuminuria en un modelo animal (Dipetrillo y col., 2003). Esta citocina provoca el desplazamiento de células inflamatorias a la estructura microvascular de los riñones, lo cual predispone al desarrollo de la ND (Williams y Nadler, 2007).

Aunque existe cierta controversia en torno a la función exacta de los procesos inflamatorios en la diabetes tipo 1, hallazgos interesantes han surgido a partir de estudios de la proteína C reactiva (PC-R), una medida de biomarcadores inflamatorios circulantes. Por ejemplo, aunque en estudios se ha encontrado que al inicio (a los pocos días del diagnóstico) de la diabetes tipo 1 las concentraciones de PC-R en individuos diabéticos son similares a los observados en controles sanos, los niveles de PC-R en personas con diabetes a largo plazo son significativamente mayores (King, 2008).

Específicamente en el riñón, se sabe que los radicales libres activan a factores de transcripción, los cuales regulan la expresión de un gran número de genes, incluyendo factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β_1 (TGF- β_1), el cual está estrechamente relacionado con la ND. Aunque la expresión de algunas moléculas como las citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento parecen ser la causa de la acumulación de la matriz extracelular en la progresión del daño renal, es el TGF- β la molécula profibrótica más ligada en el desarrollo de la fibrosis renal durante el desarrollo de la ND (Böttinger y Bitzer, 2002).

Cuadro 1. Acción de las citocinas proinflamatorias en la nefropatía diabética

Acciones de las citocinas proinflamatorias a nivel renal con potenciales implicaciones patogénicas en el contexto de la nefropatía diabética

- Citotoxicidad directa
 - Inducción de apoptosis
 - Contracción celular
 - Efectos proliferativos
 - Producción y acumulo de matriz extracelular
 - Engrosamiento de membranas basales glomerulares
 - Alteraciones de la barrera de permeabilidad glomerular
 - Estímulo para la producción de factores quimiotácticos, moléculas de adhesión, sustancias procoagulantes, factores de crecimiento mediadores inflamatorios (factores del complemento, especies reactivas del oxígeno, prostanoïdes, óxido nítrico, etc.)
 - Retención de sodio
 - Hipertrofia renal
-

Un gran número de estudios sugiere que la dislipidemia tiene un papel importante en la progresión de enfermedad renal en pacientes con diabetes. Los lípidos pueden provocar daño renal mediante la estimulación de TGF- β , lo que induce la producción de ROS y causan daño a los glomérulos y glicocalix glomerular (**Figura 6**).

Investigaciones sobre la patogénesis de los cambios microvasculares se han centrado en los cambios inducidos por la hiperglicemia en la función de las células endoteliales y en la estructura de la barrera de filtración glomerular. Al respecto se sabe que los cambios en la presión de perfusión glomerular, los cuales son regulados por las arteriolas aferentes y eferentes, tienen un marcado efecto sobre la progresión de la patología glomerular (Rutledge, y col., 2010).

Aunque en pacientes con nefropatía diabética, el engrosamiento de la membrana glomerular y tubular parece preceder a los cambios hipertensivos, las lesiones glomerulares que se desarrollan a medida que avanza la nefropatía puede ser consecuencia de una combinación de hiperglucemia, hiperlipidemia,

factores hemodinámicos y mecanismos inflamatorios (Schrijvers y col., 2004; Rutledge, y col., 2010).

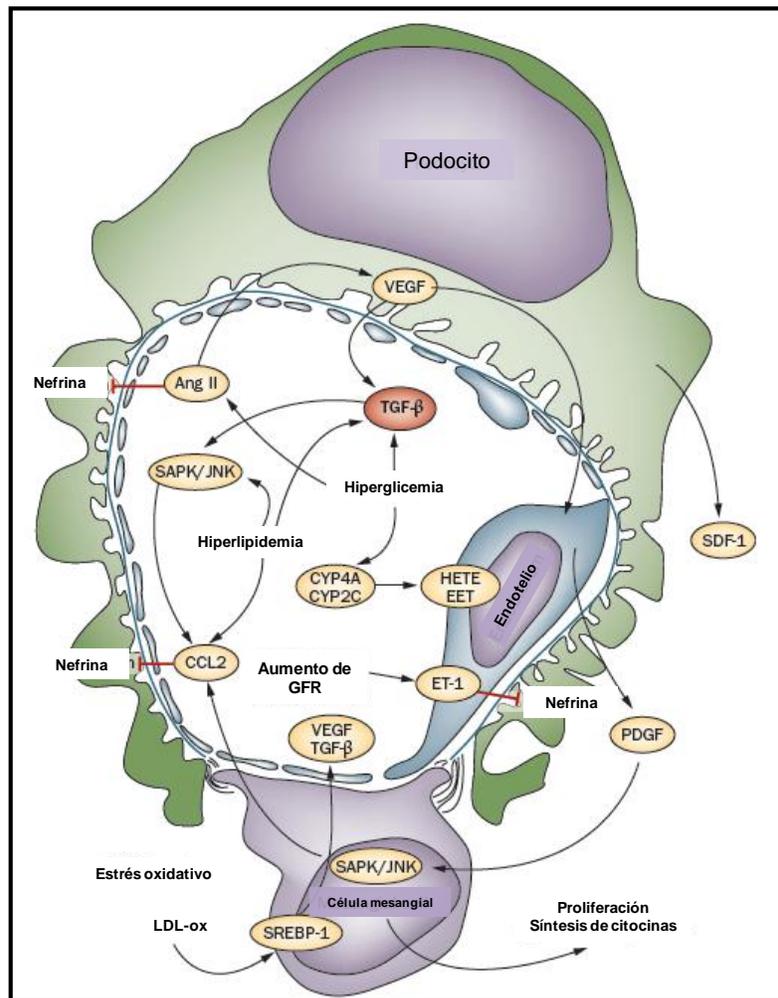


Figura 6. Papel de los triglicéridos en la nefropatía diabética

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, SDF-1: células de estroma derivadas del factor 1, Ang II: Angiotensina II, TGF- β_1 : factor de crecimiento transformante β_1 , SAPK/JNK: vía proteína cinasa activada por estrés/c-Jun NH₂-cinasa terminal, CYP4A: citocromo P450 4a, CYP2C, citocromo P450 2C, EET: Ácido epoxi eicosatrienoico, GFR: tasa de filtración glomerular, HETE: Ácido 20-hidroxi eicosatetranoico, CCL2: quimiocina ligando 2 (también conocido como MCP-1), PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, SREBP-1: elemento de unión a esteroides 1, LDL-ox: LDL oxidada.

2.5.2 Proteínas antiinflamatorias

En el organismo existen una serie de proteínas que están relacionadas con protección celular, tal como PPAR γ (receptor activado por proliferadores de

peroxisomas γ) el cual regula la respuesta inflamatoria, especialmente en macrófagos. Se expresa principalmente en el tejido adiposo pero también se expresa en otros tejidos como hígado, músculo esquelético y riñón. Se han propuesto dos mecanismos moleculares diferentes por los cuales PPAR γ lleva a cabo sus acciones anti-inflamatorias. El primer mecanismo explica que PPAR γ interfiere con el factor de transcripción NF-kB. El segundo mecanismo propone que PPAR γ actúa a nivel de regiones promotoras de genes responsables de la inflamación, inhibiendo su transcripción y manteniendo estos genes en un estado suprimido (Stienstra y col., 2007). Por lo tanto, mientras TNF- α activa a NF-kB en la célula (Ruan y col., 2003), la expresión de PPAR γ inhibe la activación de NF-kB lo cual revierte el efecto de la citocina proinflamatoria TNF- α . Este mecanismo controla el estado inflamatorio, previniendo así el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones.

La adiponectina es otra proteína antiinflamatoria, la cual es secretada exclusivamente por adipocitos. Niveles bajos de adiponectina están relacionados con alta prevalencia de diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis y estas anomalías se han revertido con tratamiento de adiponectina (Sharma y col., 2008). Además, actúa como un factor antiaterogénico y podría ser útil en la prevención del desarrollo de la evolución de la enfermedad vascular aterosclerótica (Iwashima y col., 2006).

2.6 Nefropatía diabética y estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente la nefropatía está relacionada con una mayor producción de radicales libres o una disminución de las defensas antioxidantes (Maritim y col., 2003).

Las especies reactivas de oxígeno se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2), que primero produce el radical superóxido (O_2^-) (generado por la reducción de un electrón de oxígeno por algunas oxidasas incluyendo NADPH oxidasa, así mismo puede ser generado por la cadena mitocondrial durante el

transporte de electrones en el curso de la fosforilación oxidativa) y el radical perhidroxilo ($\text{HO}\cdot$); posteriormente se genera el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) que si no se degrada por la catalasa o glutatión peroxidasa, en presencia de metales de transición, puede finalmente conducir a la producción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) muy reactivos (Wendel y col., 1979; Retel y col., 1993; Vilar- Rojas, 1996).

Así mismo, diversos estudios han demostrado que en la diabetes, la NADPH oxidasa es la mayor fuente de ROS, especialmente en el tejido cardíaco, tejido vascular y tejido renal (Gill y Wilcox, 2006; Forbes y col., 2008).

Los niveles excesivamente altos de radicales libres causan daño a las proteínas celulares, los lípidos de membrana y ácidos nucleicos y eventualmente la muerte celular (Maritim y col., 2003).

Daño a lípidos

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, así como la de los organelos celulares. Los ácidos grasos polinsaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrogeno de los fosfolípidos que la componen, después de esta reacción aunque el hidroxilo original se ha inactivado, se forma un radical lipídico que después de un rearrreglo molecular, puede reaccionar con el oxigeno para originar el radical peroxilo ($\text{R}\cdot\text{OO}\cdot$). Este a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras el mismo se transforma en hidroperóxido ($\text{R}\cdot\text{OOH}$) y que en presencia de varios complejos metálicos puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos al radical hidroxilo, provocando con ello un fenómeno de expansión del daño (Saran y Bors, 1990).

Debido a que los ROS tienen una vida media muy corta, son difíciles de medir directamente. En su lugar, lo que se puede medir son varios productos de los daños producidos por el estrés oxidativo, tales como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés); TBARS se forman como un subproducto de la peroxidación lipídica (Pryor, 1991). Respecto a lo anterior, también se sabe que la diabetes está asociada con un aumento significativo de TBARS (Turk y col., 2002).

Daño a proteínas y carbohidratos

En proteínas y carbohidratos, los radicales libres pueden inducir la fragmentación de cisteína, los enlaces disulfuro, enlaces peptídicos y aminoácidos aromáticos, lo que conlleva a una alteración en su estructura y su función. Así mismo, diversas reacciones de oxidación o radicales como el radical hidroxilo pueden convertir algunos residuos de aminoácidos y causarles modificaciones, algunas de las alteraciones conformacionales provocadas por radicales libres están relacionadas con la pérdida de la actividad catalítica de enzimas. La gran mayoría de los daños ocasionados por los radicales libres a estas biomoléculas pueden ser los causantes de ciertas enfermedades y sus complicaciones (Beckman y col., 1994).

2.7 Sistema de defensa antioxidante

El organismo puede sobrevivir al daño generado por altas concentraciones de radicales libres debido a que tiene un eficiente sistema de defensa antioxidante. Este sistema de defensa antioxidante está conformado por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Young y Woodside, 2001).

Dentro del sistema de defensa antioxidante endógeno existen enzimas antioxidantes con diferentes funciones en cada línea de defensa. Estas enzimas son la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (**Figura 7**). Como antioxidantes exógenos se tienen a las vitaminas A, C y E y algunos metales como

el cobre y el selenio, este último al actuar como cofactor de la enzima GPx (Willcox y col., 2004).

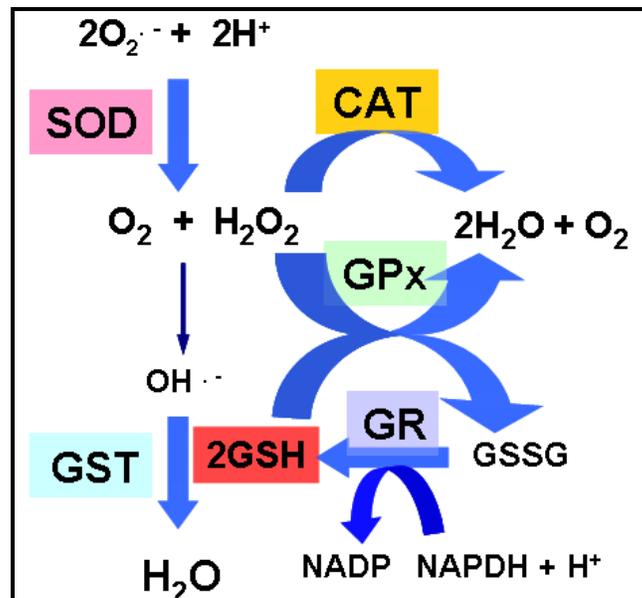


Figura 7. Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno (Modificado de Willcox y col., 2004).

SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GST: glutatión-S-transferasa, GSH: glutatión reducido, GSSH: glutatión oxidado, OH^{\cdot} : radical hidroxilo, NADP: nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato.

La enzima CAT cataliza la disociación del H_2O_2 a oxígeno molecular y agua. Esta enzima se localiza principalmente en el peroxisoma de las células, su mayor actividad se ha observado en hígado y eritrocitos aunque también se encuentra en menor concentración en otros tejidos (Young y Woodside, 2001).

La enzima SOD constituye la primera línea de defensa antioxidante y cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a H_2O_2 (Willcox y col., 2004), el cual puede ser removido por la enzima CAT y GPx. En los tejidos de mamíferos, existen tres formas de la enzima SOD y cada una de ellas se localiza en diferentes compartimentos celulares. Estos son, la Cu/Zn SOD, que se localiza en el citoplasma, la Mn-SOD, que se encuentra en la mitocondria de la mayoría de las células, y la EC-SOD (SOD extracelular) (Young y Woodside, 2001).

La enzima GPx cataliza la oxidación de glutatión a expensas del H₂O₂ u otro hidroperóxido (ROOH). La enzima GPx se localiza a nivel celular en el citoplasma y mitocondria principalmente en hígado así como en la mayoría de los tejidos (Young y Woodside, 2001). La actividad de esta enzima depende de una constante disponibilidad de glutatión reducido (GSH). La relación entre glutatión reducido y oxidado (GSSG), en condiciones normales se mantiene alta debido a la actividad de la enzima GR. Este ciclo de oxidación-reducción del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo. Por otro lado, el GSH es un cofactor de la enzima GST, la cual cataliza una reacción de biotransformación de fase II, para la eliminación de xenobióticos. Esta reacción de conjugación consiste en adicionar glutatión, a través de su grupo sulfhidrilo, a un xenobiótico, éste mismo glutatión es el cofactor de alta energía de esta reacción (Young y Woodside, 2001).

Dichos mecanismos de defensa antioxidante se ven severamente afectados en la diabetes, ya que disminuyen sus niveles tanto en suero como en órganos (Young y Woodside, 2001). Por lo que, el consumo de antioxidantes que sean capaces de inducir las enzimas anteriormente mencionadas puede ser una estrategia efectiva para reducir las complicaciones de la diabetes (Schultz y col., 2005).

2.8 Genómica funcional

A pesar de los recientes avances, la patogénesis de la nefropatía diabética está muy lejos de ser clara, ya que no hay marcadores precisos del desarrollo de la enfermedad y su progreso (Stanton, 2011). Por lo tanto, existe un interés actual en la identificación de moléculas de señalización que desempeñan un papel clave en el manejo de la nefropatía diabética. Esto podría lograrse con el uso de herramientas recientemente desarrolladas, como la tecnología de microarreglos, proteómica y transcriptómica. Diversas patologías, como la nefropatía diabética, muestran un patrón de expresión diferencial de genes, el cual podría ser identificado por estas técnicas (Aggarwal y Lee, 2003; O'connor y Crystal, 2006).

El estudio de este tipo de comportamiento se considera en la genómica funcional, la cual se centra en los aspectos dinámicos de los genes, como su transcripción, la traducción y las interacciones proteína-proteína, en oposición a los aspectos estáticos de la información genómica como la secuencia del ADN o su estructura. Con la genómica funcional el objetivo es avanzar en el conocimiento de las secuencias de un gen y su función, para de esta manera entender el comportamiento de los sistemas biológicos. Se trata de expandir el alcance de la investigación biológica desde el estudio de genes individuales al estudio de todos los genes de una célula al mismo tiempo en un momento determinado (Afman y Müller, 2006).

Así, diagnósticos complejos y mal delimitados como diabetes mellitus, depresión, enfermedad cardiovascular, epilepsia, entre otras, serán reemplazados por definiciones de enfermedades concretas, cada una de ellas bien caracterizada a nivel genético y molecular. Así se podrán conseguir diagnósticos más precisos, evaluaciones pronósticas más fiables y tratamientos farmacológicos más específicos (dirigidos a cada alteración molecular subyacente en cada caso) (Aggarwal y Kelvin, 2003; Kawai y col., 2007).

2.9 Estrategias para el estudio de la expresión diferencial de genes

Todas las células del organismo tienen los mismos genes que codifican para los mismos ARNs y proteínas, sin embargo, las células difieren mucho en las proteínas que expresan. Por lo tanto, deben existir mecanismos que regulen la expresión de los genes sin alterar la secuencia de los mismos, esta expresión diferencial de genes es la base de las diferencias en forma y función de las células del organismo (Alberts y col., 2008).

De acuerdo con lo anterior, el conjunto de genes que forman el genoma de cada célula, una fracción de ellos se transcribe activamente, es decir, se están expresando en unas condiciones fisiológicas concretas, mientras que otros genes permanecen apagados. Entre los genes activos transcripcionalmente se encuentran un número importante de genes de expresión ubicua, relacionados con

funciones de mantenimiento celular y que suelen expresar a niveles bastante uniformes, de modo constitutivo. Otro grupo de genes se expresan de manera específica en tiempo y espacio, siendo sus niveles de transcripción variables según el momento del desarrollo, tipo celular y condiciones fisiológicas (Alberts y col., 2008).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de las estrategias para el estudio de la expresión diferencial de genes

Técnica	Ventajas	Desventajas
Despliegue diferencial de genes (DD) Liang y Pardee, 1992	<ol style="list-style-type: none"> 1) Comparar múltiples muestras experimentales simultáneamente. 2) Identificar genes que pueden estar inducidos o reprimidos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) No es un método cuantitativo. 2) La cantidad de falsos positivos es muy grande desde 50 a 70%. 3) No detecta transcritos de baja abundancia.
Análisis de representación diferencial (RDA) Lisitsyn y col., 1993	<ol style="list-style-type: none"> 1) Elimina los fragmentos presentes en ambas condiciones. 2) Se obtienen los principales candidatos a ser diferenciales, después de algunas amplificaciones selectivas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Son necesarios varios pasos de amplificación secuencial para obtener los fragmentos diferenciales. 2) Lo que hace a la técnica muy laboriosa.
Análisis seriado de expresión génica (SAGE) (Velculescu y col., 1995).	<ol style="list-style-type: none"> 1) Identifica un gran número de transcritos. 2) Cuantifica su expresión en base a la repetición del transcrito. 3) No requiere conocimiento previo de los genes de interés. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Las secuencias obtenidas son muy cortas. 2) Proporcionan poca información para realizar comparaciones con la base de datos.
Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH) (Diatchenko y col., 1996)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Puede detectar genes con bajo nivel de expresión. 2) Permite analizar cientos o miles de clonas simultáneamente. 3) Proporciona la disminución de falsos positivos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sólo puede comparar dos poblaciones a la vez. 2) Sólo es posible un paso de sustracción, lo que resulta en un aumento de las secuencias de fondo.

El interés de analizar el conjunto de ARNm (transcriptoma) presente en la célula en un momento concreto ha llevado a desarrollar varias herramientas para el estudio de la expresión diferencial, para averiguar los genes que se expresan en mayor o menor medida en la situación experimental con respecto a una condición control (Aggarwal y Lee, 2003).

Existen diversas herramientas que permiten comparar los patrones de expresión, entre los que destacan: Despliegue Diferencial (DD) (Liang y Pardee, 1992), Análisis Seriado de Expresión Génica (SAGE) (Velculescu y col., 1995), Análisis de Representación Diferencial (RDA) (Lisitsyn y col., 1993), Hibridación Substractiva bajo condiciones de supresión (SSH) (Diatchenko y col., 1996) y microarreglos (Schena y col., 1995), entre otras, cuya base general es la comparación de ADNc derivado de ARNm (**Cuadro 2**). Cabe mencionar que la biología molecular no proporciona de forma directa la solución de un problema determinado pero si debe ser considerada como una herramienta capaz de generar posibles blancos genéticos que permitan el desarrollo de estrategias para establecer las bases para el entendimiento del proceso fisiológico.

2.9.1 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

Existen diferentes técnicas que permiten evaluar el efecto molecular de alimentos o sus componentes en la prevención y control de enfermedades, dentro de los marcadores se pueden utilizar a las proteínas, ARNm o DNA.

La técnica de SSH fue creada con el propósito de comparar poblaciones de ARNm y obtener fragmentos de genes que se expresan diferencialmente, es decir, que se expresan por una población pero no por la otra. Está basada en la supresión de genes por efecto del método de PCR (**Figura 8**), esto es, las estructuras que no se amplifican por presentar adaptadores iguales, las diferencias entre la amplificación lineal y la exponencial. Una de las ventajas que presenta es que se realiza un paso para normalizar las cantidades de fragmentos para evitar la pérdida de los transcritos que se encuentran expresados en bajo número de copias (Diatchenko y col., 1996).

En términos generales la técnica consiste en a partir del ARNm de dos condiciones que se desea comparar, sintetizar ADNc y digerir con la enzima de restricción *Rsa I* para generar los extremos romos para ligar los adaptadores a la condición problema o de interés, los que permitirá la amplificación selectiva de los genes que solo se expresen en esa condición y eliminando el resto de los transcritos. Se realizan dos pasos de hibridación, adicionando un exceso de control desnaturalizado en el segundo paso para garantizar una hibridación entre los transcritos de ambas condiciones y por último se realizan dos reacciones de PCR, en la primera se rellenan los extremos de los fragmentos para generar fragmentos con adaptadores diferentes, los cuales son la base para el segundo PCR, en donde se realiza una amplificación exponencial de estos, empleando iniciadores anidados para su posterior clonación (Diatchenko y Baylis., 1996).

La técnica de SSH presenta varias ventajas en relación a otras técnicas utilizadas para el análisis diferencial de genes: es confiable, posee una elevada sensibilidad, permite analizar cientos o miles de clonas simultáneamente y normaliza la abundancia de los ADNcs. La supresión por PCR es mediada por la gran cantidad de invertidos repetidos formando asas, las cuales no pueden ser amplificadas exponencialmente. Así mismo, no requiere separación física de las cadenas hibridadas y no hibridadas, proporciona la disminución de falsos positivos (Diatchenko y col., 1996).

A pesar de todas las ventajas que proporciona la técnica de SSH, se han realizado algunas variantes con fines de mejorar algunos modelos de estudio. Li y col. (2005) empleando las ventajas de la técnica SSH y de una técnica llamada substracción diferencial de cadena (DSC, por sus siglas en inglés) desarrollaron una técnica mejorada llamada substracción negativa de cadena (NSC, por sus siglas en inglés). En su estudio rediseñaron los adaptadores de la técnica DSC para hacer el sistema de substracción más robusto. Sin embargo, debido a que las secuencias de baja abundancia en esta técnica podrían ser degradadas durante la sustracción por nucleasa, se combinó con SSH para detectar los genes expresados diferencialmente en las células eucariotas de alta complejidad. La

técnica combinada presenta significativamente mayor sensibilidad y mejor resolución en comparación con usar sólo la técnica de SSH.

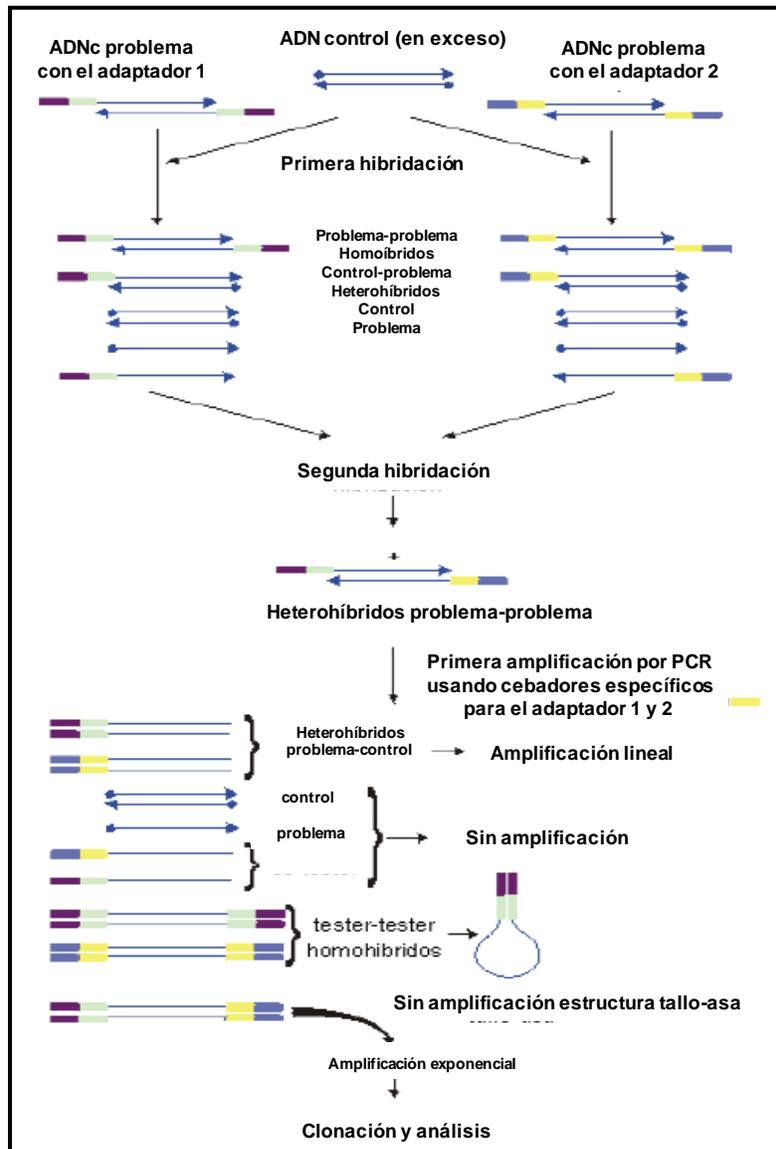


Figura 8. Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH) (adaptada de Diatchenko y col., 1996).

Así mismo, con el objetivo de identificar genes inducidos en el interior de la médula del riñón de ratas en un modelo de dieta baja en proteínas y también en un modelo de dieta baja en vitamina D, Chen y colaboradores (2010) realizaron una variación a la técnica propuesta por Diatchenko. En este estudio, ellos introdujeron dos diferentes muestras problema a la técnica de SSH cada una con

un diferente adaptador para analizar tres diferentes poblaciones a la vez, en lugar de dos poblaciones que es lo que permite la técnica de SSH, así los autores pudieron analizar la expresión de genes inducidos en ambas condiciones (dieta baja en proteína y vitamina D) al mismo tiempo y comparadas con una población control.

Por otro lado, la técnica de SSH se ha utilizado para identificar cierto número de genes en el riñón de ratones diabéticos inducidos con STZ, como Tim44 (translocasa de la membrana mitocondrial interna 44), RSOR/MIOX (óxido-reductasa/mio-inositol oxigenasa específica de riñón), UbA52, GTPasa y Rap1b, entre otros (Lin y col., 2001; Wada y col., 2011). Sin embargo, el aislamiento e identificación de nuevos biomarcadores podrían servir como blancos terapéuticos para el mejoramiento de la nefropatía diabética (Chen y col., 2010).

2.10 Control de la diabetes mellitus

Al ser la diabetes una enfermedad metabólica, ésta puede ser controlada con la dieta y ejercicio, sin embargo también existen medicamentos orales. La meta principal en el tratamiento de la diabetes es el control constante de la glucemia, de ésta forma se puede prevenir la aparición de las complicaciones de la enfermedad.

2.10.1 Dieta y diabetes mellitus

La dieta tiene un papel fundamental en la prevención y control de la diabetes. Estudios epidemiológicos han demostrado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas tienen una menor incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Wahle y col., 2004; Martínez-González y col., 2008). Por lo tanto, patrones dietarios tradicionales pueden ayudar a reducir el riesgo de obesidad y diabetes, debido a un adecuado balance de calorías y un adecuado consumo de nutrimentos. Aunque no es posible definir una dieta típica para el mexicano, si se puede hablar de algunos alimentos de consumo común en los mexicanos como son el frijol y el maíz.

2.11 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

En México, el frijol es un alimento que ha formado parte de la cultura gastronómica desde tiempos prehispánicos (Paredes López y Valverde, 2006). En los últimos años se ha demostrado que el frijol presenta beneficios a la salud, protegiendo contra ciertas enfermedades crónico-degenerativas (Serrano y Goñi, 2004).

El consumo de frijol se ha vinculado con la reducción de la diabetes y la obesidad debido a los marcados efectos sobre la glucosa sanguínea y la respuesta de la insulina. Los efectos benéficos fisiológicos por el consumo de frijol se le han atribuido principalmente a la presencia de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas) con capacidad antioxidante, fibra, lectinas, ácidos grasos insaturados, ácido fítico, polisacáridos, inhibidores de tripsina, entre otros (Adams y Standridge, 2006).

Dentro de los fenoles, se encuentran los flavonoides (quercetina, camferol), ácidos fenólicos (vainillínico y ferúlico), isoflavonas y cumestrol (Díaz-Batalla y col., 2006), debido a que dichos compuestos intervienen como antioxidantes (Cardador-Martínez, 2006).

2.11.1 Variedades de frijol con mayor consumo en México

En la **Figura 9** se muestra la producción y preferencias de frijol por variedades de acuerdo a la zona geográfica. Al analizar el consumo de frijol en México, estos son preferidos por sus características físicas, principalmente por el color, sin embargo, el nombre del tipo de frijol que el ama de casa distingue son: Negro, Peruano y Flor de mayo.

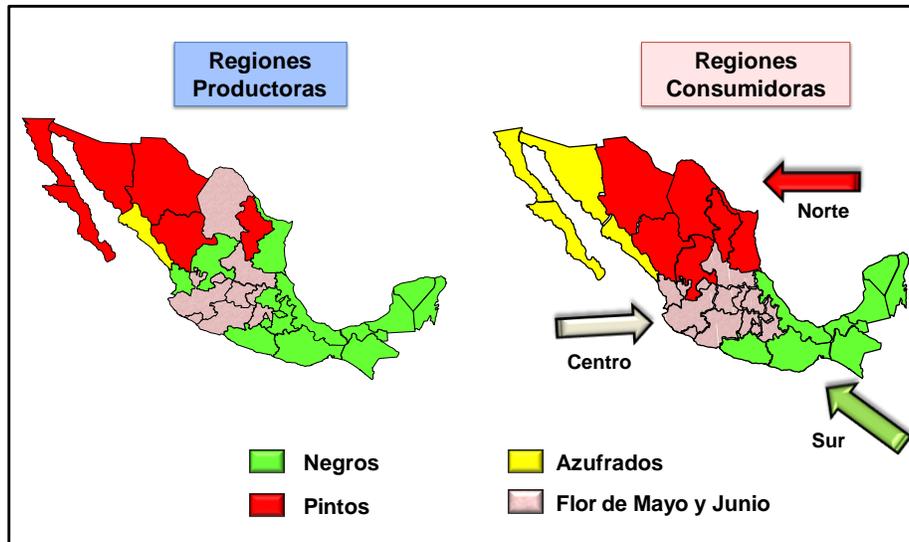


Figura 9. Producción y preferencias de frijol por variedades de acuerdo a la zona geográfica (Modificado de FIRA, boletín informativo, 2001).

La demanda de frijol en México depende de las raíces culturales y regionales, destacándose la siguiente tendencia: en el noreste, los frijoles claros, en el norte, el Frijol Pinto, en el centro, el Flor de Mayo y Flor de Junio, en el sur el Frijol Negro (Sagarpa, 2004). Así, tenemos entre los de mayor demanda a los frijoles de color negro, divididos en dos grupos: el primero incluye a los de color negro pequeño y opaco, como el Jamapa, Negro INIFAP, Negro Veracruz, Negro 8025, entre otros; y el segundo refiere a los frijoles de color negro brillante y de tamaño grande, éstos son de menor demanda, aquí se encuentran Negro Zacatecas, Negro San Luis, Negro Querétaro; en orden de importancia en el consumo le siguen “los rositas” donde se incluyen todos los Flores de mayo, Manzanos, Flor de Junio y Rosa de Castilla.

2.12 Componentes del frijol y su capacidad hipoglucémica, antioxidante y antiinflamatoria

El efecto hipoglucemiante del frijol se ha reportado en diversos estudios realizados con conejos y con ratones diabéticos (Román-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002). Así mismo, Venkateswaran y Pari (2002) reportaron que un extracto acuoso de vainas de frijol induce enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa, la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa.

En un estudio realizado con ratas diabéticas, inducidas con estreptozotocina, se demostró que el efecto hipoglucemiante del frijol cocido depende de la variedad de frijol en estudio. Ya que frijoles con mayor concentración de compuestos fenólicos reducen de manera importante (30%) los niveles de glucosa en ayuno y la concentración de triglicéridos en suero (hasta en un 70%). Por otro lado, en animales con niveles de glucosa superiores a 350 mg/dL, el frijol incorporado a la dieta no produce hipoglucemia, sin embargo disminuye parámetros relacionados con daño renal como microalbúmina y proteína en orina (**Figura 10**), además, de una disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias relacionadas con daño renal y aterosclerosis, tales como, IL-6 y TNF- α en suero (**Figura 11**). Estos resultados sugieren que el frijol disminuye los niveles de glucosa en etapas iniciales de la diabetes, mientras que en un estado más avanzado de la enfermedad produce efectos antioxidantes (Lomas y col., 2008).

Se ha demostrado que las complicaciones de la diabetes son originadas por un estado inflamatorio del organismo, producido por los altos niveles de glucosa. Aún más, el frijol es un alimento que contiene compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante y pueden ser capaces de disminuir el estado de inflamación, previniendo así el desarrollo de complicaciones que puedan llevar a la muerte del paciente diabético.

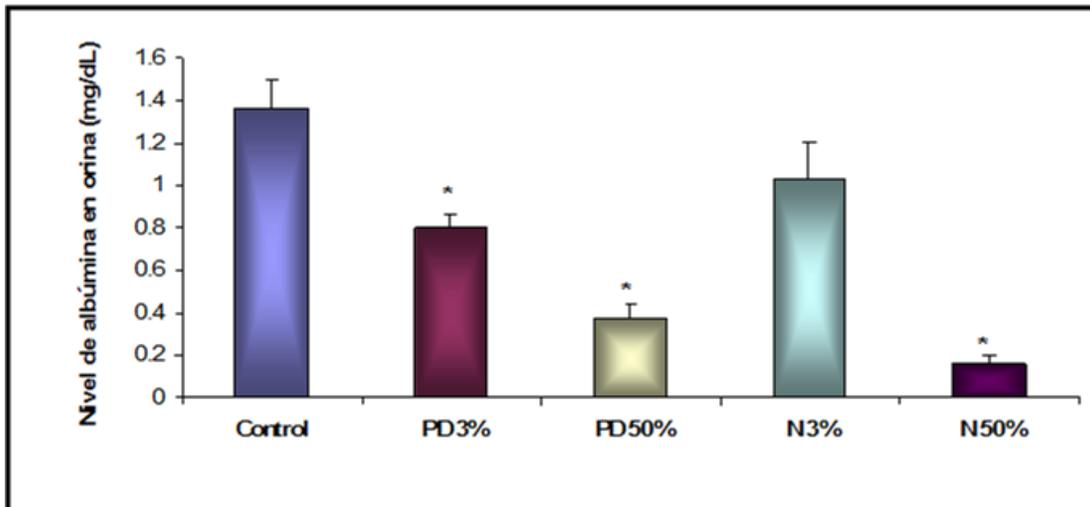


Figura 10. Efecto del frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado en la dieta (3 y 50%) sobre la concentración de albúmina en la orina de ratas Wistar diabéticas tratadas durante 3 semanas.

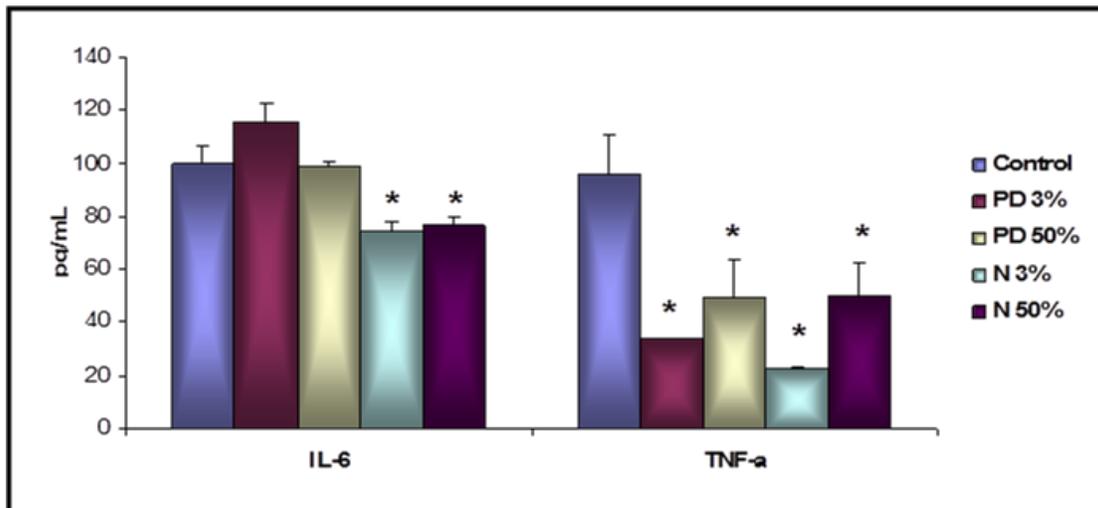


Figura 11. Efecto del frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado en la dieta (3 y 50%) sobre la concentración de IL-6 y TNF- α en suero de ratas Wistar diabéticas tratadas durante 3 semanas.

En general, el frijol contiene compuestos fenólicos que están relacionados con la disminución del estrés oxidativo y de la inflamación. Los polifenoles presentan un amplio espectro de actividades biológicas y se han propuesto como

una herramienta terapéutica para desórdenes crónicos debido a su actividad antiinflamatoria. A este respecto, se ha sugerido que los polifenoles inhiben a NF- κ B, al contrarrestar la degradación de I κ B, lo que genera una disminución de la producción de enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Además, los compuestos fenólicos activan enzimas antioxidantes de fase II, inhiben a PKC y a la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) (Santangelo y col., 2007).

Estos estudios han demostrado el efecto biológico de vainas o extractos de frijol, sin embargo estos estudios se han realizado con extractos de frijol crudo. Por otro lado, estos compuestos podrían reducirse durante el proceso de cocción y disminuir sus propiedades biológicas (Xu y Chang, 2008); sin embargo los frijoles deben ser tratados térmicamente antes de su consumo. Existe poca información acerca de los posibles mecanismos de acción a través de los cuales el frijol cocido disminuye la hipoglucemia y el estrés oxidativo relacionado con complicaciones de la enfermedad. Por lo que, en este estudio se evaluó el efecto del consumo de frijol cocido sobre las alteraciones renales en un modelo de ratas diabéticas, así mismo, se identificaron posibles transcritos relacionados con estas alteraciones.

3. JUSTIFICACIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de gran importancia, ya que para cierta población mexicana es considerado un alimento básico. Además, esta leguminosa se ha relacionado con la prevención y/o control algunas enfermedades como la diabetes, este beneficio es atribuido a sus compuestos bioactivos.

La prevalencia de diabetes se ha incrementado en los últimos años y actualmente México ocupa el noveno lugar de mortalidad por diabetes en el mundo. Es una enfermedad caracterizada por hiperglicemia crónica, que está asociada con un largo período de daño, disfunción y falla de varios órganos, que conlleva a complicaciones como la nefropatía diabética, en donde el deterioro progresivo no depende únicamente del la hiperglicemia, ya que diversos factores contribuyen en las manifestaciones de esta compleja patología como por ejemplo: el estrés oxidativo, citocinas, factores genéticos, radicales de O₂, lipoproteínas de baja densidad glicosiladas, entre otros.

Por otro lado, los desequilibrios moleculares presentes en las células, frecuentemente pueden detectarse como un aumento o disminución de los niveles de expresión de determinados genes que en consecuencia, activan o inhiben vías celulares asociadas a funciones vitales de la célula que finalmente desencadenan un daño. Algunos de los genes relacionados con la nefropatía diabética se han estudiado a profundidad. Sin embargo, se requiere ampliar la información existente mediante la identificación de nuevos genes expresados o reprimidos en el riñón de ratas diabéticas, para el estudio del patrón de expresión de genes se han desarrollado metodologías como la técnica de SSH.

Por otra parte, se ha comprobado que el consumo de frijol cocido tanto en altas como en bajas concentraciones disminuye niveles de glucosa y tiene efecto antioxidante en estudios con modelos animales. Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo molecular de protección en complicaciones de la diabetes, tal como la nefropatía diabética. Así mismo, en este estudio se evaluó el efecto de

diferentes variedades de frijol cocido sobre la regulación de genes relacionados con las alteraciones renales.

4. HIPOTESIS

Diferentes variedades de frijol cocido disminuyen el daño renal a través de una regulación diferencial de genes en ratas diabéticas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes variedades sobre genes expresados diferencialmente en riñón de ratas diabéticas.

5.2 Específicos

1. Detectar en riñón diferencias a nivel de transcriptoma entre ratas sanas y diabéticas y relacionar estos cambios con parámetros bioquímicos.
2. Evaluar el efecto de diferentes variedades de frijol común sobre el daño renal en ratas diabéticas determinado mediante parámetros bioquímicos.
3. Identificar transcritos que estén relacionados con la protección de las alteraciones renales producidas por el consumo de frijol cocido.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

- Se utilizaron las variedades de frijol Peruano, Flor de Mayo, Flor de Junio y Negro San Luis, seleccionadas en base a su preferencia de consumo en el centro del país. Así mismo, se empleó una variedad controlada: Negro 8025 proporcionada por el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) cosecha 2008 (Figura 12).



Figura 12. Variedades de frijol empleadas en el experimento

- Para el experimento se emplearon ratas Wistar macho de peso entre 250 – 300 g del bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), México.
- Para la transformación se emplearon células químicamente competentes de *Escherichia coli* marca Promega®.

6.1.2 Material químico

- Para la inducción de la diabetes mellitus se utilizó el fármaco estreptozotocina (STZ) de la marca Sigma®.
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa en sangre, marca ACCUTREND®.
- Tiras reactivas para el examen general de orina, Multistix 10SG, marca Bayer®.
- Tiras reactivas para la determinación de microalbúmina en orina, Clinitek®, marca Bayer®.
- Kits para la determinación de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL en suero, marca Randox Laboratories®.
- Kit para determinar en suero TNF- α y adiponectina, marca Invitrogen®.
- Kit para determinar en suero proteína C reactiva (PC-R), marca Millipore®.
- Kit para la determinación de urea y creatinina tanto en suero como en orina, marca Bayer®.
- Kit para la extracción de ARN de riñón, RNeasy de la marca QIAGEN®.
- Para realizar el ADNc de riñón se empleó el kit de super SMART™ PCR cDNA synthesis, marca Clontech®.
- Se empleó el kit PCR-Select™ cDNA Subtraction de Clontech® para la realización de la técnica de hibridación substractiva (SSH).
- Para la extracción y purificación de los productos del segundo PCR de la SSH, se empleó el protocolo de QIAEX II de QIAGEN®.
- Para la técnica de Northern blot se empleó el kit Biotin Chromogenic Detection, marca Fermentas®.

6.1.3 Medios de cultivo

- Medio Luria Bertani (LB) adicionado de ampicilina y kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL para la selección del plásmido.
- Medio Bacto-triptona, extracto de levadura Bacto, NaCl y glucosa (SOC) para el crecimiento de células de *E. coli*, marca Promega®.

6.1.4 Plásmido

- Plásmido pCR TOPO 4, marca Invitrogen®.

6.2 Métodos

6.2.1 Modelo experimental para construir bibliotecas sustractivas

6.2.1.1 Inducción de diabetes y protocolo experimental

Para el experimento, las ratas se sometieron a un periodo de adaptación de una semana con temperatura y humedad controlada, bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida y agua. Durante este período, los animales se alimentaron una semana con alimento Zeigler (NIH-31 Rismart S.A. de C. V.) molido. Para la inducción de la diabetes experimental, las ratas permanecieron 14 horas en ayuno y posteriormente se les inyectó una dosis única de STZ vía intraperitoneal de 50 mg/kg de peso corporal, disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1M, pH 4.5. Se cuantificó glucosa en sangre cinco días después de la inducción y se consideraron como diabéticos aquellos animales con niveles de glucosa ≥ 240 mg/dL. Las ratas del grupo control negativo (sanas) recibieron vía intraperitoneal solución salina, obteniendo así dos grupos: 1) ratas sanas y 2) control diabéticas.

6.2.1.2 Determinación de glucosa

La glucosa se cuantificó en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal de las ratas (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo

de 8 horas en estado de ayuno. Para ello se utilizó un glucómetro marca ROCHE con un rango de sensibilidad de 10 - 600 mg/dL (0.6 - 33.3 mmol/L) de glucosa con tiras reactivas de la marca Accutrend.

El glucómetro mide el poder reductor generado por la enzima glucosa deshidrogenasa, al metabolizar la glucosa a gluconolactona, indicando así la concentración de glucosa en mg/dL.

6.2.1.3 Determinaciones semanales

Cada semana se llevó a cabo un registro de los siguientes parámetros: a) glucosa en ayuno, b) peso corporal, c) consumo de alimento y d) consumo de agua, para evaluar la evolución de la enfermedad.

6.2.1.4 Sacrificio y obtención de muestras

Un día antes del sacrificio, después de cuatro semanas de experimentación, los animales se pusieron en jaulas metabólicas para la obtención de orina, para determinar parámetros bioquímicos de daño renal a través de kits comerciales (Randox Laboratories Ltd., UK). Posteriormente, las ratas se anestesiaron con éter etílico, se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca y se cortó la arteria principal para su sacrificio. El suero se separó inmediatamente de las muestras de sangre por centrifugación, se congeló y almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Finalmente, se extrajeron los riñones y se lavaron con amortiguador de fosfatos salinos frío; una parte se almacenó en solución de formaldehído para análisis histopatológico, la otra parte se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análisis.

6.2.1.5 Parámetros bioquímicos en orina

Las muestras de orina recién recolectadas, se emplearon inmediatamente para la determinación de glucosa y proteína, a través de tiras reactivas Multistix 10SG. En cuanto a la determinación de microalbúmina, se emplearon tiras reactivas de Microalbumin de la marca Bayer, las cuales se sumergieron en la

muestra de orina y, posteriormente, se realizó la lectura de todos parámetros en un analizador Clinitek. Así mismo, se determinó en orina la concentración de urea y creatinina mediante un kit de la marca Bayer. El aclaramiento de creatinina (CCr) se calculó en base a la creatinina en orina, creatinina en suero, volumen de orina y el peso corporal usando la siguiente ecuación:

$$\text{CCr (ml/min/kg of peso corporal)} = [\text{Cr en orina (mg/dL)} \times \text{volumen de orina (mL)} / \text{Cr en suero (mg/dL)}] \times [1000/\text{peso corporal (g)}] \times 1440 \text{ (min)}].$$

6.2.1.6 Parámetros bioquímicos en suero

Para la determinación de creatinina se empleó un kit de la marca Bayer; para la citocina TNF- α se empleó un kit de inmunoensayo (marca BioSource); un kit de la marca Invitrogen para determinar adiponectina y finalmente para proteína C reactiva se utilizó un kit de la marca Millipore. Para obtener la concentración de cada una de los parámetros antes mencionados se empleó una curva estándar correspondiente a cada medición.

6.2.1.7 Evaluación histopatológica del riñón

Se extrajo el riñón, se lavó con solución fisiológica estéril y posteriormente se fijó en una solución de formaldehído al 4% durante 12 horas para posteriormente sumergirlos en parafina; finalmente, se llevó a cabo una micro disección en micrótopo con cortes de 7 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E). Las secciones de riñón teñidas se observaron bajo un microscopio luz con aumentos de 200 y 400x.

6.2.2 Metodología para la realización de bibliotecas de expresión diferencial de genes

Para la realización de las bibliotecas de expresión diferencial de genes de riñón se siguió la metodología que se describe en la **Figura 13**, la cual se desglosa en los pasos que se describen en los siguientes apartados.

6.2.2.1 Extracción y purificación de ARN

Para identificar genes que se sobreexpresan o se reprimen cuando existen complicaciones de la diabetes, tal como daño renal, se empleó muestra de tejido de riñón tanto de ratas sanas como diabéticas. A dichas muestras se les realizó una extracción y purificación de RNA total por el protocolo propuesto en el manual RNeasy (Qiagen).

Con esta metodología de extracción se aislaron todas las moléculas ≥ 200 nucleótidos, con lo cual se seleccionaron los ARNm necesarios para la posterior síntesis de ADNc de cadena sencilla, ya que contienen en su extremo 3' una secuencia poli A por lo que se seleccionaron con un oligo dT y empleados como templados para dicha síntesis. Finalmente se llevó a cabo una electroforesis del producto de la extracción en gel desnaturalizante.

6.2.2.2 Síntesis de ADNc de cadena sencilla

Una vez obtenido el ARN se sintetizó inmediatamente el ADNc de cadena sencilla, de acuerdo con las instrucciones del manual SMART PCR cDNA Synthesis, así como con la enzima SUPER SCRIPT III. Este ADNc se empleó posteriormente en la técnica de SSH, empleando 1 μg de ARN de las muestras de riñón como templado, de las condiciones tanto sana como diabética.

6.2.2.3 Síntesis de ADNc de doble cadena por LD PCR

El ADNc de cadena sencilla tiene en sus extremos secuencias que sirven como sitios de reconocimiento para que el iniciador de PCR se una y se inicie con la amplificación por PCR. Por lo tanto, es necesario determinar el número óptimo de ciclos de PCR necesarios para obtener un ADNc de doble cadena que mejor represente los ARNm presentes en cada condición. Por lo anterior, se llevó a cabo un rango de ciclos de PCR de 15 a 30 ciclos, empleando el método de SMART (Clontech®).

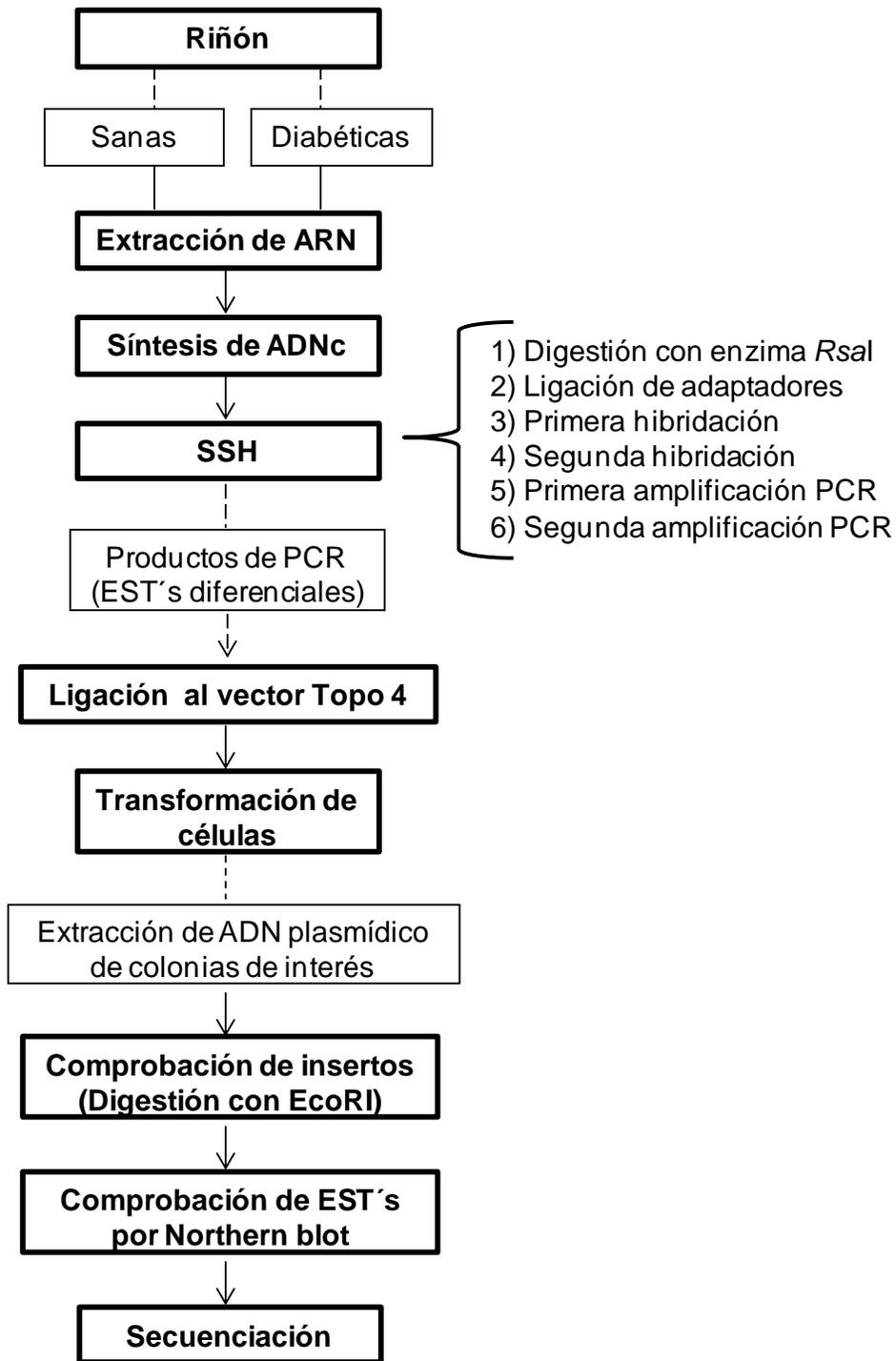


Figura 13. Estrategia general para la realización de bibliotecas de expresión diferencial de genes

6.2.2.4 Purificación del ADNc de doble cadena

Se llevó a cabo la purificación del ADNc de doble cadena mediante el método SMART de Clontech[®], para obtener un ADNc que contenga un menor número de impurezas que puedan afectar los análisis posteriores.

6.2.3 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

Después de purificar la muestra se llevó a cabo la técnica de SSH mediante el kit PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit de Clontech[®], la cual es una poderosa herramienta que permite comparar dos poblaciones de ARNm y obtener EST's que se expresan en una condición pero no en la otra. El procedimiento se realizó de la siguiente manera.

6.2.3.1 Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima *Rsa* I

La digestión del ADNc de doble cadena con la enzima *Rsa* I se llevó a cabo de acuerdo con el manual Clontech PCR-Select cDNA Subtraction, 2002. En esta parte de la técnica se generaron fragmentos de ADNc (sana y diabética) de doble cadena con extremos rasurados, los cuales son necesarios para la ligación de los adaptadores y la substracción, como se explica más adelante.

6.2.3.2 Ligación de adaptadores

La ligación de los adaptadores al ADNc de doble cadena de la condición problema (sana o diabética, según corresponda) digerido se llevó de acuerdo con el manual Clontech PCR-Select cDNA Subtraction. Cabe mencionar que los adaptadores no deben ligarse al ADNc de doble cadena de la condición control (sana o diabética, según corresponda).

Para esta parte de la técnica es necesario establecer cuál la muestra control y la muestra problema. Por ejemplo, en nuestro caso se requirió analizar tanto los genes que se sobreexpresan como los que se reprimen en ambas condiciones, de la siguiente manera: para la primera condición, los adaptadores se

ligaron al ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas sanas (problema) y el ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas diabéticas se tomó como control, obteniéndose así los genes que se sobreexpresan diferencialmente.

Para la segunda condición se realizó al contrario: los adaptadores se ligaron al ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas diabéticas (problema) y el ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas sanas se tomó como control, obteniéndose así los genes que se reprimen diferencialmente.

6.2.3.3 Primera hibridación

Para realizar el siguiente paso del procedimiento de SSH, un exceso de ADNc control se adicionó a cada alícuota de ADNc problema ligado con los diferentes adaptadores y las muestras se desnaturalizaron para permitir el posterior alineamiento de los fragmentos de genes. El ADNc de cadena sencilla restante, disponible para la segunda hibridación, se enriqueció sustancialmente dado que eran secuencias expresadas diferencialmente y no existía ADNc presente en el problema y el control con los cuales pudiera hibridar.

6.2.3.4 Segunda hibridación

Los productos de la primera hibridación se mezclaron (sin desnaturalizar) y se les adicionó un exceso de ADNc de la condición control digerido y recién desnaturalizado. Esto se realizó con el propósito de enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente, y así formar nuevas moléculas híbridas, consistiendo en secuencias expresadas diferencialmente de ADN con diferentes adaptadores en cada extremo.

6.2.3.5 Primera amplificación por PCR

Después de realizar las hibridaciones fue necesario llevar a cabo una primera reacción de PCR para poder seleccionar aquella población de moléculas que contuvieran en sus extremos los dos diferentes adaptadores.

6.2.3.6 Segunda amplificación por PCR

En este segundo PCR se realizó la amplificación exponencial de los fragmentos que estaban presentes en ambos adaptadores en sus extremos, por lo tanto, estuvieran presentes sólo en la condición problema.

6.2.3.7 Purificación de fragmentos en geles de agarosa

La extracción y purificación de los productos del segundo PCR de la SSH se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de genes de riñón se cortaron del gel empleando un bisturí. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo con el manual QIAEX II de Qiagen®, el cual se basa en la solubilización del gel de agarosa y la adsorción cuantitativa de ácidos nucleicos a las partículas de sílica-gel de QUIAEXII en la solución alta de sales.

6.2.3.8 Ligación de los insertos en el vector TApCR4 TOPO®

Los productos purificados del segundo PCR son necesarios para la construcción del banco substractivo por lo que es necesario clonar y transformar. La ligación de los insertos se realizó en el vector TOPO TApCR4 TOPO®.

6.2.3.9 Transformación de células de *E. coli* TOP 10 F' con los plásmidos TApCR4 TOPO®

Se utilizó el método de choque térmico para transformar las bacterias químicamente competentes de *E. coli* TOP 10 F' (Invitrogen). Este método consiste en abrir los poros de la membrana celular de la bacteria, con el objetivo de facilitar el paso del ADN plasmídico al interior de la bacteria. El protocolo de transformación que se utilizó para la clonación de insertos es el que se propone en TOPO TA Cloning®, Invitrogen.

6.2.4 Construcción de la biblioteca sustractiva

6.2.4.1 Selección de colonias conteniendo el inserto de interés

Después de la transformación se seleccionaron las colonias que presentaron un fenotipo color blanco (colonias con inserto) para analizarlas y corroborar que efectivamente contuvieran el inserto de interés y así poder integrarlas a la biblioteca sustractiva. El análisis se inició con la extracción de ADN plasmídico, de acuerdo con el manual Qiaprep Miniprep (Qiagen®).

6.2.4.2 Digestión con la enzima *Eco RI*

Después de que se extrajo el ADN plasmídico de colonias blancas (que contienen el vector) se realizó una digestión con la enzima *Eco RI* para comprobar cuáles clonas contenían el plásmido más el inserto de interés. Finalmente las clonas que contenían el inserto de interés se integraron a la biblioteca sustractiva y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.5 Confirmación del banco sustractivo mediante análisis tipo Northern

La comprobación de la biblioteca sustractiva se llevó a cabo mediante análisis tipo Northern a arreglos de ADNc, para identificar las clonas que contenían los fragmentos de genes diferenciales (Santos y col., 2011). Se aisló el ARNm del riñón de ratas sanas y diabéticas como se describió anteriormente en la sección **6.2.2.1** del apartado de métodos. Del ARNm aislado, se fijaron dos μg de cada clona en una membrana de nylon (HybondTM-N⁺ Amersham Bioscience, UK Limited) con ayuda de una cámara de manifold (Amersham Bioscience). Las sondas se crearon de los fragmentos previamente aislados (EST's), para lo cual se emplearon los paquetes ECF random prime labeling 5751. Para continuar con la generación de los arreglos se empleó el ADN plasmídico purificado de cada clona y se fijó a una membrana de Nylon (Hybond-N⁺ de Amersham Pharmacia Biotech), utilizando ultravioleta (UV) a las membranas (UV stratalinker 2400, stratagem Co., La Jolla, CA, USA). Después de generar el arreglo de las clonas y

marcar la sonda de las dos condiciones (sana y diabética), la membrana se hibridó, lavó y detectó con el kit Gene Images CDP-star detection module (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA) se empleó el reactivo de detección anti-fluorescein alkaline phosphatase conjugated y ECF signal amplification module 5750. Para la detección de ácidos nucleicos se empleó (Amersham life Science, Arlington Heights IL, USA), seguido de 3 h de exposición. Los controles fueron el grupo sano y diabético de cada gen evaluado proveniente del riñón. Finalmente, la señal de cada muestra en la membrana se comparó y el software NIH Image J se usó para cuantificar la intensidad de cada banda.

6.2.6 Obtención de la secuencia de algunas clonas diferenciales

Después del ensayo tipo Northern a macroarreglos se pudieron identificar algunos EST's diferenciales contenidos en el banco sustractivo, de los cuales se realizó su recuperación y extracción de ADN plasmídico para posteriormente obtener su secuencia de bases. Se empleó el Software Blast de NCBI para comparar la secuencia de los EST's obtenidos con la base de datos y así conocer su similitud con genes previamente reportados en el banco de datos.

Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica de las posibles funciones en las cuales pudieran estar implicadas las proteínas codificadas por dicha secuencia. Finalmente se realizó el registro en la base de datos de NCBI (GeneBank) de las secuencias expresadas diferencialmente.

6.2.7 Elaboración de harinas de frijol cocido

Las distintas variedades de frijol empleada se cocieron en una relación 1:1.6 p/v con agua potable a una temperatura de $96 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta obtener una cocción homogénea. Se trituraron junto con el caldo y después se secaron en un horno a 60°C por 24 h. Una vez que se obtuvo el material seco se molió en un molino pulvex para obtener las harinas de frijol cocido, las cuales se almacenaron protegidas de la luz y en refrigeración hasta su uso. A estas harinas de frijol se les determinó la concentración de fenoles y su capacidad antioxidante.

6.2.8 Extracción de compuestos fenólicos

a) Para la cuantificación de fenoles totales, flavonoides, taninos condensados y capacidad antioxidante en las harinas de frijol cocido primero se realizó una extracción de los compuestos como se describe a continuación: a un gramo de harina de frijol se le adicionó 10 mL de metanol, se protegió de la luz y se agitó durante 24 horas. El material obtenido se centrifugó a 5,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente se recuperó el sobrenadante, el cual fue empleado para realizar las determinaciones antes mencionadas.

b) Para poder realizar la cuantificación de antocianinas se realizó la siguiente extracción: a 0.5 g de harina de frijol se le adicionaron 4 mL de etanol acidificado (85 mL de etanol al 95% + 15 mL de HCl 1.0 N); se protegió de la luz, se mezcló durante 2 minutos y se ajustó el pH a 1.0 con HCl. Después se agitó durante 30 minutos y se reajustó el pH a 1.0. El material obtenido se centrifugó a 10,000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se recuperó el sobrenadante, el cual se empleó inmediatamente para su cuantificación.

6.2.9 Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

6.2.9.1 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida se absorbe a una longitud de onda de 760 nm.

Para realizar esta cuantificación, se tomó una alícuota “fresca” (40 μ L) del sobrenadante obtenido de la extracción antes mencionada (sección 6.2.2 a) y se diluyó con agua a un volumen final de 500 μ L, posteriormente se mezcló con 250

μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), después se adicionaron 1,250 μL de Na_2CO_3 (20%) y se dejó reposar en la obscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm. La concentración se calculó interpolando los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μg). Finalmente, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de harina (mg eq AG/g de harina).

6.2.9.2 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados se realizó de acuerdo al método de la vainillina-HCl, descrito por Desphande y Cheryan (1987), adaptado para el uso de microplaca (Cardador-Martínez y col., 2002). Al sobrenadante (50 μL) obtenido de la extracción (sección 6.2.2 a) se le agregaron 200 μL de la solución de vainillina recién preparada (vainillina al 1% disuelta en metanol y HCl al 8% disuelto en metanol, en una relación 1:1). El blanco se preparó adicionando 50 μL de metanol y 200 μL de HCl al 4%. Así mismo, se utilizó una curva estándar de (+) catequina con un intervalo de concentración de 0 a 0.8 mg/mL. La lectura de la absorbancia se llevó a cabo a una longitud de 500 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). Finalmente, la concentración de taninos se calculó interpolando los resultados en la curva estándar y se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina/g de harina (mg eq CA/g de harina).

6.2.9.3 Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se cuantificó por el método de Liu y colaboradores, (2002). La técnica se realizó de la siguiente manera: se tomaron 100 μL del extracto metanólico obtenido (sección 6.2.2 a) y se mezclaron con 1,250 μL de agua y 75 μL de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%, después se incubaron por 6 minutos. A esta mezcla se le adicionó 150 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10% y 500 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Finalmente, las muestras se mezclaron y el volumen se llevó hasta 2,500 μL con agua destilada. Se midió la

absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 2S, Waltham, MA). La absorbancia se comparó con una curva estándar de (+)-catequina (CA) (0 - 16 mg/mL) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina por gramo de harina (mg eq CA/g).

6.2.9.4 Cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas totales se realizó siguiendo el método descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999). Brevemente, el procedimiento se realizó de la siguiente manera: el sobrenadante obtenido de la extracción (sección 6.2.2 b) se llevó a un volumen de 10 mL usando etanol acidificado, después se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 535 nm, empleando como blanco etanol acidificado. La absorbancia obtenida se sustituyó en la fórmula que se describe abajo, expresando así los resultados como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/kg de muestra:

$$C = (A/\epsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/g \text{ de muestra}) \times 10^6$$

Donde:

C = concentración de antocianinas totales (mg/kg),

A = lectura de absorbancia a 535 nm,

ϵ = coeficiente de absorción molar cianidina 3-glucósido ($25\,965\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$),

V = volumen total del extracto de antocianinas,

PM = Peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449 g/mol),

6.2.9.5 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante en las harinas de frijol cocido se realizó siguiendo el ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) descrito por Van Der Berg y colaboradores (1999). La técnica consistió en mezclar una solución 7 mM de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-6 ácido sulfónico) y una solución 2.45 mM de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), para producir el radical ABTS^{\bullet} .

Posteriormente, la solución concentrada del radical ABTS[•] se diluyó con solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS), pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Después, se adicionaron 10 μ L de muestra en 990 μ L de la dilución antes mencionada de ABTS. Después de 6 minutos se midió la absorbancia a la misma longitud de onda (734 nm). Para la cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó una curva estándar de Trolox preparado con PBS (0-20 μ M) y los resultados se expresaron como μ M equivalentes de Trolox/g de harina.

Estudios *In vivo*

6.2.10 Evaluación del efecto del frijol sobre daño renal

Para evaluar el efecto de las diferentes variedades de frijol común de mayor consumo en el centro del país sobre el daño renal se llevó a cabo la siguiente metodología. El experimento consistió en trabajar con cuatro variedades de frijol de mayor consumo en el centro del país: Peruano, Flor de Mayo, Flor de Junio y Frijol Negro San Luis; así como también negro 8025, este frijol se emplea como control porque se ha reportado que tiene beneficios sobre daño renal.

Para llevar a cabo el experimento, las variedades de frijol antes mencionadas se incorporaron al 10% en la dieta de ratas diabéticas, esto corresponde al consumo *per cápita* rural del estado de Querétaro. Así mismo, se utilizaron un total de 56 ratas diabéticas, la cuales se dividieron en siete grupos de ocho ratas cada uno (como se describe en el **Cuadro 3**). Lo anterior con el objetivo de identificar la(s) variedad(es) de frijol(es) que ejerza(n) mayor protección sobre marcadores de daño renal. Cada semana se llevó un registro de glucosa en ayuno, peso corporal, consumo de alimento y consumo de agua. Finalmente, el sacrificio de los animales se realizó después de cuatro semanas de experimentación y se obtuvieron las muestras como se mencionó anteriormente en la sección **6.2.1.4**.

Cuadro 3. Grupos experimentales para la evaluación del efecto del consumo de frijol cocido sobre daño renal

Grupo	Animales	Dieta
1	Sanos	Alimento base molido (AB)
2	Diabéticos	Alimento base molido (AB)
3	Diabéticos	Frijol Peruano 10% + AB
4	Diabéticos	Frijol Flor de Mayo 10%+ AB
5	Diabéticos	Frijol Negro 10%+ AB
6	Diabéticos	Frijol Flor de Junio 10% + AB
7	Diabéticos	Frijol Negro 8025 10% + AB

6.2.11 Parámetros bioquímicos en suero y orina

Parámetros bioquímicos en suero

En las muestras de suero recolectadas, se evaluó el perfil de lípidos que incluye: triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL mediante kits enzimáticos de la marca Sera-Pack Plus de Bayer. También se determinó creatinina, la citocina TNF- α , adiponectina y proteína C, de acuerdo a los procedimientos previamente indicados en la sección **6.2.1.5**.

Parámetros bioquímicos en orina

Por otro lado, en las muestras de orina se determinó glucosa, proteína, albúmina, urea y creatinina. Así como también se evaluó el aclaramiento de creatinina (CCr), como se explica en la sección **6.2.1.5**.

6.2.12 Parámetros bioquímicos en riñón

6.2.12.1 Extracción de proteínas totales en riñón

Para la obtención de proteína total del riñón, el tejido se homogenizó con 500 μ L de solución amortiguadora de extracción y la mezcla se mantuvo en agitación durante 45 minutos a 4 °C. Después se centrifugó a 10,000 x g durante

30 minutos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante obtenido se colectó y a éste se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

6.2.12.2 Oxidación de proteína en riñón

Para evaluar el efecto del frijol sobre la oxidación de proteínas en riñón se utilizó la técnica para la determinación de los restos de carbonilo de proteína oxidada, descrita por Dubinina y colaboradores (1995). Este método está basado en la reacción de los restos de carbonilo de las proteínas con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH, por sus siglas en inglés), formándose así un derivado que se cuantifica midiendo la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro.

La metodología consistió en: al extracto de proteína total (sección **6.2.12.1**) se le añadieron 200 µL de DNPH 10 mM en HCl 2 M y se incubó por una hora a 37 °C. Después, se agregaron 325 µL de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) frío al 50% para la precipitación de las proteínas y se incubó a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 5,000 x *g* por 10 minutos recuperando la pastilla y continuando con cuatro lavados de 1 mL con etanol-acetato de etilo (1:1); con el fin de eliminar los excesos de DNPH que no reaccionaron con los restos carbonilo. El complejo proteína-DNPH formado se resuspendió en 1 mL de guanidina (6 M), se agitó e incubó a 37 °C por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se realizó la lectura a 562 nm en el espectrofotómetro.

A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración de restos de carbonilo empleando la ley de Lambert-Beer y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol de restos de carbonilo/mg de proteína total.

6.2.12.3 Peroxidación lipídica en la fracción post-mitocondrial (PMS) de tejido de riñón

La medición de peroxidación lipídica se evaluó mediante el método descrito por Kaur y colaboradores (2006), para lo cual se realizó una extracción previa de la fracción mitocondrial de un homogenado de riñón empleando solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) con KCl al 1.17%. Se pesaron 100 mg de tejido y se les añadió 1,200 µL de solución amortiguadora, se trituró el tejido y se sometió a centrifugación a 800 x g por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante, desechando la pastilla el cual contiene fracción nuclear; el sobrenadante se centrifugó nuevamente por 10, 500 x g por 20 minutos, para obtener la fracción post-mitocondrial (PMS) en el sobrenadante.

Posteriormente para continuar con la técnica, se parte de un volumen de reacción de 1,000 µL, el cual consiste en 850 µL de PMS y 150 µL de solución amortiguadora de fosfatos (sin KCl), después se agregó 1,000 µL de TCA (10%) y 1, 000 µL de TBA. Esta mezcla se sometió a temperatura de ebullición a baño maría por 20 minutos para formar el complejo MDA-TBA. Finalmente, se agregaron 2,500 µL de butanol y se tomó la lectura 532 nm. El análisis de resultados se llevó a cabo usando el coeficiente de extinción 1.56×10^5 M/cm.

6.2.12.4 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón

La determinación de la actividad de GST, se realizó en la fracción citosólica del riñón como se explica a continuación. Se pesaron 0.5 g de riñón, se homogenizaron con 2 mL de solución amortiguadora de tris-sacarosa en un politrón y se centrifugaron a 8,750 x g durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 100,000 x g durante 60 minutos a 4 °C. Después se recuperó el sobrenadante (citosol) y se almacenó a – 70 °C para su posterior análisis, por medio de la técnica de Habig y colaboradores (1974).

El extracto citosólico obtenido se diluyó con solución amortiguadora de fosfatos 1 M pH 6.5 (1:30). Posteriormente, se dispuso 50 µL en cada pozo de la microplaca del citosol previamente diluido, después se le adicionó 100 µL de solución amortiguadora y finalmente 150 µL de una solución de cloro-dinitro-benceno (CDNB); el producto de esta reacción se midió cada 20 segundos durante 2 minutos a 340 nm en un lector de ELISA Turnable Versamax. Se cuantificó la concentración de proteínas totales mediante el kit de proteínas BCA-Pierce, empleando una curva estándar de albúmina. La actividad enzimática se expresó como nmol/min mg proteína, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/min mg prot} = \frac{\text{abs min 2} - \text{abs min 1}}{(0.0096) (\text{mg proteína})}$$

Donde:

abs min 2= absorbancia a 340 nm en el minuto 2

abs min 1= absorbancia a 340 nm en el minuto 1

mg proteína= miligramos de proteína total en la fracción citosólica

0.0096= coeficiente de extinción de CDNB en $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

6.2.12.5 Determinación de la actividad de la catalasa (CAT) en riñón

La determinación de la actividad de CAT, también se realizó en la fracción citosólica del riñón. De acuerdo a la metodología de Aebi (1984): se prepararon soluciones de peróxido de hidrógeno para el ensayo correspondientes a las molaridades de 10 mM y 20 mM. Para esto se diluyeron 20 µL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a 1,000 µL con solución amortiguadora de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7). Para determinar la concentración de la dilución, y obtener la molaridad deseada, las muestras se leyeron a 240 nm, calculando la concentración actual de peróxido de hidrógeno con la siguiente fórmula:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\text{mM}) = \frac{A_{240}}{0.0436}$$

Después, se realizó la curva estándar preparando una serie de soluciones de peróxido de hidrogeno 10 mM: 0, 125, 250, 500 y 750 μ L llevando a un volumen final de 1, 000 μ L con solución de trabajo.

Para llevar a cabo la determinación de catalasa, se preparó una dilución 1:50 para un volumen total de 500 μ L de los homogenados citosólicos preparados previamente (la dilución se realizó en solución amortiguadora de trabajo). La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo y se le adicionó 500 μ L del peróxido de hidrógeno 20 mM. A los 3 segundos, estas se leyeron a 240 nm, después en intervalos de 5 segundos para un total de 30 segundos y 7 lecturas de cinética.

6.2.12.6 Determinación del factor glutatión reducido (GSH) en riñón

Para la cuantificación de GSH, primero se precipitaron las proteínas del extracto citosólico con TCA al 20% y se dejó reposar 30 minutos en hielo. Después se centrifugó a 8,500 x g durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para los posteriores análisis. A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 150 μ L de solución amortiguadora Tris-EDTA, después se le adicionaron 50 μ L de muestra, 80 μ L de metanol y finalmente 20 μ L DTNB, y se leyó después de cinco minutos en un lector de ELISA Turnable Versamax a 412 nm. La concentración de GSH en μ M se obtuvo extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración de GSH (0-200 μ M). Finalmente, se cuantificó la concentración proteínas totales, mediante el kit de proteínas BCA-Pierce, empleando una curva estándar de albúmina. Los resultados se expresaron como μ M/mg de proteína (Sedlak y col., 1968)

Mediante la evaluación de los parámetros antes mencionados se determinó la protección que ejerce el frijol sobre daño renal. En base a estos resultados, posteriormente se realizaron macroarreglos de los grupos tratados con los frijoles que ejercieron mayor protección contra genes expresados diferencialmente en ratas sanas y diabéticas. Sin embargo, para poder realizar estos macroarreglos, primero se generaron las bibliotecas de genes que se expresan diferencialmente

en riñón de ratas sanas y diabéticas, por lo que se describe a continuación la metodología empleada para estos objetivos.

6.2.13 Evaluación del efecto del consumo de frijol a nivel transcriptoma

Con el objetivo de identificar los genes que pudieran estar regulados por los componentes del frijol. Se construyó un macroarreglo para cada banco de genes reprimidos o sobreexpresados, el macroarreglo se generó en 7 membranas, esto para hibridarlo con el ADNc marcado (ó sonda) de cada uno de los grupos alimentados con las diferentes variedades de frijol (Peruano, Flor de Mayo, Negro, Flor de Junio y N8025), así como para la condición sana y diabética, para analizar la expresión de los 45 genes a la vez.

Para poder llevar a cabo esta parte de la metodología fue necesario extraer el ARN total del riñón de los diferentes grupos alimentados con frijol y posteriormente realizar su ADNc de cadena sencilla y de doble cadena. Este ADNc de cada condición se empleó como sonda para hibridar mediante el ensayo tipo Northern, con la metodología antes descrita en la sección **6.2.5**.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico JMP versión 5.0.1. Los datos se expresaron como la media \pm EEM. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%, además se realizó el análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Diferencias a nivel bioquímico entre ratas sanas y diabéticas

La diabetes experimental inducida en los animales se realizó mediante una inyección vía intraperitoneal de 50 mg/kg de STZ. Este fármaco provoca la destrucción parcial de las células β pancreáticas encargadas de producir y secretar insulina al organismo, por lo tanto, la diabetes presentada es similar a una diabetes tipo 1. La ausencia de insulina provoca una disminución de la incorporación de glucosa en tejidos periféricos como el adiposo y muscular, por lo que disminuye la utilización de la misma generando incrementos de la glucemia (Wilson y col., 1990).

En el **Cuadro 4** se muestra un resumen de las diferencias a nivel bioquímico evaluadas para ambos grupos, sanas y diabéticas. Estos parámetros se determinaron para poder realizar las bibliotecas de genes tanto reprimidos como sobreexpresados, ya que para poder realizar la técnica de SSH se requieren dos condiciones diferenciales.

En este experimento, las ratas diabéticas inducidas con STZ mostraron un incremento significativo de glucosa y una disminución de los niveles de insulina en suero, comparado con el grupo de ratas sanas, lo que demuestra una condición de diabetes en este grupo (**Cuadro 4**).

En cuanto a los parámetros fisiológicos después de la inducción de la diabetes, se observó una disminución del peso corporal, así como un incremento en el consumo de agua y alimento en animales diabéticos comparados con los sanos, lo cual también comprueba la presencia de diabetes en este modelo animal.

Por otro lado, en orina se midieron parámetros bioquímicos relacionados con daño renal, como la presencia de urea, albúmina y proteína. En el **Cuadro 4** se muestra que existe un incremento de estos indicadores en los animales

diabéticos comparados con los valores obtenidos en los animales sanos. También se presentó una disminución del aclaramiento de creatinina para el grupo diabético ($P \leq 0.05$). Estos resultados sugieren alteraciones en el funcionamiento renal. En etapas iniciales de la nefropatía, solamente se detecta microalbúmina en orina, mientras que en etapas más avanzadas se detecta la presencia de proteína. Esta alteración se debe a la pérdida de la capacidad de los glomérulos de las nefronas del riñón para filtrar sustancias y iones (Rhee y col., 2002).

Cuadro 4. Parámetros fisiológicos y bioquímicos de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Parámetros	Sanas	Diabéticas
Fisiológicos:		
Peso corporal (g)	379.7 ± 12.2 ^a	248.6 ± 8.3 ^b
Peso de riñones (g/100 g BW)	0.60 ± 0.01 ^b	0.90 ± 0.02 ^a
Consumo de alimento (g/rata/día)	28.5 ± 0.6 ^b	56.7 ± 1.9 ^a
Consumo de agua (mL/rata/día)	40.6 ± 3.6 ^b	385.8 ± 9.6 ^a
Volumen orina (mL/rata/día)	22.4 ± 2.9 ^b	43.6 ± 3.2 ^a
Aclaramiento de creatinina (mL/min)	1.63 ± 0.04 ^a	0.78 ± 0.03 ^b
Orina (mg/24 h):		
Glucosa	13.6 ± 2.5 ^b	196 ± 23 ^b
Albúmina	1.3 ± 0.2 ^b	2.6 ± 0.4 ^a
Proteína	4.3 ± 0.3 ^b	7.2 ± 1.2 ^a
Urea	5.1 ± 0.6 ^b	30.4 ± 3.2 ^a
Suero:		
Glucosa (mg/dL)	52.0 ± 2.0 ^b	356 ± 29.1 ^a
Insulina (μU/mL)	19.1 ± 3.4 ^a	9.9 ± 1.0 ^b
Urea (mg/dL)	23.7 ± 1.8 ^b	80.1 ± 4.9 ^a
TNF-α	6.80 ± 1.0 ^b	40.4 ± 3.8 ^a
Adiponectina	15.6 ± 2.6 ^a	1.8 ± 0.3 ^a

Los valores se presentan como la media ± E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre filas ($P \leq 0.05$).

Para confirmar esta disfunción renal, se determinaron los niveles de urea en suero, los cuales también se incrementaron, confirmando un daño renal progresivo, lo cual se considera un indicativo de una alteración de la tasa de filtración glomerular en la nefropatía diabética (O'Connor y Schelling, 2005; Yokozawa, 2008).

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Akbarzadeh y colaboradores (2007) quienes encontraron que existe un aumento en el volumen de orina (120 mL/rata), incremento en el consumo de agua (150 mL/rata) y alimento (50 g/rata), así como un aumento en los niveles de glucosa en sangre (500 mg/dL) y una disminución en los niveles de insulina (1.5 m IU/mL) en ratas Wistar inducidas con STZ, comparado con animales sanos. Además, en este experimento las ratas diabéticas mostraron un incremento en el peso de los riñones comparado con las ratas sanas ($P \leq 0.05$), y dichos resultados son consistentes con lo reportado por Yamabe y colaboradores (2006), quienes observaron un incremento en el peso de los riñones en ratas diabéticas inducidas con STZ (0.7 g/100 g de P.C.) comparado con ratas sanas (0.3 g/100 g de P.C.). Esto puede estar relacionado con una hiperplasia del riñón causada por la inflamación.

Por otro lado, la evolución del daño renal en la diabetes hacia la insuficiencia renal crónica depende del aumento del estado inflamatorio presente en la enfermedad (Awad y col., 2006). Este estado inflamatorio se determinó mediante la concentración sérica de la citocina TNF- α , la cual se incrementa en el torrente sanguíneo de pacientes diabéticos que presentan mayor riesgo de desarrollar daño renal. De forma similar, las ratas diabéticas mostraron mayores concentraciones de TNF- α comparado con las ratas sanas. Contrariamente, los animales diabéticos presentaron menores concentraciones de adiponectina, al respecto, Sharma y colaboradores (2008) encontraron que las concentraciones de adiponectina en plasma están inversamente relacionadas con la excreción de albúmina. En base a estos resultados se sugiere un estado inflamatorio en los animales diabéticos.

8.1.1 Histopatología del riñón

Además de los cambios bioquímicos en las ratas diabéticas, se llevó a cabo la evaluación de cambios morfológicos en el riñón para confirmar el desarrollo de la nefropatía diabética. Uno de los cambios morfológicos asociados a la nefropatía

diabética es la expansión mesangial debido al aumento en los depósitos presentes en la matriz mesangial, un leve aumento de la celularidad mesangial y la hipertrofia de las células mesangiales (Dalla y col., 2000).

Secciones de las cortezas del riñón de rata obtenidas de los dos grupos experimentales se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y los resultados se muestran en la **Figura 14 a y b**. Los riñones de las ratas sanas mostraron morfología normal de los glomérulos y túbulos (**Figura 14a**). Sin embargo, los riñones del grupo diabético mostraron daño glomerular y una severa destrucción de los túbulos (**Figura 14b**). Estos resultados son similares a lo reportado por Omotayo y colaboradores (2011), quienes observaron en microfotografías realizadas a muestras de riñón y teñidas con HE de ratas sanas, una estructura morfológica normal de túbulos y glomérulos, no siendo así para ratas diabéticas inducidas con STZ, las cuales presentan necrosis de los glomérulos y expansión de matriz mesangial. Se ha observado que las anomalías estructurales de la nefropatía diabética son similares en la diabetes tipo 1 y 2 y todos los compartimentos celulares (glomérulos, túbulos y la vasculatura renal) pueden verse afectados (Singh y Farrington, 2010).

Los resultados anteriormente descritos sugieren que los animales diabéticos inducidos con STZ presentan alteraciones renales a nivel estructural y funcional comparación con los animales sanos. Por lo que, una vez confirmada la condición diferencial entre ambos grupos, se procedió a evaluar la expresión diferencial de genes en ambas condiciones fisiológicas, mediante la técnica de hibridación sustractiva.

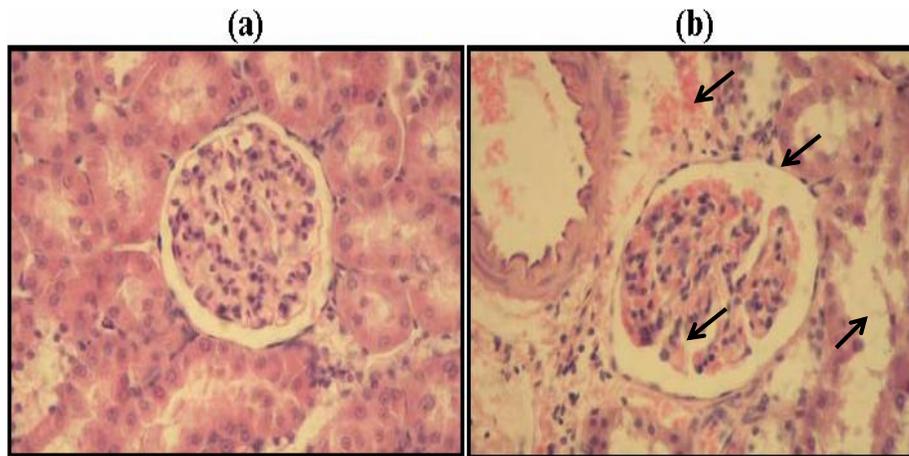


Figura 14. Análisis histopatológico de las alteraciones renales en ratas **(a)** sanas y **(b)** diabéticas. Microfotografías representativas de la corteza renal teñidas con HE aumento de 200X, flechas negras indican alteraciones en el riñón de rata diabética.

En los últimos años, se ha estudiado el perfil de expresión génica relacionado con la nefropatía diabética en diferentes modelos animales, modelos tales como la diabetes inducida por STZ en ratas y ratones, así como los modelos de roedores diabéticos espontáneos. Estos estudios han identificado genes implicados en el desarrollo y la progresión de esta enfermedad, pero los mecanismos moleculares precisos aún son poco claros y sólo un bajo número de esos genes se consideran como biomarcadores (Wada y col., 2011).

Por lo anterior, es importante la identificación de nuevos genes implicados en esta enfermedad que puedan servir como blancos moleculares para ampliar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

8.2 Elaboración de bibliotecas de expresión diferencial de genes

Para cumplir con el objetivo de detectar en el riñón diferencias a nivel de transcriptoma entre ratas sanas y diabéticas se llevó a cabo la obtención de bibliotecas de expresión de diferencial de genes para ambos grupos empleando la técnica de SSH y cuyos resultados se muestran a continuación.

8.2.1 Calidad de ARN total

Para la elaboración de las bibliotecas, se realiza primero la extracción del ARN de las muestras a analizar. La calidad del ARN obtenido de las muestras de riñón se presenta en la **Figura 15**, en donde el primer carril corresponde a la condición sana y el segundo carril corresponde a la condición diabética. En ambos casos se observa la presencia de los ARN ribosomales de manera intacta, confirmando que los ARNm se encuentran sin degradar y, por lo tanto, pueden ser empleados para la síntesis del ADN complementario (ADNc).

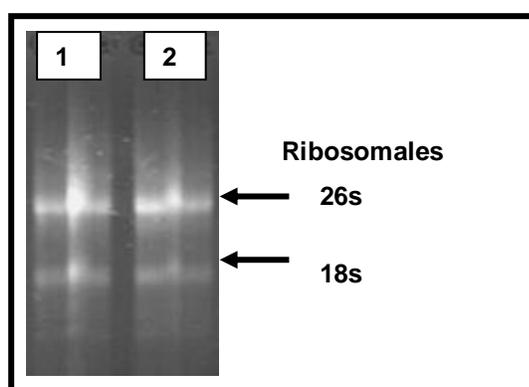


Figura 15. Gel representativo del ARN extraído de riñón de ratas (1) sanas y (2) diabéticas

8.2.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La optimización de ciclos para la amplificación de los ARNm es importante, ya que cuando el número de ciclos de PCR es mayor al óptimo (sobre-ciclado), se desechan los ADNc de menor tamaño molecular y se favorece únicamente la amplificación de los ADNc de mayor tamaño molecular.

Por otro lado, si se lleva a cabo la reacción de PCR a menor número de ciclos con respecto al óptimo (sub-ciclado), resulta un bajo rendimiento de los productos de PCR. A este respecto, 24 ciclos fue el número óptimo para ambas condiciones en este experimento, ya que observó una mejor definición de bandas y mayor representación de los mensajeros (**Figura 16**).

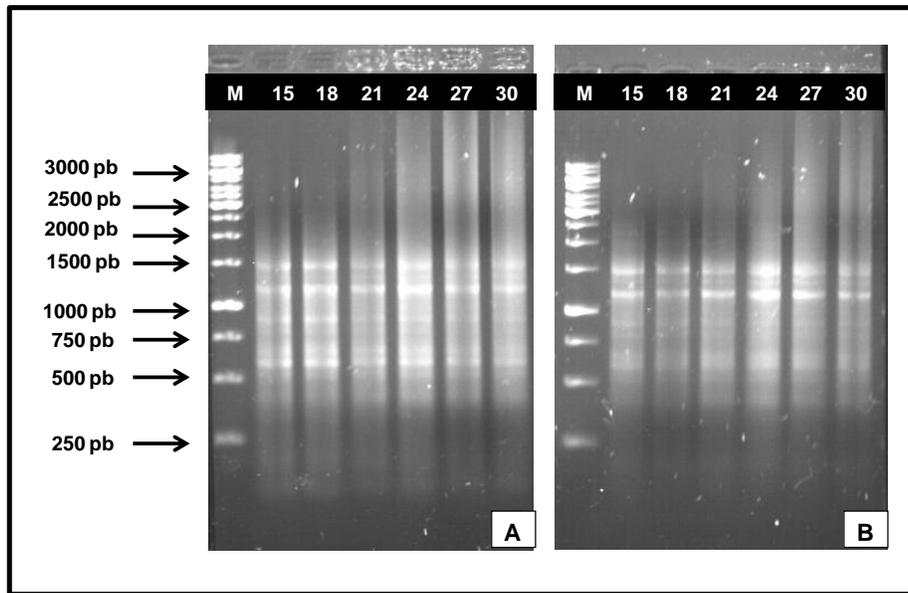


Figura 16. Gel representativo de la optimización del número de ciclos de PCR con el procedimiento SMART.

M: Marcador de tamaño molecular, **Panel A:** 15, 18, 21, 24, 27 ciclos de PCR para la condición sana, **Panel B:** 15, 18, 21, 24, 27 ciclos de PCR para la condición diabética.

8.2.3 Purificación de ADNc de doble cadena

Después de la síntesis de ADNc, se realizó la purificación de éste para eliminar los posibles residuos que pudieran contener y que llegaran a interferir en la técnica de hibridación sustractiva. De esta manera, con la purificación se obtiene un ADNc con la menor cantidad de impurezas posibles, evitando así afectar los análisis posteriores. Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta parte del experimento, se observa que en la fracción C (**Figura 17**) del panel 1 y 2, la purificación del ADNc es la adecuada para ambas condiciones, por lo que se empleó esta fracción para continuar con la técnica.

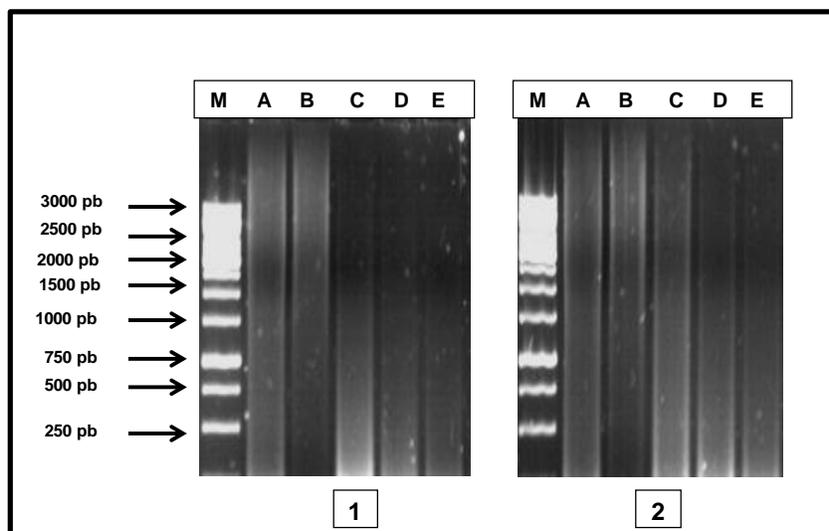


Figura 17. Gel representativo de la purificación del ADNc de doble cadena.

M: marcador de peso molecular, **Panel 1:** Purificación del ADNc de la condición sana, A (sin purificar), B, C, D y E (fracciones obtenidas de la purificación), **Panel 2:** Purificación del ADNc de la condición diabética, A (Sin purificar), B, C, D y E (fracciones obtenidas de la purificación).

8.2.4 Digestión con *Rsa* I

Empleando la enzima de restricción *Rsa* I, se realizó la digestión de las muestras de riñón de animales sanos y diabéticos, de acuerdo con el manual Clontech PCR-Select cDNA Subtraction (2002), generándose fragmentos de ADNc de doble cadena con extremos rasurados (blunt-ended), los cuales son necesarios para la ligación de los adaptadores.

La enzima *Rsa* I reconoce cuatro pares de bases, de tal manera que cada ADNc queda dividido en múltiples fragmentos, el resultado se presenta en la **Figura 18**. Los carriles 1 y 3 presentan las muestras sin digerir (sana y diabética, respectivamente), observando una mayor concentración de ADNc en la zona de mayor tamaño molecular, mientras que los carriles 2 y 4 se presentan las muestras ya digeridas (sana y diabética, respectivamente), y estas se encuentran concentradas en la zona de menor tamaño, indicando que las muestras han sido digeridas satisfactoriamente.

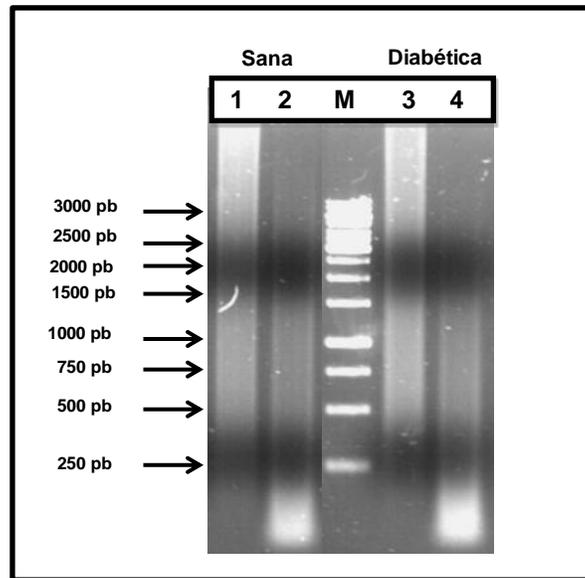


Figura 18. Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima *Rsa I*.

Carril 1: ADNc de condición sana (sin digerir), carril 2: ADNc de condición sana (digerido), carril 3: ADNc de condición diabética (sin digerir), carril 4: ADNc de condición diabética (digerido), M: Marcador de tamaño molecular,

8.2.5 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

Una vez realizada la digestión de las muestras con *Rsa I* se realizó la técnica de hibridación sustractiva, empleando el ADNc digerido con la enzima *Rsa I*, de ambas condiciones. Esta parte de la técnica es una de las más importantes debido a que se lleva a cabo la ligación de los adaptadores, los cuales sirven como anzuelo para poder identificar aquellos genes diferenciales para cada condición. Como en este experimento se evaluaron tanto los genes que se reprimen como los que se sobreexpresan en el riñón de ratas diabéticas, se realizaron por separado dos hibridaciones sustractivas, por lo tanto la ligación de los adaptadores fue diferente.

En esta parte de la técnica fue necesario establecer las muestras que se considerarán como controles y las problemas para analizar tanto los genes que se sobreexpresaron como los que se reprimieron en ambas condiciones (sana y diabética). Se procedió de la siguiente manera, para la primera condición los adaptadores se ligaron al ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas

sanas (problema) y el ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas diabéticas se tomó como control. Bajo esta condición se obtuvieron los genes que se reprimen diferencialmente en el riñón de ratas diabéticas.

Para la segunda condición se realizó al contrario; los adaptadores se ligaron al ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas diabéticas (problema) y el ADNc de doble cadena obtenido del riñón de ratas sanas se tomó como control, aquí se obtuvieron los genes que se sobreexpresan diferencialmente en el riñón de ratas diabéticas.

En la **Figura 19**, en los carriles 2 y 4 se muestran los productos de amplificación por PCR de la hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión, se puede observar un enriquecimiento de fragmentos correspondientes a 500 y 750 pb, aproximadamente, para ambas condiciones.

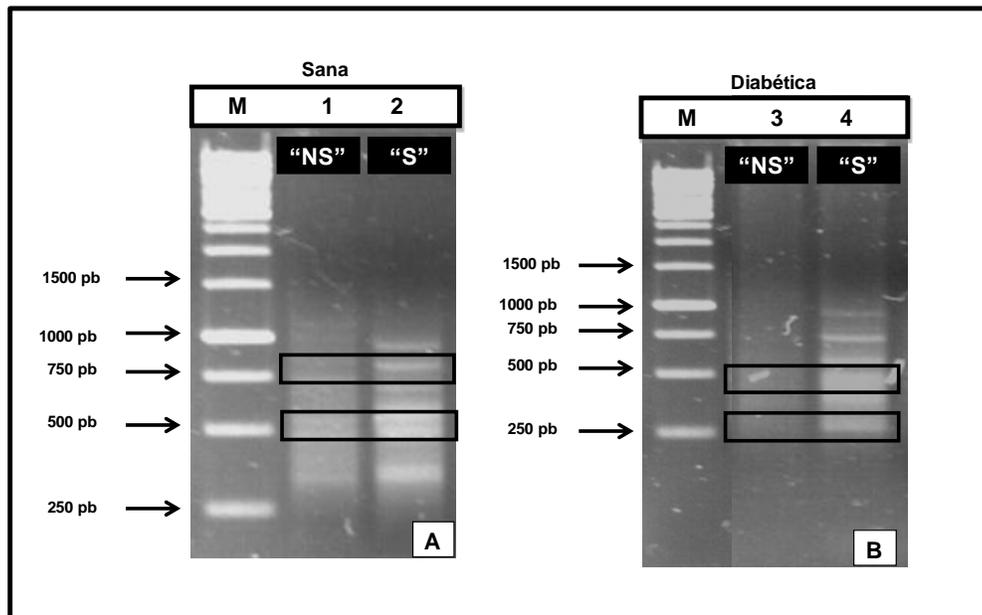


Figura 19. Segunda amplificación del producto de la hibridación sustractiva (SSH).

M: marcador de tamaño molecular, carril 1: muestra de condición sana (no sustraída), carril 2: muestra de condición sana (sustraída), carril 3: muestra de condición diabética (no sustraída), carril 4: muestra de condición diabética (sustraída), "NS": no sustraída, "S": sustraída.

Adicionalmente se puede observar en los carriles 1 y 3 el control no sustraído para cada condición. En este caso se mezclaron cantidades iguales de la muestra problema (para cada condición), de ambos adaptadores los cuales no fueron sometidos a rondas de hibridación, por lo que en este caso no hubo sustracción y se muestra una amplificación de todos los fragmentos que contenían los adaptadores, lo que es representado por el barrido mostrado en los carriles 1 y 3 de la **Figura 19**.

8.2.6 Obtención de la biblioteca sustractiva

Se seleccionaron las zonas de 500 y 750 pb para continuar con la construcción de ambas bibliotecas sustractivas de riñón de rata sana y diabética a partir de los fragmentos de ADNc expresados diferencialmente. Las bandas se cortaron del gel de agarosa y se después se extrajo el ADNc por el método QIAEX II, posteriormente se realizó una ligación con el vector pCR 4 TOPO® y posteriormente esta ligación se transformó en células químicamente competentes de *E. coli*, para clonar dichos fragmentos obtenidos.

Para la comprobación del banco se realizó la extracción del ADN plasmídico de cada una de las clonas obtenidas y posteriormente se realizaron digestiones con la enzima *Eco* RI para cada clona a evaluar. Esto debido a que el vector que se empleó para la clonación presenta sitios de corte para *Eco* RI en los extremos que rodean al sitio de clonación, lo cual permitió que se liberara el fragmento clonado en el vector (**Figura 20 y 21**).

Como se muestra en el carril 3 de la **Figura 21**, algunas de las clonas que se obtuvieron, al momento de realizar las digestiones con la enzima *Eco* RI, no presentaron fragmento. Por lo que las muestras que presentaron este tipo de comportamiento se descartaron para su posterior secuenciación, y de esta manera se conformaron las bibliotecas para cada condición. Finalmente, se obtuvo un total de 200 clonas que contenían el fragmento clonado para cada biblioteca, con

fragmentos desde 250 hasta 750pb, y estas clonas se emplearon para realizar el análisis tipo Northern blot.

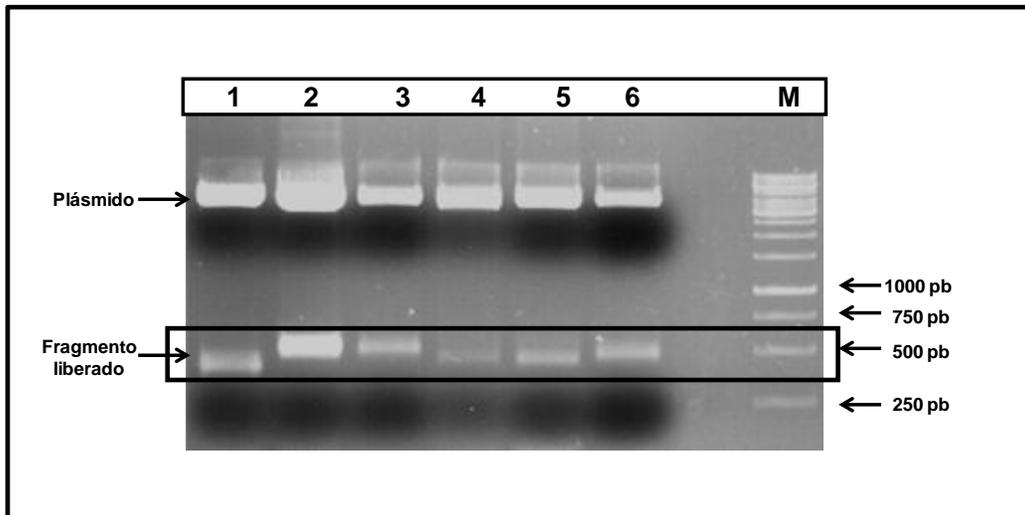


Figura 20. Confirmación de inserto para la construcción de las bibliotecas sustractivas de aproximadamente 500 pb.

M: marcador de tamaño molecular. Carriles 1-6: ADN plasmídico digerido con enzima *Eco* RI.

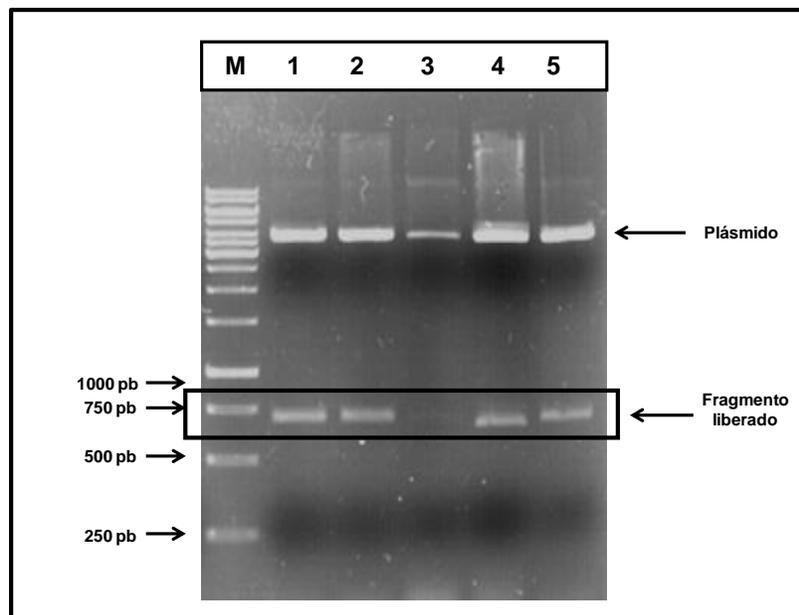


Figura 21. Confirmación de inserto para la construcción de las bibliotecas sustractivas de aproximadamente 750 pb.

MT: marcador de tamaño molecular, carriles 1-6: ADN plasmídico digerido con enzima *Eco* RI.

8.2.7 Confirmación de la biblioteca sustractiva mediante análisis Northern blot

Mediante el uso de la técnica de SSH, se obtuvieron un total de 400 EST's (200 reprimidos y 200 sobreexpresados) del riñón de ratas diabéticas. Para confirmar la expresión diferencial de los EST's obtenidos en los bancos sustractivos se realizó el análisis Northern, para lo cual se generaron 8 arreglos (8 membranas) que contenían el ADN plasmídico de las clonas seleccionadas (que contenían el inserto); esto para hibridar por separado con el ADNc marcado de ambas condiciones, sana y diabética. Sin embargo, cabe destacar que sólo se transfirieron 200 EST's a la membrana de nylon (100 de cada banco). Después de fijar las clonas en la membrana de nylon, se procedió a marcar la sonda con su respectiva comprobación mediante el ensayo rápido de marcaje (**Figura 22**).

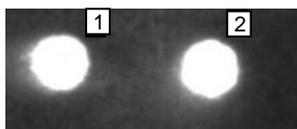


Figura 22. Comprobación del marcaje de las sondas

Carril 1: ADNc de riñón de rata sana marcado, carril 2: ADNc de riñón de rata diabética marcado.

Una vez realizada la comprobación del marcaje de las sondas se llevó a cabo la hibridación de los arreglos con las sondas, 12 h de incubación. Posteriormente, se realizó la incubación para la generación de la señal con lo que se obtuvo el patrón diferencial de las clonas. Cabe mencionar que existieron algunos escapes donde no se presentan cambios en la expresión diferencial (**Figura 23**, flechas rojas), los cuales a su vez fueron descartados para la obtención final de la biblioteca de genes.

En la hibridación de los arreglos, se puede observar las diferencias de intensidad de señal de algunas clonas (**Figura 23 A y B**, flechas azules), lo cual indica que son fragmentos de genes expresados diferencialmente, ya que se hibridó con ADNc de las condiciones sana y diabética, respectivamente.

En las membranas de la **Figura 23**, en el panel A se muestra como control positivo (CT+), el ADNc de rata sana, esto debido a que en dicha membrana se hibrida con la sonda de rata sana. En el caso del panel **B** como control positivo (CT+) se emplea el ADNc de rata diabética, ya que dicha membrana se hibrida con sonda de rata diabética, y esto nos permite descartar diferencias de intensidades en las membranas por cuestiones técnicas. Adicional a esto, se tiene agua como control negativo (CT-) en ambas membranas, en las cuales no se presenta señal. Es importante destacar la intensidad que presentan las señales de la membrana correspondiente a la sonda sana (**Figura 23, A**) en comparación con la membrana de la sonda diabética (**Figura 23, B**), ya que nos permite concluir que el banco obtenido es diferencial y corresponden al banco de genes que se reprimen en el riñón de ratas diabéticas.

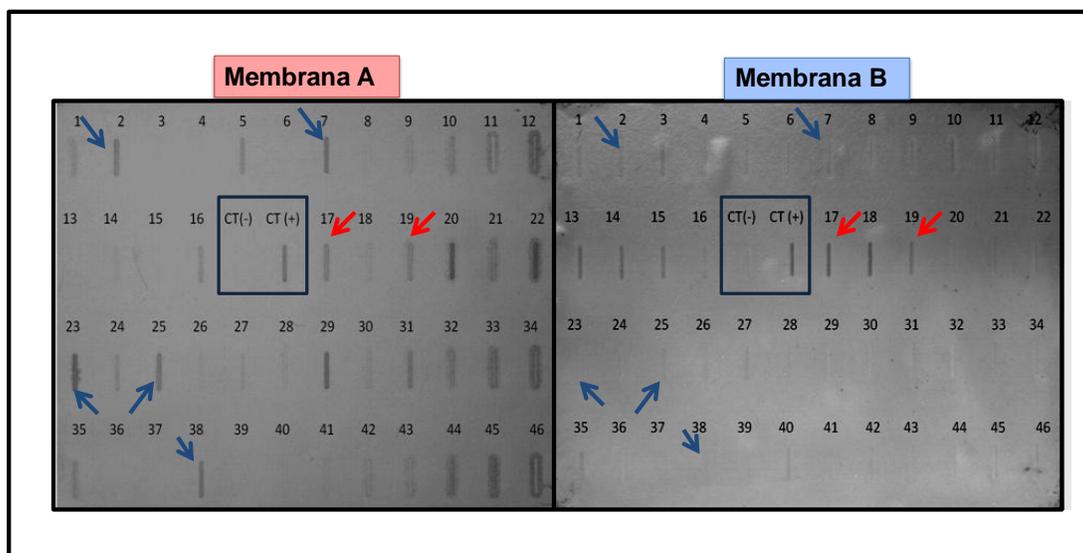


Figura 23. Análisis Northern en macroarreglo de genes reprimidos en el riñón de ratas diabéticas, empleando como sonda el ADN complementario de la condición sana (A) y condición diabética (B).

CT(-): control negativo, CT(+): control positivo, flechas azules indican clones diferenciales, flechas rojas indican clones no diferenciales.

De manera similar, se observaron diferencias de intensidad para algunas clonas, para la hibridación de los arreglos (membranas) (**Figura 24**). Esto nos indicó que son fragmentos de genes expresados diferencialmente, ya que se

hibridó contra ADNc de las condiciones sana y diabética, respectivamente, pero en este caso para el banco de genes que se sobreexpresan en el riñón de ratas diabéticas.

En las membranas de la **Figura 24A** se muestra como control positivo la muestra indicada como S (Sana), esto debido a que en dicha membrana se hibrida con la sonda de rata sana y como control positivo en la **Figura 24B**, es D (Diabética) porque en este caso se hibrida con sonda de rata Diabética, adicional a esto, se tiene un control negativo (indicado como N, en ambas membranas) en el cual no se presenta señal en ninguna de las membranas. Es importante destacar la intensidad que presentan las señales de la membrana correspondiente a la sonda sana (**Figura 24, A**), en comparación con la membrana de la sonda diabética (**Figura 24, B**). La diferencia de la intensidad de la señal entre las dos condiciones se representa con flechas rojas. Sin embargo, en esta hibridación se presentaron algunos escapes y se representa con flechas negras. Estos resultados nos confirman que estos fragmentos de genes son diferenciales.

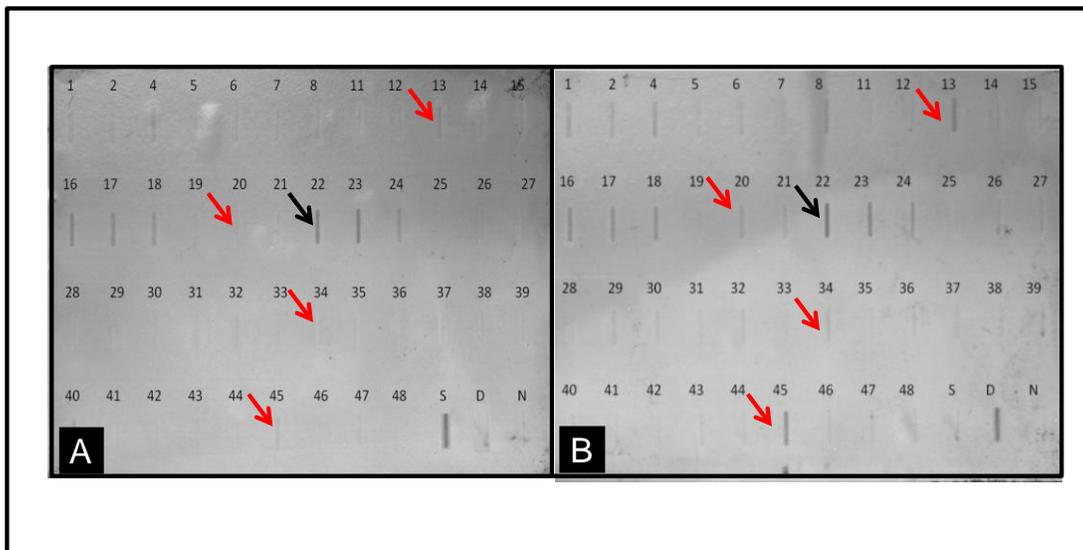


Figura 24. Análisis Northern en macroarreglo de genes sobreexpresados en el riñón de ratas diabéticas, empleando como sonda el ADN complementario de la condición sana (A) y condición diabética (B).

S: ADNc de riñón de rata sana, D: ADNc de riñón de rata diabética, N: negativo (agua), flechas rojas indican clonas diferenciales, flechas negras indican clonas no diferenciales.

8.2.8 Análisis de los EST's diferenciales obtenidos por medio del software Blast

Basados en su patrón de expresión diferencial, se seleccionaron y secuenciaron los EST's. Las secuencias de estos EST's se analizaron con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), empleado el programa para comparar secuencias Blast, esta herramienta bioinformática realiza una comparación de secuencia de nucleótidos–proteína, lo cual nos sirve para obtener información sobre que posible proteína codifica la secuencia de nucleótidos encontrada en nuestro experimento.

Los resultados obtenidos de este análisis bioinformático, así como el nivel de expresión de los genes, presentados como densidad óptica en pixeles, se muestran en el **Cuadro 5** para el banco de EST's reprimidos y en el **Cuadro 6** para el banco de EST's sobreexpresados. En base a esto, las funciones probables de la secuencia de los EST's se agruparon en: 1) genes de metabolismo, 2) transportadores y canales, 3) genes hipotéticos, 4) factores de transcripción y 5) función desconocida.

En este estudio uno de los objetivos fue identificar genes expresados diferencialmente en la nefropatía diabética. Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron 160 EST's para la secuenciación, de los cuales 72 fueron reprimidos y 88 fueron sobreexpresados (**Cuadro 5** y **6**, respectivamente). El análisis Blast reveló que al menos 80% de los genes habían sido previamente reportados en la base de datos GeneLibrary. Sin embargo, para el 20% de estos fragmentos no se encontró similitud con ningún gen reportado en el GenBank, incrementando así la posibilidad de que estos sean genes recientemente identificados.

Cuadro 5. Genes reprimidos en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ e identificados con la técnica de SSH

Función	No. accesión	Resultado del Blast	pb	Intensidad de pixeles*		Relación de pixeles (sana/diabética)
				Sana	Diabética	
(a) Genes de metabolismo						
	NM_172034	Farnesiltransferasa subunidad beta (Fntb)	281	27,721	20,581	0.742
	AA874879.1	NADH deshidrogenasa	388	36,745	22,898	0.623
	NM_017034	Treonina-proteína cinasa (PIM-1)	675	32,780	16,449	0.502
	NM_021577	Arginino succinato liasa (ASL)	626	50,836	26,273	0.517
	NM_053774.2	Peptidasa ubiquitina-específica 2 (USP2)	251	38,897	26,306	0.676
	NM_022243.1	Hidroxi-isobutirato deshidrogenasa (Hibadh)	368	29,186	27,104	0.929
	NM_022933.2	Proteína de unión al DNA helicasa 8 (Chd8)	202	24,570	23,134	0.942
	NM_031795.2	UDP glucosa ceramida glicosiltransferasa (Ugcg)	346	19,338	10,970	0.564
	AF227741.1	Proteína serina/treonina cinasa (WNK1)	423	29,186	28,304	0.870
	NM_024160.1	Citocromo b-245, alfa polipéptido (Cyba)	663	35,123	27,805	0.792
	NM_001009668.1	Flavoproteína-transportador-electrones, alfa polipéptido (Etfa)	373	48,634	39,103	0.804
	M29579.1	Glutamino-sintasa (GS)	372	50,838	32,548	0.640
	XM_221132.5	Enzima conjugación-ubiquitina E2O (Ube2o)	226	55,106	51,916	0.942
	ZP_03059795.1	Diguanilato fosfodiesterasa	445	21,489	18,178	0.846
	NP_868182.1	Malato sintasa (MS)	1209	42,640	40,458	0.949
(b) Transportadores y canales						
	NM_052983.2	Familia de transporte de solutos (transportador de yoduro) 5 (Slc5a5)	280	35,296	31,985	0.906
	NM_016996.1	Receptor sensible a calcio (CaSR)	417	50,827	34,914	0.413
	D50497.1	Canal de cloro tipo CIC (CIC-5)	242	46,627	36,657	0.786
(c) Factores de transcripción						
	NM_001191711	Caja polipéptido DEAD 20 (Ddx20)	519	24,788	19,646	0.793
	NM_013141.2	Proliferador de peroxisoma activado por receptor delta (PPARD)	580	55,119	46,929	0.631

Función	No. accesión	Resultado del Blast	pb	Intensidad de pixeles*		Relación de pixeles (sana/diabética)
				Sana	Diabética	
(d) Genes hipotéticos						
	YP_001106709.1	Gen hipotético (clona 5)	750	34,454	10,055	0.292
	YP_001452267.1	Gen hipotético (clona 11)	394	40,788	34,348	0.840
	XP_002591029.1	Gen hipotético (clona 13)	286	31,477	25,955	0.825
	YP_003336864.1	Gen hipotético (clona 19)	268	31,162	19,763	0.634
	XP_761937.1	Gen hipotético (clona 31)	480	55,117	34,845	0.632
	XP_002730322.1	Gen hipotético (clona 32)	350	55,105	30,857	0.560
	XP_001545406.1	Gen hipotético (clona 34)	464	55,018	52,901	0.962
	XP_002595396.1	Gen hipotético (clona 43)	271	47,041	42,760	0.909
(e) Función desconocida						
	---	Función desconocida (clona 1)	253	36,000	29,730	0.826
	---	Función desconocida (clona 12)	251	33,238	25,902	0.779
	---	Función desconocida (clona 17)	257	31,840	29,727	0.934
	---	Función desconocida (clona 22)	514	48,477	41,275	0.851
	---	Función desconocida (clona 26)	254	37,815	28,225	0.746
	---	Función desconocida (clona 29)	283	40,612	23,061	0.568
	---	Función desconocida (clona 40)	292	28,530	26,275	0.921
	---	Función desconocida (clona 41)	293	55,104	52,986	0.962

*Los valores son expresados en unidades arbitrarias (pixeles)

Cuadro 6. Genes sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ e identificados con la técnicas SSH

Función	No. accesión	Resultado del Blast	pb	Intensidad de pixeles*		Relación de pixeles (sana/diabética)
				Sana	Diabética	
(a) Genes de metabolismo						
	NM_001009637.1	Leucil-tRNA sintetasa (Lars)	511	41,666	45,409	1.011
	NM_001039346.1	Dedos de Zinc, tipo-DHHC 16 (Zdhhc16)	250	34,685	46,900	1.360
	NM_001159739.1	Glutación-S-transferasa (Gsta5)	237	61,974	70,099	1.133
	NM_032080.1	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta (Gsk3b)	302	76,356	87,322	1.143
	NM_001007620.1	Piruvato deshidrogenasa beta (Pdhb)	200	47,754	80,656	1.697
	NM_134417.1	Inositol polifosfato multiquinasa (IPMK)	295	42,835	62,970	1.473
	NM_001004214.1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 2 (Nqo2)	596	78,458	79,214	1.010
	NM_446292.2	Gama glutamiltranspeptidasa 1 (Ggtp1)	636	27,530	46,530	1.755
	NM_001007235.1	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1 (Itpr1)	504	40,271	44,037	1.093
	NM_012570.1	Glutamato deshidrogenasa 1 (Glud1)	327	43,980	48,526	1.103
	NM_001004252.1	Fenil alanil-tRNA sintasa, subunidad beta (Farsb)	301	78,474	79,394	1.012
	NM_017072.1	Carbamoil-fosfato sintasa subunidad 1 (Cps1)	591	40,970	56,679	1.383
(b) Transportadores y canales						
	NM_173338.1	Transportador de solutos de aniones orgánicos (Slco6c1)	414	44,060	78,092	1.777
	NM_134468.1	Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo 1 (Camk1)	256	50,328	72,116	1.226
	NM_012517.2	Canal de calcio, voltaje-dependiente, tipo L, subunidad alfa 1C (Cacna1c)	200	60,519	82,523	1.379
(c) Factores de transcripción						
	NM_001127373.1	Caja ADNP 2 (Adnp2)	380	39,535	77,797	1.967
	NM_031346.1	ROD1 regulador de diferenciación 1 (Rod1)	204	39,906	78,367	1.963
	NM_001033694.1	Proteína de unión al elemento de respuesta de los esteroides (Srebf2)	766	27,183	36,164	1.331

Función	No. accesión	Resultado del Blast	Pb	Intensidad de pixeles*		Relación de pixeles (sana/diabética)
				Sana	Diabética	
(d) Genes hipotéticas						
	XP_003143867.1	Gen hipotético (clona 7)	423	47,754	80,656	1.689
	XP_002726942.1	Gen hipotético (clona 9)	211	35,426	77,875	2.198
	XP_001070970.1	Gen hipotético (clona 14)	505	42,423	83,661	1.972
	ZP_05582793.1	Gen hipotético (clona 24)	303	38,603	47,641	1.234
	ZP_03289628.1	Gen hipotético (clona 67)	332	63,261	83,204	1.315
	XP_454853.1	Gen hipotético (clona 75)	503	38,424	80,651	2.099
	XP_001379537.1	Gen hipotético (clona 76)	212	50,434	85,632	1.698
	YP_001139960.1	Gen hipotético (clona 80)	329	20,431	41,641	2.038
(e) Función desconocida						
	---	Función desconocida (clona 4)	262	33,378	77,881	2.333
	---	Función desconocida (clona 19)	322	37,912	80,433	2.122
	---	Función desconocida (clona 71)	388	77,880	78,794	1.012
	---	Función desconocida (clona 72)	299	58,503	77,466	1.314
	---	Función desconocida (clona 73)	328	48,340	79,265	1.640
	---	Función desconocida (clona 74)	270	38,429	80,641	2.098
	---	Función desconocida (clona 77)	257	68,440	77,858	1.138
	---	Función desconocida (clona 78)	336	53,513	70,658	1.320

*Los valores son expresados en unidades arbitrarias (pixeles)

8.2.9 Función de los transcritos seleccionados de las bibliotecas de genes

8.2.9.1 Genes de metabolismo

El **Cuadro 5** (sección a) y la **Figura 25a** muestran los genes reprimidos relacionados con enzimas que participan en el metabolismo celular. La NADH deshidrogenasa, es una enzima que juega un papel fundamental en la respiración celular. Esta proteína está localizada en la membrana interna mitocondrial y cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q (CoQ) en la cadena de transporte de electrones. Esta actividad está relacionada con el mantenimiento de un gradiente de protones transmembranales empleado para producir ATP, ya que la producción de energía mitocondrial es esencial para todos los procesos celulares y la función de órganos (Hicks y Medina, 2001).

En el daño renal agudo, la falta de energía de la mitocondria y la pérdida de proteínas mitocondriales pueden conducir a un daño celular irreversible, lo que limita la restauración de la función del órgano. En cultivos primarios de células de túbulo renal proximal, la recuperación de la disfunción mitocondrial inducida por oxidación se relacionó con un incremento en la expresión de las proteínas mitocondriales NADH deshidrogenasa y ATP β -sintasa, así como la elevación de las tasas de respiración mitocondrial y los niveles de ATP (Funk y col., 2010). En el presente estudio, se encontró una represión del gen que codifica para la NADH deshidrogenasa en los animales diabéticos, lo que sugiere que la cadena de transporte de electrones podría estar disminuida en esta condición, lo que alteraría la producción de energía (ATP).

El gen que codifica para la enzima arginino succinato liasa (ASL) también se encontró reprimido en el riñón de ratas diabéticas. El riñón juega un papel importante en el metabolismo de la arginina. La síntesis de L-arginina (L-Arg) renal requiere de citrulina, sintetizada principalmente en el intestino delgado, la cual después es transportada al riñón y convertida ahí por la arginino succinato sintetasa (ASS) y la arginino succinato liasa (ASL) en L-Arg. Posteriormente, la L-

Arg es liberada a la circulación a través de la vena renal, captada por las células y utilizada en diferentes vías, incluyendo la síntesis de óxido nítrico.

Los humanos y animales con enfermedad renal muestran un incremento de citrulina en el plasma que se correlacionan con la disminución de la función renal (Ceballos y col., 1990). De hecho, la producción renal de L-Arg se ve afectada antes de que cualquier daño estructural significativo sea evidente. La caída en la producción de arginina se debe a una pérdida temprana de ASS y ASL para la conversión de citrulina, junto con una reducción en la captación de citrulina. Se ha reportado que en la enfermedad crónica renal, la cantidad de ASL se mantuvo en las semanas 1-2 después del daño, sin embargo, cuando se ajusta por la masa renal viable, existe una reducción del 60% en la cantidad total de ASL renal (Chen y Baylis, 2010). En nuestros resultados, el gen ASL se encontró disminuida en el riñón de ratas diabéticas (**Cuadro 5**, sección a, y **Figura 25a**) en comparación con la expresión en el riñón de rata sana, lo que sugiere una probable reducción en la concentración de L-Arg y, por lo tanto, esto podría contribuir a la deficiencia de óxido nítrico. La prolongada inhibición de la síntesis del óxido nítrico no sólo eleva la presión arterial sino que también produce lesión vascular renal y parenquimatosa, observándose proteinuria y esclerosis glomerular (Ribeiro y col., 1992), la hipertensión arterial y el deterioro renal puede ser corregido con la terapia antihipertensiva (Lahera y col., 1997).

La habilidad del riñón para realizar muchas de sus funciones depende de tres acciones fundamentalmente: filtración, reabsorción y secreción. Respecto a esto, los riñones mantienen los niveles normales de potasio (K^+) en suero a través de su habilidad de filtrar, reabsorber y excretar K^+ bajo la influencia de la hormona aldosterona (Mahan y Escott, 1996). Conjuntamente con el sodio (Na^+), ambos iones regulan el balance entre fluidos y electrolitos en el organismo, ya que son los principales cationes del líquido intracelular (K^+) y extracelular (Na^+) de los fluidos corporales totales del organismo (Lockless, 2007).

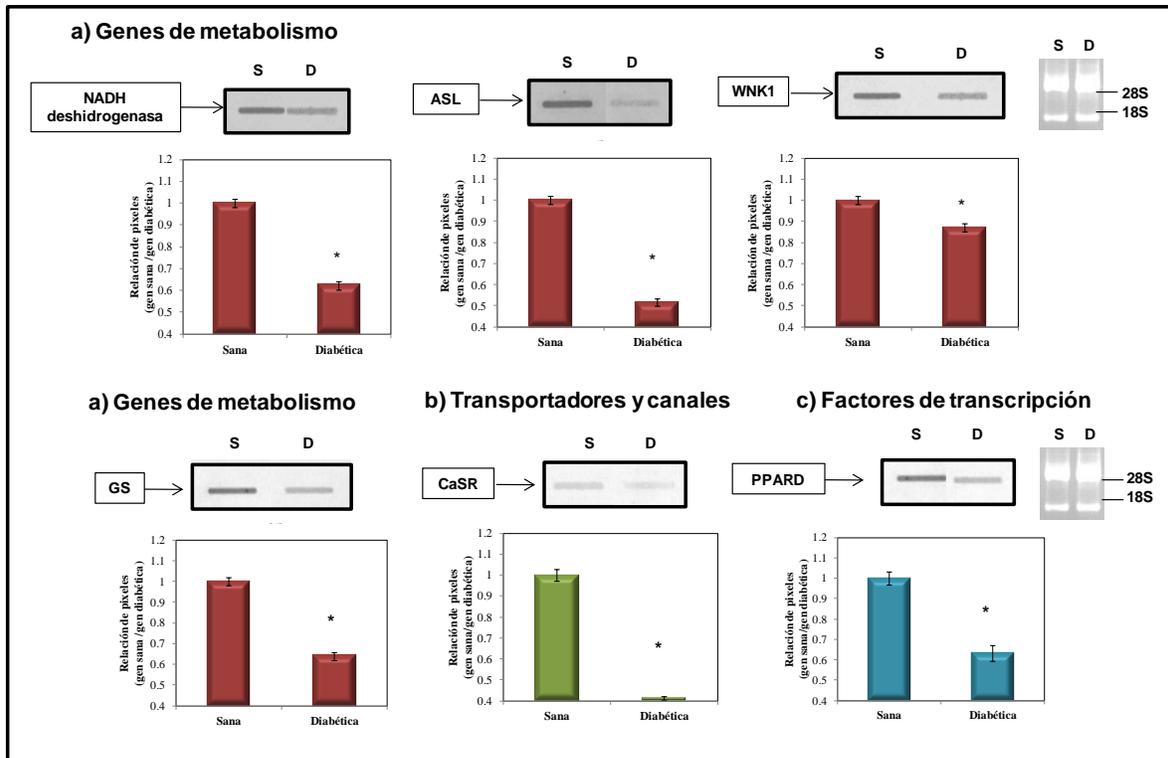


Figura 25. Análisis de Northern de genes seleccionados del banco de genes reprimidos del riñón de ratas diabéticas

ASL: arginino succinato liasa, WNK-1: no dependiente de lisina 1, GS: glutamino sintetasa, CaSR: receptor extracelular sensible al calcio, PPARD: factor de transcripción proliferador de peroxisoma activado del receptor delta, S: sana, D: diabética.

Dado que el K^+ se transporta pasivamente en respuesta a un flujo contrario al Na^+ , la orina nunca puede disminuir las concentraciones de K^+ en suero, excepto algunas veces donde se observa una excreción activa de agua. El K^+ es secretado doblemente y reabsorbido tres veces antes de que la orina alcance los túbulos colectores del riñón. Así mismo, se sabe que la deficiencia de K^+ está asociada con un incremento en la prevalencia de hipertensión; además, una excreción inadecuada de K^+ resulta en una disfunción renal.

Bajo condiciones normales, la reabsorción de Na^+ en la nefrona distal está regulada a través de un co-transportador sensible a tiazídicos NCC (Na-Cl cotransporter, por sus siglas en inglés), por un canal epitelial llamado ENaC (epithelial Na^+ channel) y otras vías. La secreción de K^+ en la nefrona distal está

mediada a través de ROMK (Renal Outer Medullary Potassium channel, por sus siglas en inglés) y por canales de K^+ . La aldosterona mejora la reabsorción de Na^+ a través de ENaC, que a su vez incrementa la diferencia de potencial transepitelial que estimula la secreción de K^+ a través de ROMK. Por lo tanto, se podría esperar que siempre que se incrementara la excreción de K^+ esto estaría acoplada a la reabsorción de Na^+ (**Figura 26**) (Chou-Long y Kuo, 2007). En el banco de genes que se reprimen se encontró un co-transportador de Na^+ que cataliza la transferencia de solutos a través de la membrana. Por lo que nuevamente, un desbalance en la absorción/excreción de electrolitos puede causar un daño en el riñón, por ejemplo se sabe que una disminución en la excreción de Na^+ en la orina es un marcador de daño a nivel tubular (Letavernier y col., 2005).

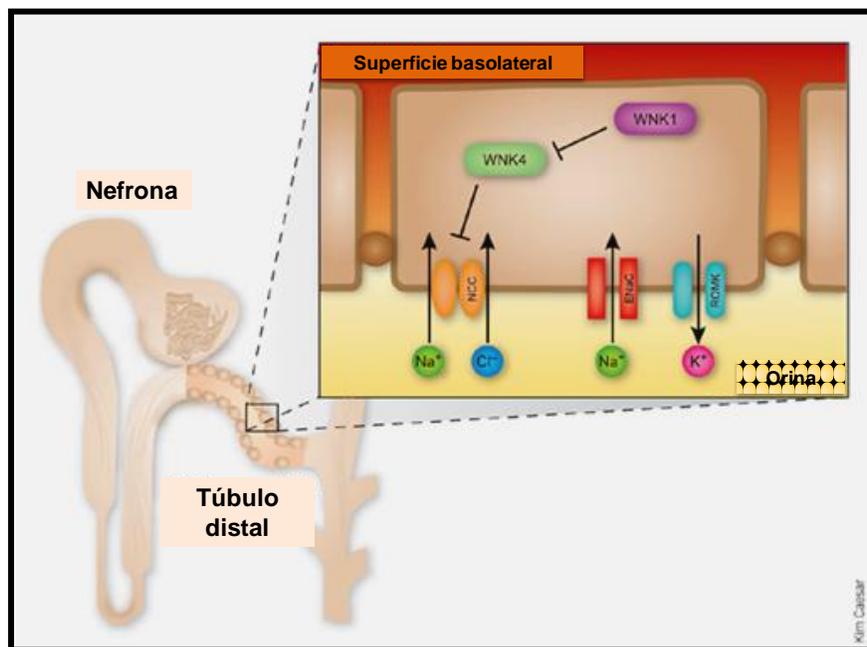


Figura 26. Regulación del transporte de sodio y potasio en la nefrona distal (Coffman, 2006).

Na^+ : sodio; Cl^- : cloro; K^+ , potasio; NCC: cotransportador de Na-Cl; ENaC, canal epitelial de Na^+ ; ROMK, Canal exterior medular de K^+ ; WNK4: (no dependiente de lisina) quinasa 4; WNK1: (no dependiente de lisina) quinasa isoforma1.

Por otro lado, existen condiciones en las que la retención de Na^+ ocurre sin la pérdida obligatoria de K^+ . Un mecanismo por el cual puede ocurrir este fenómeno es el incremento en la reabsorción de Na^+ a través de NCC. Otro mecanismo involucra la estimulación de la reabsorción de Na^+ por WNK quinasas (with no lysine kinases, por sus siglas en inglés). WNK es una nueva familia de quinasas de treonina/serina que son conservadas en organismos multicelulares y tienen un atípico acomodo del sitio catalítico de la lisina. La isoforma WNK1 está específicamente expresada en el riñón y es por lo tanto conocida como WNK1 específica de riñón (KS-WNK1). WNK1 puede mediar la retención de Na^+ y la hipertensión en deficiencia de K^+ .

Se encontró que una represión del gen WNK1 en la condición diabética (**Cuadro 5**, sección a, y **Figura 25a**). L-WNK1 (Full-length With no lisyne kinase, por sus siglas en inglés) disminuye la abundancia de la superficie celular del canal renal K^+ ROMK1 (canal de potasio de la médula renal externa 1) e induce una disminución de la secreción de K^+ por el riñón contribuyendo a la hipercalemia (exceso de potasio).

La secreción de K^+ por el riñón es fundamental para controlar los niveles séricos de K^+ y la homeostasis de K^+ en general. KS-WNK1 es importante antagonista fisiológico de L-WNK1, y la relación de L-WNK1 y KS-WNK1 regula la abundancia en la superficie renal de ROMK1 y la excreción renal de K^+ (**Figura 27**) (Zhen y col., 2009; McCormick y Ellison, 2011). Inesperadamente, el riñón diabético mostró una disminución del gen WNK1 comparado con el riñón sano, lo que permitiría la salida de K^+ , a través de la proteína transportadora ROMK, que normalmente es modulada negativamente por WNK1. Al respecto, se ha reportado que una inadecuada excreción de K^+ resulta en una disfunción renal, además se asocia con un incremento de la prevalencia de hipertensión (Wade y col., 2006; Chou-Long y Kuo, 2007).

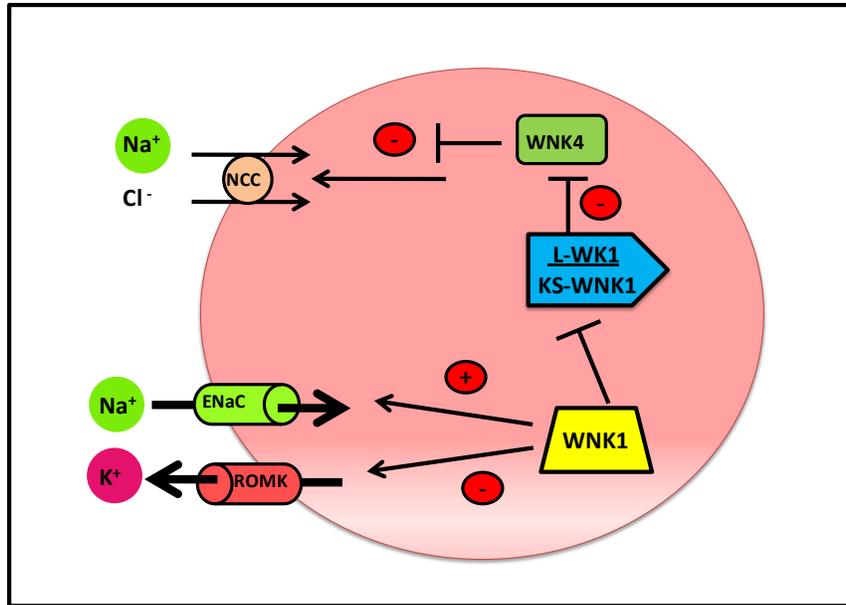


Figura 27. Papel de la isoforma WNK1 en la regulación del transporte de sodio y potasio en el riñón (Wade y col., 2006).

Na^+ : sodio; Cl^- : cloro; K^+ : potasio; NCC: co-transportador Na-Cl; ENaC: canal epitelial de Na^+ ; ROMK: canal de potasio de la corteza renal; WNK4: (no dependiente de lisina) quinasa 4; WNK1: (no dependiente de lisina) quinasa isoforma 1; KS-WNK1: (no dependiente de lisina) específica de riñón; L-WNK1: (no dependiente de lisina) de amplia longitud.

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que convierte el glutamato y amonio en glutamina. Esta enzima está presente en riñón de rata y su actividad se desempeña un papel limitante en la liberación del amoníaco generado por las células renales hacia la orina y la vena renal (**Figura 28**); por lo tanto, este gen puede estar relacionado con la disfunción renal. Como consecuencia, la síntesis de glutamina no sólo destoxifica el amoníaco, un compuesto potencialmente tóxico para el sistema nervioso, sino que también contribuye a la regulación del equilibrio sistémico ácido-base mediante la reducción de la excreción urinaria de amoníaco en forma de iones de amonio (Agnès y col., 2003). Un estudio demostró que la actividad de GS se redujo en un 40% en la corteza del riñón durante la acidosis metabólica crónica (Lemieux y col., 1976; Agnès y col., 2003). En nuestros resultados, la expresión de la GS en los riñones de ratas diabéticas se reprimió en un 40% (**Cuadro 6** sección a, y **Figura 25a**).

La acidosis metabólica es un trastorno clínico caracterizado por un descenso en el pH arterial y en la concentración de ácido carbónico (H_2CO_3) acompañado por una hiperventilación compensadora que se traduce en caída de la pCO_2 ; esta acidosis metabólica se produce de dos maneras: por la adición de ácido o por la pérdida de HCO_3^- .

La mayoría de las acidosis metabólicas son agudas; sin embargo, la insuficiencia renal y la acidosis tubular renal pueden asociarse con acidosis crónica, por lo que una disminución de la glutamato sintetasa, podría conllevar a una disfunción renal (**Figura 28**).

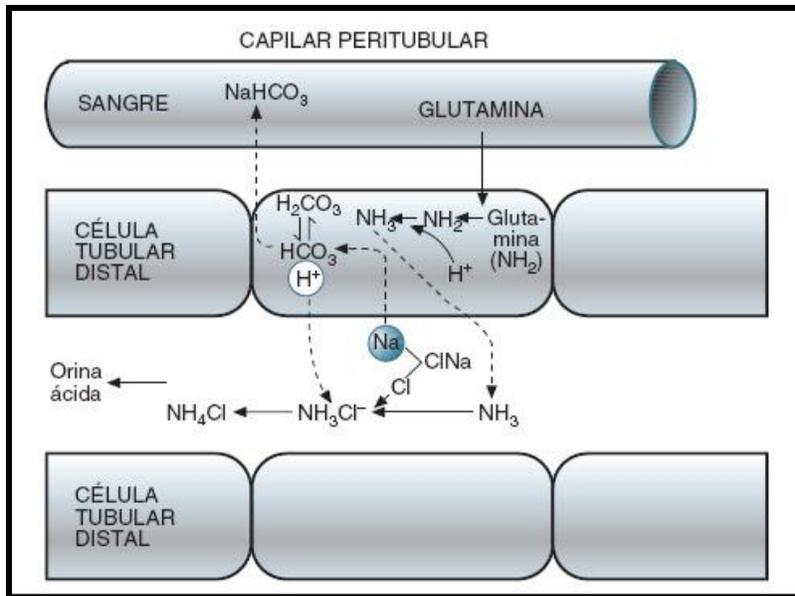


Figura 28. Representación de las reacciones de acidificación de la orina a partir de la secreción de amonio, en las células distales de la nefrona.

Na^+ : sodio, Cl^- : cloro, $ClNa$: cloruro de sodio, $NaHCO_3$: bicarbonato de sodio, H_2CO_3 : ácido carbónico, HCO_3^- : carbonato, H^+ : hidrógeno, NH_2 : grupo amino, NH_3 : amoníaco, NH_4Cl : cloruro de amonio.

Por otro lado, la inositol polifosfato multiquinasa (IPMK) es un miembro de la familia de la quinasa IP_6 de las enzimas que genera varios fosfatos de inositol. IPMK también posee la actividad de quinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K), específicamente fosforilando al (4,5)-bifosfato fosfatidilinositol (PIP_2) para generar (3,4,5)-trifosfato fosfatidilinositol (PIP_3), un segundo mensajero conocido por promover el crecimiento celular, la proliferación, la sobrevivencia y la migración. La

supresión genética de IPMK altera la señalización de Akt y disminuye el crecimiento celular, dichas consecuencias están determinadas por la actividad PI3K de IPMK (Li y col., 2004). En este experimento, la sobreexpresión del gen que codifica para IPMK (1.4) (**Cuadro 6**, sección a y **Figura 29a**) se encontró en la condición diabética, y este efecto podría estar relacionado con un aumento de la proliferación celular de macrófagos y miofibroblastos, probablemente contribuyendo a la infiltración túbulointersticial observado en la nefropatía diabética. Al respecto diversos autores han reportado que fármacos que regulen la expresión de IPMK pueden tener relevancia terapéutica influyendo en la proliferación celular. Así mismo, la supresión de IPMK y PI3K inhiben el crecimiento celular en diversas líneas celulares (Mayr y col., 2000; Maag y col., 2010).

El gen que codifica para la proteína gama glutamil transpeptidasa (GGTP1) se encontró sobreexpresado en el riñón de ratas diabéticas en comparación con el grupo control (**Cuadro 6** sección a, y **Figura 29a**). GGTP1 es una enzima principalmente localizada en el borde en cepillo de los túbulos proximales del riñón. Estudios recientes han demostrado que GGTP1 por si sola juega un marcado papel pro-oxidante bajo ciertas condiciones (Cutrín y col., 2000).

La cisteinil-glicina resultante de la ruptura mediada por la GGT de GSH reduce el hierro, lo que desencadena las reacciones de ciclo redox de hierro, lo cual estimula la producción de radicales hidroxilo y aumenta la peroxidación de lípidos de membrana que podrían contribuir en cierta medida a los cambios morfológicos de las células tubulares (Cutrín y col., 2000). En este estudio se evaluaron los niveles de TBARS en el riñón de ratas diabéticas y su contenido fue mayor (638 nmol/mg de tejido) en comparación con la de las ratas sanos (211 nmol/mg de tejido), por lo tanto, los resultados demuestran la presencia de peroxidación de lípidos en el riñón diabético.

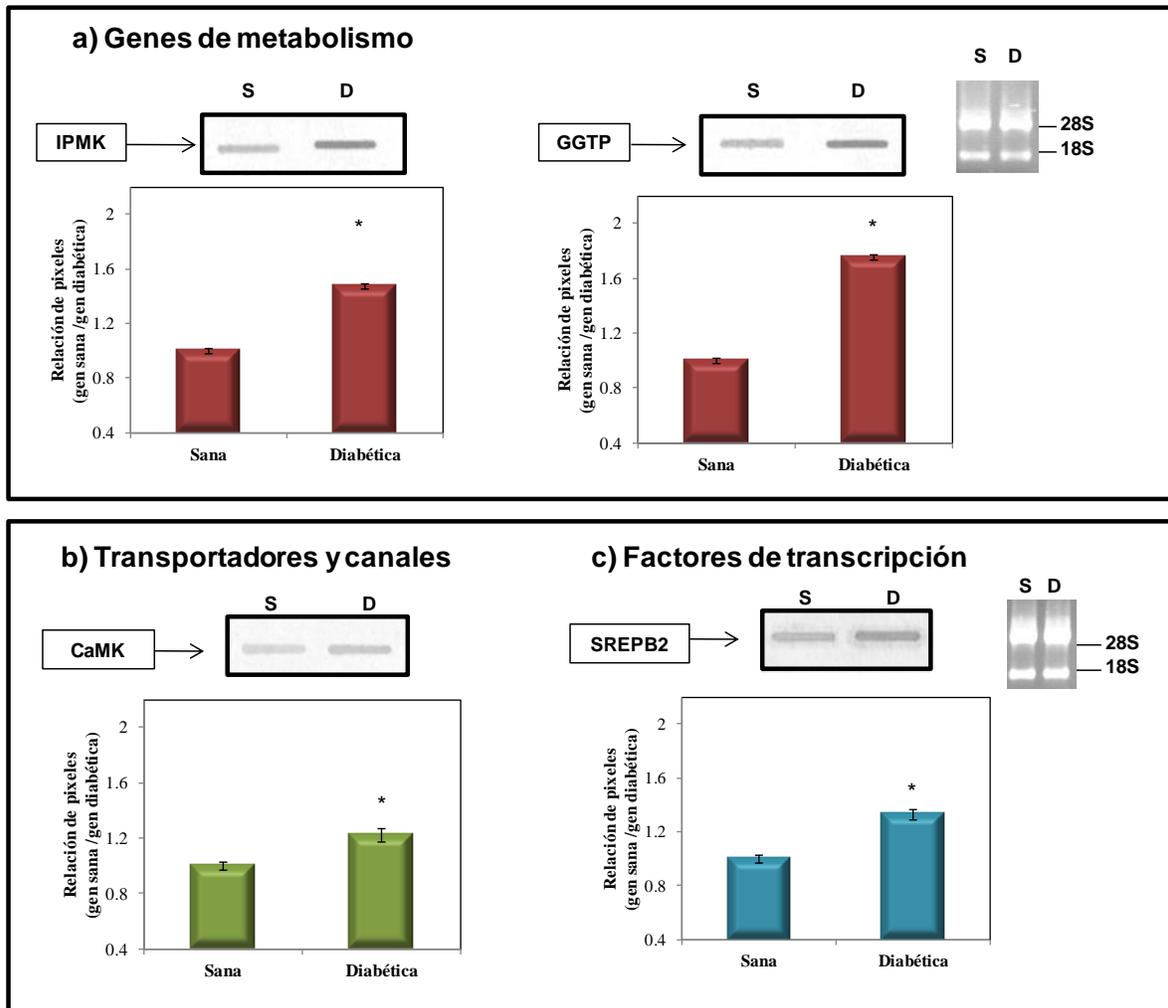


Figura 29. Análisis de Northern-blot de genes seleccionados del banco de genes sobreexpresados del riñón de ratas diabéticas

IPMK: inositol polifosfato multiquinasa, GGTP: gama glutamil transpeptidasa, CaMK: proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, SREBP2: regulador de esteroides elemento-proteína de unión-2, S: sana, D: diabética.

8.2.9.2 Transportadores y canales

En el Cuadro 6, sección b, se presenta un resumen de los genes reprimidos que codifican para transportadores y canales en el riñón en la condición diabética. El receptor extracelular sensible al calcio (CaSR) de genes se muestran en el **Cuadro 6** sección b, y **Figura 25b**. En el riñón, el CaSR tiene diferentes acciones, dando lugar a una mayor reabsorción de cloruro de sodio y el aumento de la excreción de calcio en los túbulos renales (Geibel, 2010). En un modelo de

nefrectomía en rata, los niveles de expresión de ARNm de CaSR y los niveles de proteína de CaSR se redujeron en un 35 y un 38%, respectivamente, en comparación con los observados en los animales control. Los resultados sugieren que la expresión renal de CaSR se reduce en la insuficiencia renal crónica y esto puede participar en la desregulación de iones minerales incluyendo hipocalciuria (Mathias y col., 1998). En nuestro estudio se encontró una disminución de la CaSR, por lo tanto, podría presentarse una condición de bajas concentraciones de calcio.

El gen que codifica para la proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMK) se sobreexpresa (1.2 veces) en el riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ (**Cuadro 6**, sección b, y **Figura 28b**). El nivel de calcio citosólico libre desempeña un papel crucial en muchos procesos celulares importantes, como la transcripción de genes, la proliferación, diferenciación celular y la apoptosis. Los iones calcio también son conocidos por regular varias enzimas y por interactuar con un gran número de otras proteínas vinculadas a calcio que participan en varias vías de señalización celular (Targos y col., 2005).

La CaMK es una enzima que está presente en todos los tipos celulares hasta ahora estudiados. Esta enzima es llamada así por su requerimiento de calcio unido a calmodulina para su activación y su capacidad para fosforilar y alterar la función de una variedad de sustratos. En las células mesangiales, la proteína tirosina quinasas (Src) actúan río abajo de CaMK en una vía de señalización en la que el Ca^{2+} induce al promotor de c-fos y aumenta la síntesis de DNA, lo que resulta en la hipertrofia, hiperplasia y/o expansión de la matriz mesangial (Wang y col., 2003).

8.2.9.3 Factores de transcripción

En la biblioteca de genes reprimidos, también se identificó al factor de transcripción proliferador de peroxisoma activado del receptor delta (PPAR δ o PPARD) también fue identificado (**Cuadro 6**, sección c, y **Figura 28c**). PPAR δ es un factor de transcripción ligando-activado que pertenece a la familia de

receptores hormonales nucleares y desempeña un papel importante en la sobrevivencia celular (Hao y col., 2001; Michalik y col., 2004). En comparación con PPAR α y PPAR γ , PPAR δ se expresa de forma ubicua en todos los segmentos de la nefrona en el riñón y, además, este es el isotipo predominante en el túbulo proximal (Yang y col., 1999). Debido a esta alta expresión, PPAR δ puede contribuir a la sobrevivencia de las células del túbulo proximal, en la insuficiencia renal aguda isquémica (Letavernier y col., 2005). Sin embargo, mientras más isquemia/reperfusión existe, las células epiteliales del túbulo proximal presentan muerte celular por necrosis o apoptosis, contribuyendo así en parte a la respuesta inflamatoria renal por isquemia/ reperfusión. Letavernier y colaboradores (2005) demostraron que los ligandos PPAR δ directamente podría desencadenar la inflamación en las células endoteliales. También estos autores demostraron que los ligandos de PPAR δ inhiben la expresión de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, la represión de la expresión (0.6 veces) de PPAR δ encontrado en nuestro experimento (**Figura 28c**) podría estar relacionado con la disfunción renal, ya que PPAR δ ejerce una fuerte protección contra la insuficiencia renal.

Por otro lado, también se identificaron varios factores de transcripción sobreexpresados (**Cuadro 6**, sección c, y **Figura 28c**), tales como SREBP2. SREBP2 es miembro de las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides-2 (SREBPs) que participan en la regulación de la homeostasis de los lípidos. SREBP2 es un factor de transcripción considerado como el principal regulador de la homeostasis del colesterol y un incremento en los niveles de SREBP-2 podría ser responsable de la hipercolesterolemia generalmente observada en la insuficiencia renal crónica experimental (Chmielewski, 2007). Se ha demostrado que un aumento en la expresión renal de SREBP1 y SREBP2 resulta en una acumulación excesiva de triglicéridos y colesterol en las estructuras renales, y esta acumulación de lípidos se asocia con glomeruloesclerosis y proteinuria (Szolkiewicz y col., 2007). En este estudio, SREBP2 se sobreexpresó (1.3 veces) en el riñón de ratas diabéticas en comparación con las ratas sanas (**Figura 28c**) (Tao y col., 2005).

8.2.9.4 Función desconocida

De la biblioteca de genes reprimidos, se encontraron 25 EST's con función desconocidas con una relación en la represión entre 0.413 y 0.921 veces, en comparación con las de ratas sanas. Por otro lado, 19 EST's con función desconocida se obtuvieron en la biblioteca de genes sobreexpresados, con una relación en la expresión de entre 1.3 y 2.5 veces, en comparación con los del grupo sano. Esto representa el 24.1 y el 17.2% del total de EST's provenientes del banco de genes reprimidos y sobreexpresados (**Figura 30** a y b, respectivamente).

En este estudio fue posible identificar genes como IPMK y WNK1, que han sido previamente reportados en el riñón pero no había sido asociados con el desarrollo de nefropatía diabética.

En la **Figura 30** se muestra la distribución de los genes encontrados en el banco reprimido y sobreexpresado de riñón de ratas diabéticas, basado en su probable función. Se puede observar que para los genes reprimidos y sobreexpresados cerca de un 20% del total de los genes encontrados corresponde a genes de metabolismo que codifican para enzimas involucradas en diversos procesos como óxido-reductasas, precursores de proteínas relacionadas con la síntesis de colesterol entre otras. Así mismo, un 9% para reprimidos y 3.6% para sobreexpresados corresponde a transportadores y canales en el riñón.

Así mismo, 10% para reprimidos y 6.3% para sobreexpresados corresponden a genes relacionados con factores de transcripción, que a su vez podrían activar vías relacionadas con el daño renal. Por otro lado, un 19% y 17.2% para reprimidos y sobreexpresados, respectivamente, corresponden a genes hipotéticos lo cual significa que se han relacionado con esa función pero aún no está probada. Finalmente, un 24% para reprimidos y 17% para sobreexpresados de los genes corresponde a nuevos genes, es decir, a aquellos que al analizarlos en el Blast del NCBI, al menos aún no se ha reportado alguna función conocida para esas secuencias de nucleótidos.

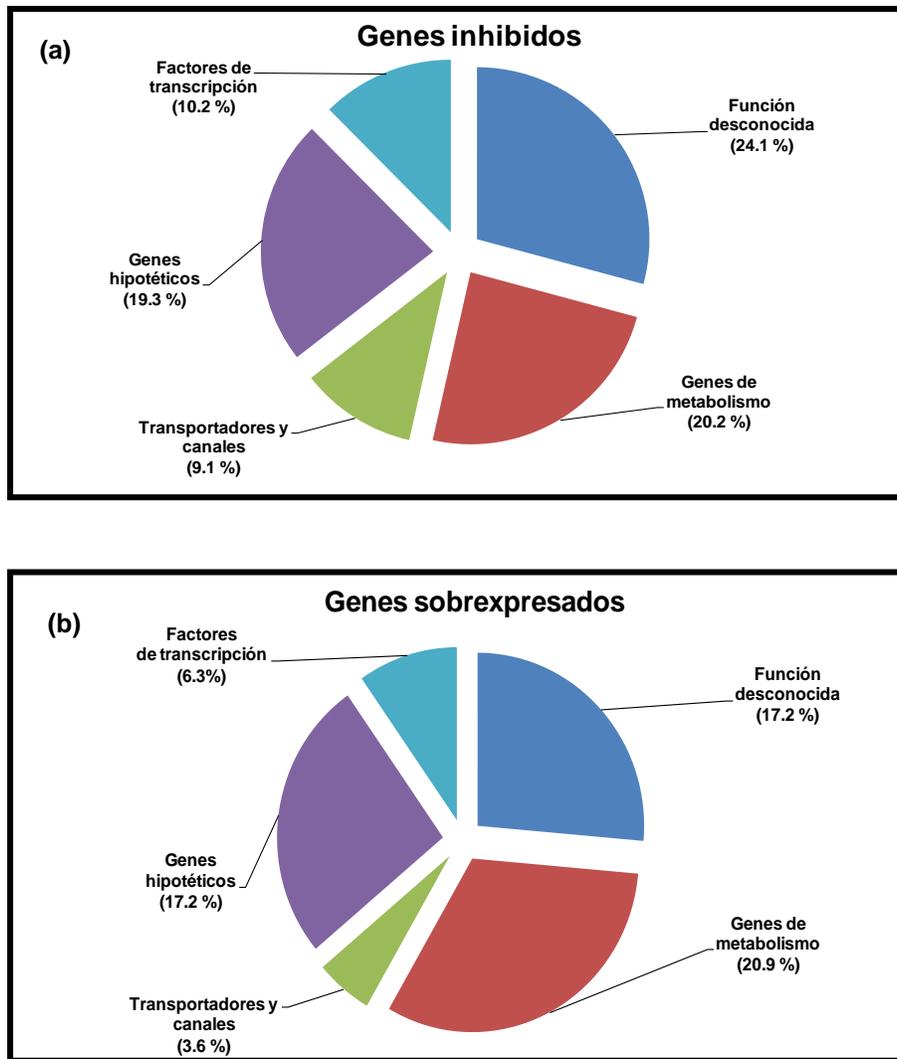


Figura 30. Distribución de las clonas secuenciadas de acuerdo a su probable función **(a)** reprimidos y **(b)** sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ.

Una vez identificados los transcritos relacionados con las alteraciones renales, se evaluó el efecto del frijol cocido sobre la protección de esta enfermedad. En la primera parte se midió la concentración de compuestos antioxidantes como los fenoles, los cuales se muestran a continuación.

8.3 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido

Las propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes del frijol se le han atribuido, principalmente, a la presencia de los microconstituyentes bioactivos y a las características fisicoquímicas del almidón resistente, inhibidores de proteasas y los compuestos fenólicos (Subramanian y Leelavinothan., 2002; Venkateswaran y col., 2002).

Respecto a los compuestos fenólicos, un gran número de éstos ya se han identificado en diferentes variedades de frijol (Guzmán y col., 1998; Díaz-Batalla y col., 2006; Aguilar y col., 2008) y se ha sugerido que sus propiedades benéficas están relacionadas a su capacidad antioxidante, además están asociados con la disminución en el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas (Tsimidou, 1998; Scalbert y col., 2005). Al respecto, se ha demostrado que los compuestos fenólicos tienen propiedades antidiabéticas ya que disminuyen los niveles de glucosa o el estrés oxidativo relacionado con esta enfermedad (Dembinska-Kiec y col., 2008). Sin embargo, todos los estudios realizados que evalúan el efecto protector del frijol se han llevado a cabo con extractos de semillas o con vainas crudas (Pari y Venkateswaran, 2003; Xu y Chang, 2007). Así mismo, la capacidad antioxidante está dada principalmente por la naturaleza de los compuestos fenólicos contenidos en el alimento (Agostini y col., 2004). Sin embargo, las diferencias respecto a la concentración y la naturaleza de estos compuestos son dependientes de las variedades de frijol y esto podría modificar sus efectos nutraceuticos.

Por otro lado, se ha reportado que el proceso de cocción disminuye el contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides tanto en frijol Pinto como en frijol Negro, y reduce drásticamente el contenido de antocianinas en el frijol negro (Aparicio-Fernández y col., 2005; Xu y Chang, 2009). Estas modificaciones también podrían afectar las propiedades antidiabéticas y antioxidantes del extracto. Por lo tanto, en este estudio se evaluaron las variedades de alto

consumo por la población Mexicana en la zona central sometidos a un proceso de cocción.

Las muestras de frijol cocido se analizaron para determinar sus diferencias en el contenido de fenoles, taninos y capacidad antioxidante (**Cuadro 7 y Figura 31**). De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras de frijol cocido con las mayores concentraciones de fenoles totales fueron las variedades N8025 y FJ (6.0-6.4 mg eq. ácido gálico/g) seguidas de FM (4.5 mg eq. ácido gálico/g) y, finalmente, el frijol P presenta las menores concentraciones de fenoles totales (0.72 mg eq. ácido gálico/g) (**Cuadro 7**). La cantidad de taninos y flavonoides fue mayor en las variedades FM, N8025 y FJ (3.29-4.46 mg eq. (+) catequina/g y 2.2-2.3 mg eq. (+) catequina/g respectivamente) comparado con P (0.72 mg eq. (+) catequina/g y 1.56 mg eq. (+) catequina/g respectivamente). Por otro lado, se cuantificó la concentración de antocianinas, encontrándose que solo las variedades de frijol N y N8025 tienen niveles detectables de antocianinas (300 ± 20 y 152 ± 15 mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina, respectivamente). Xu y Chang (2008) encontraron concentraciones similares de estos compuestos en frijoles negros cocidos por un proceso de ebullición.

Cuadro 7. Contenido de compuestos fenólicos de las harinas de frijol cocido

Variedad	Fenoles totales ¹	Taninos condensados ²	Flavonoides ²	Antocianinas ³
Peruano	0.8 ± 0.1 ^d	0.72 ± 0.3 ^b	1.56 ± 0.2 ^b	ND
Flor de Mayo	4.5 ± 0.1 ^b	3.29 ± 0.1 ^a	2.20 ± 0.1 ^a	ND
Negro	2.7 ± 0.1 ^c	2.87 ± 0.3 ^b	1.69 ± 0.1 ^b	300 ± 20 ^a
Flor de Junio	6.4 ± 0.1 ^a	4.46 ± 0.5 ^a	2.22 ± 0.1 ^a	ND
Negro 8025	6.0 ± 0.1 ^a	4.44 ± 0.4 ^a	2.34 ± 0.1 ^a	152 ± 15 ^b

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro evaluado ($P \leq 0.05$), analizado por la prueba de Tukey. ND= No detectado, ¹Expresados en mg eq. ácido gálico/g de harina, ²Expresados en mg eq. (+) catequina/g de harina, ³Expresados en mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina.

Espinosa-Alonso y colaboradores (2006) evaluaron diversas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), tales como negro, gris moteado, cafeto, amarillo pálido, mestizo y crema moteado y reportaron una concentración de fenoles totales, taninos condensados y antocianinas en un rango de 0.90 - 2.11 mg ácido gálico/g de harina, 10.05 - 35.7 mg eq (+) catequina/g de harina y 10-1850 mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina, respectivamente.

A pesar de que la concentración de fenoles totales y taninos condensados de las variedades de frijol en estudio se encuentran dentro del intervalo reportado por estos autores, los valores son bajos, lo que podría atribuirse por ejemplo a que en el estudio realizado por Espinosa-Alonso y colaboradores se emplearon harinas de frijol crudo y en nuestro estudio ambas variedades se sometieron a cocción. Aparicio-Fernández y col. (2005) evaluaron el contenido de taninos condensados en la variedad Negro Jamapa, con y sin tratamiento térmico observando una disminución hasta de un 10% en dicho parámetro después de la cocción del frijol, lo que se sugiere que parte de los compuestos fenólicos presentes en el frijol se degradan al recibir tratamiento térmico, o bien se acomplejan con otros componentes (carbohidratos y/o proteínas), por lo que no están disponibles para su cuantificación.

La capacidad antioxidante *in vitro* se utiliza como una prueba preliminar para evaluar aquellos compuestos que tienen la propiedad de donar electrones y/o protones a radicales libres inhibiendo los procesos oxidativos. Se han realizado estudios *in vitro* en donde se observó que los ácidos fenólicos tienen alta capacidad antioxidante y también se ha reportado que pueden inducir enzimas de detoxificación (Yeh y Yeh, 2003). Sin embargo, la capacidad antioxidante de los frijoles puede variar de un cultivar a otro (Cardador-Martínez y col., 2005). Esto puede atribuirse a que dicha capacidad está dada principalmente por la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en el alimento (Agostini y col., 2004).

En este estudio la capacidad antioxidante de las variedades de frijol se evaluó mediante el método de ABTS y los resultados se expresaron como μM

Trolox eq/g de harina. Los extractos metanólicos de FJ, N8025 y FM mostraron la mayor capacidad antioxidante (9.8, 10.3 y 10.8 μM Trolox eq/g de frijol seco, respectivamente) comparados con el frijol P y N (4.5 y 8.66 μM Trolox eq/g de frijol seco, respectivamente). Estos resultados (**Figura 31**) sugieren que los frijoles pigmentados obtuvieron la mayor eficiencia en atrapar el radical ABTS.

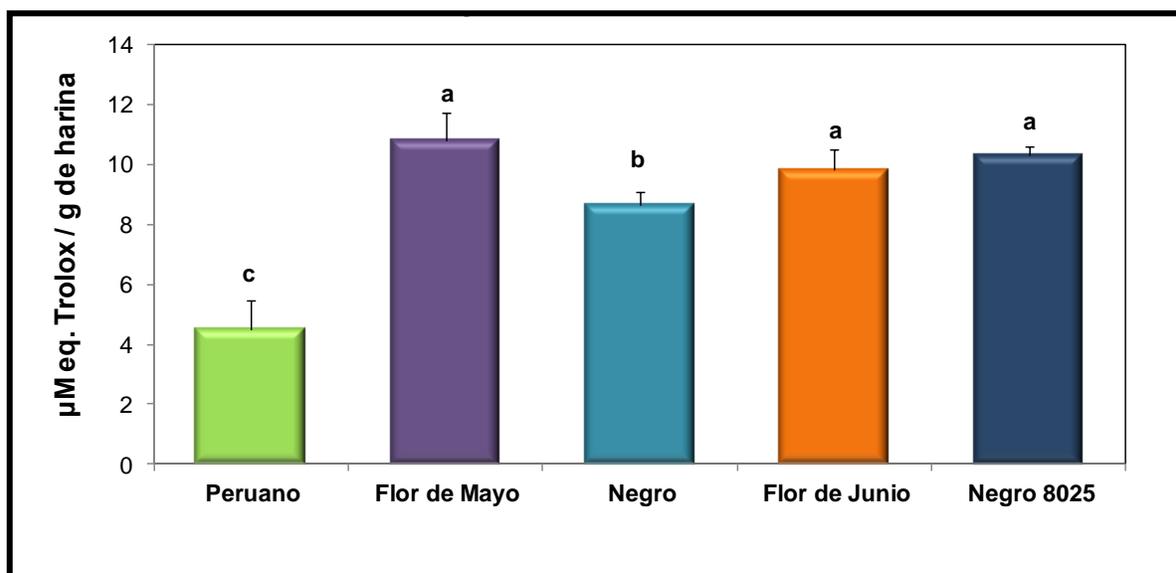


Figura 31. Capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido determinada por el método ABTS

Cada barra representa la media \pm EE por grupo; n= 3 repeticiones por grupo. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$).

Adicionalmente, los resultados concuerdan con lo reportado por Iniestra y colaboradores (2005), quienes observaron una mayor capacidad antioxidante en un extracto de semilla de frijol de FM y N8025 (también conocido como negro Durango), en comparación con las variedades de frijol que tenían tonalidades beige, similar a la variedad Peruano, evaluada en este proyecto.

La diferencia de la capacidad antioxidante entre las distintas variedades de frijol se relaciona con la estructura química de los fenoles presentes en cada tipo de frijol, tanto por la naturaleza como por la concentración de los fenoles. Por ejemplo, los ácidos fenólicos y flavonoides se han relacionado con la actividad antioxidante

de los frijoles pintos; mientras tanto las antocianinas puede jugar un papel importante en la actividad antioxidante de frijol negro (Xu y Chang, 2009).

Se realizaron algunas correlaciones, para determinar las posibles asociaciones entre los compuestos y la capacidad antioxidante, encontrando valores significativos entre el contenido de taninos condensados y fenoles totales ($r=0.93$, $P \leq 0.010$), taninos condensados y flavonoides ($r=0.96$, $P \leq 0.008$); así como, la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales ($r=0.85$, $P \leq 0.056$), el contenido de taninos condensados ($r=0.63$, $P \leq 0.052$), y el contenido de flavonoides ($r=0.77$, $P \leq 0.054$). Estos resultados sugieren que el contenido de compuestos fenólicos puede tener la mayor contribución de la capacidad antioxidante encontrada en el extracto metanólico de los frijoles cocidos.

En base a los resultados anteriores es posible sugerir que las harinas de frijol cocido pueden ser fuentes potenciales de compuestos antioxidantes y dichos resultados sugieren que esta actividad antioxidante podría inactivar los radicales generados en un organismo en un estado de hiperglicemia como la diabetes.

8.4 Niveles de glucosa e insulina en sangre de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol

La diabetes experimental inducida en los animales se realizó mediante una inyección vía intraperitoneal de 50 mg/kg de STZ. Este fármaco provoca la destrucción parcial de las células β pancreáticas encargadas de producir y secretar insulina al organismo; por lo tanto la diabetes presentada es parecida a una diabetes tipo 1 (Rossini y col., 1977). La ausencia de insulina provoca una disminución de la incorporación de glucosa en tejidos periféricos como el adiposo y muscular, por lo que disminuye la utilización de la misma generando incrementos de la glucemia (Wilson y col., 1990). Por lo que, una disminución de la glucosa es un indicativo de la mejora de la enfermedad.

En la **Figura 32** se puede observar el efecto que tiene la alimentación diaria de las diferentes variedades de frijol incorporado en la dieta sobre los niveles de

glucosa sanguínea de ratas en ayuno a lo largo del experimento. En la segunda semana de tratamiento se observó una disminución en los niveles de glucosa en sangre con respecto al control de los grupos alimentados con frijol Flor de Mayo (25%), Flor de Junio (35%) y Negro 8025 (25%), sosteniéndose así sólo para Flor de Mayo (25%) y Flor de Junio (30%) hasta el final de la cuarta semana. Sin embargo, este efecto no se observa en la última semana para la variedad Negro 8025. Lo que sugiere que el consumo de frijol común pigmentado o negro ayuda al control de la enfermedad, ya que a pesar de que para algunos grupos la disminución de la glicemia no es estadísticamente significativa, la diabetes no avanza como en el caso del grupo control diabético.

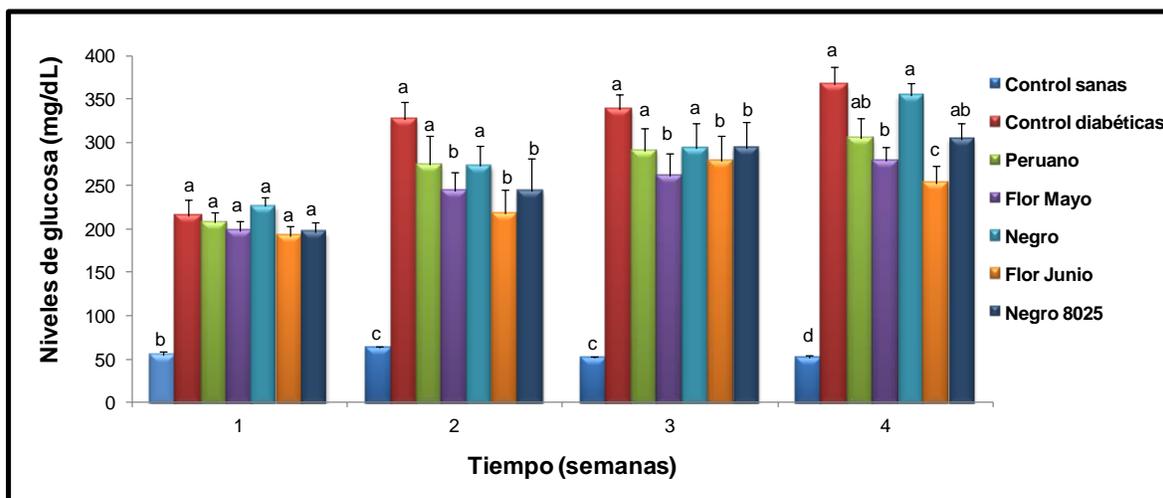


Figura 32. Niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%)

Los valores se presentan como media de la concentración de glucosa en sangre \pm E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades ($P \leq 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

Algunos estudios mencionan que el frijol contiene carbohidratos glicémicos, los cuales pueden ser digeridos y absorbidos por el intestino delgado, incrementando así los niveles de glucosa en sangre en el organismo. Sin embargo, cabe mencionar que el frijol presenta un bajo índice glicémico debido a que sólo el 37.3% del total del almidón disponible puede repercutir directamente en la respuesta glucémica. Además, la mitad de este valor corresponde a

carbohidratos de digestión lenta, por lo que son absorbidos más lentamente (Foster-Powell y col., 2002). En base a los resultados encontrados en este estudio, el consumo de frijol común no sólo no incrementa los niveles de glucosa en sangre, si que además produce efectos hipoglucémicos.

Respecto a lo anterior, se sabe que el frijol común tiene un gran aporte de fibra, la cual produce una mayor saciedad así como un arrastre de grasas, lo que se ha relacionado con disminución en los niveles de glucosa y colesterol (Serrano y Goñi, 2004). Algunos compuestos fenólicos contenidos en el frijol tienen actividad sobre la enzima α -amilasa, dificultando la digestión de los carbohidratos glicémicos e incrementando el porcentaje de carbohidratos resistentes a la digestión (Sales y col., 2012).

En este estudio, se observó que los niveles elevados de la glucosa en sangre de ratas diabéticas inducidas con STZ disminuyen por el consumo de frijol común (específicamente FM y FJ) y este efecto puede estar relacionado con un incremento en los niveles de insulina. Como se muestra en la **Figura 33** en este experimento hubo un aumento en los niveles de insulina hasta un 50% para las variedades FM y FJ. Se ha sugerido que el posible mecanismo por el cual el frijol común ejerce su efecto en ratas diabéticas involucra el incremento de la secreción de insulina de las células β pancreáticas existentes (Pari y Venkateswaran, 2003). Además, se ha reportado que los flavonoides regeneran el daño en este tipo de células en animales diabéticos y las variedades de frijol evaluadas en este estudio contienen estos compuestos (**Cuadro 7**).

Por ejemplo, diversos estudios muestran que la quercetina, un flavonoide que también ha sido identificado en frijoles (Xu y Chang, 2008), revierte a la normalidad los niveles de glucosa en una prueba de tolerancia a la glucosa y el numero de islotes del páncreas, mientras que disminuye el grado de estrés oxidativo cuando ésta quercetina (1g/kg de dieta) es administrada a ratas diabéticas (Vessal y col., 2003).

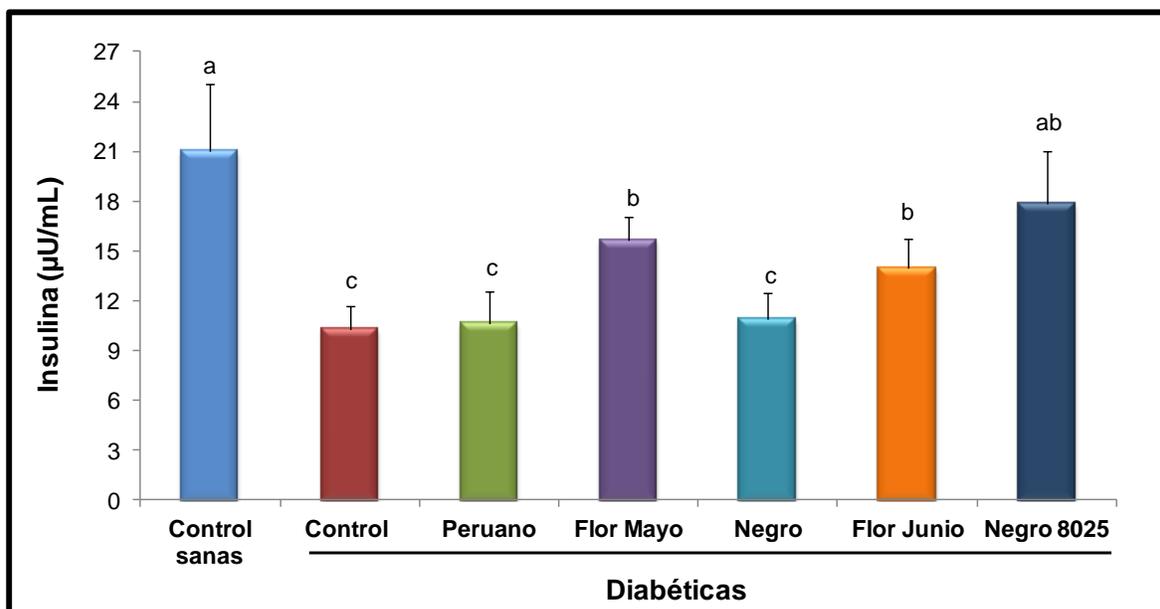


Figura 33. Concentración de insulina en suero de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%).

Los valores se presentan como la media \pm E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades ($P \leq 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

A pesar de lo descrito, no se puede asegurar que la capacidad del frijol para disminuir la glucosa sólo se atribuya exclusivamente a la producción de insulina, ya que a pesar del aumento de los niveles de esta hormona por el consumo de frijol N8025 (hasta un 94%), estas variedades sólo disminuyen los niveles de glucosa en un 17%; mientras que, el frijol FJ incrementa los niveles de insulina en un 40% (**Figura 33**) y disminuye la glucosa hasta en un 31% (**Figura 32**). Por lo tanto, se puede sugerir que el consumo de frijol común induce a otros mecanismos relacionados con el control de la glucosa, tales como mejorar la sensibilidad a la insulina, inhibir la gluconeogénesis hepática, entre otros.

8.5 Peso corporal de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol

La insulina es importante para la incorporación de glucosa en las células musculares para la obtención de energía, por lo que la ausencia de esta hormona

inicia un proceso catabólico incrementando la degradación tanto de la grasa acumulada como de proteínas musculares (Klimes, 1997), lo cual se correlaciona con la pérdida de peso. Siendo una de las características de una diabetes no controlada la pérdida de peso corporal, lo cual se correlaciona con un progreso de la enfermedad. Por lo tanto, dicho parámetro se determinó en este estudio.

En la **Figura 34** se puede observar que no se presentaron cambios significativos en el peso corporal a través del tiempo de experimentación, entre los grupos alimentados con frijol y el grupo control diabético. Por lo tanto, el efecto hipoglucémico producido por el frijol común, mencionado anteriormente, no se refleja en una mayor ganancia de peso, pero si en un “mantenimiento” del peso corporal.

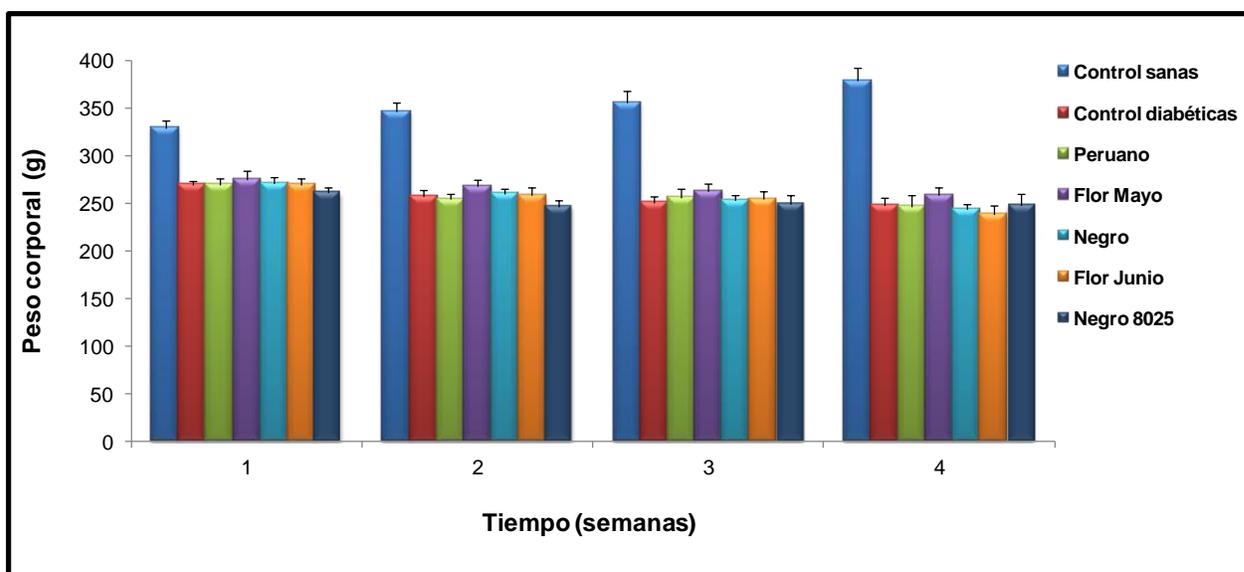


Figura 34. Peso corporal de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%)

Los valores se presentan como media del peso corporal \pm E.E. (n=8).

8.6 Consumo de agua de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza, entre otros síntomas, por polidipsia (sed excesiva) (Braunwald y col., 1998). El exceso de glucosa en la sangre necesita de la excreción de cantidades elevadas de agua, vía urinaria, para eliminar la glucosa disuelta en el organismo (King, 1991). Debido a esto existe una deshidratación ocasionada por el arrastre de líquido y como consecuencia, el consumo excesivo de agua que en los pacientes diabéticos se hace evidente (Federación Mexicana de Diabetes, 2003). Por lo tanto, en el presente experimento se determinó el consumo de agua como un indicador de la evaluación del control de la enfermedad.

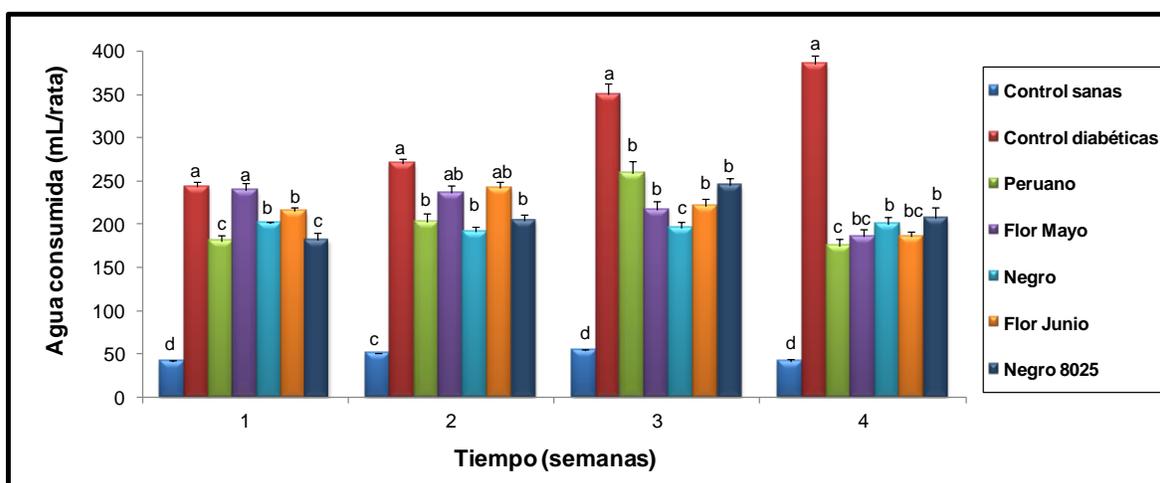


Figura 35. Consumo de agua en ratas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%)

Los valores se presentan como la media de los mililitros de agua consumida \pm E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades ($P \leq 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

A partir de la primera semana de tratamiento existe una disminución del consumo de agua para los animales alimentados con frijol Peruano, Negro, Flor de Junio y Negro 8025. Así mismo, en la tercera semana se observó una disminución del consumo de agua, en todos los grupos de experimentación, siendo mayor para

el frijol Flor de Mayo y Junio (38%) y el que menos redujo fue el Peruano (25%), en comparación con el grupo control de ratas diabéticas ($P \leq 0.05$). Como se espera, el grupo control diabético incrementó el consumo de agua a través del tiempo, lo cual está relacionado con la evolución de la enfermedad. La disminución del consumo de agua como resultado del consumo de las diferentes variedades de frijol se observó a lo largo del experimento y persistió hasta el final de la cuarta semana, lo que indica que las dietas con las harinas de frijol cocido regulan esta alteración de la enfermedad (**Figura 35**).

8.7 Parámetros bioquímicos de daño renal en orina y suero de ratas sanas, diabéticas y diabéticas alimentadas con frijol

Un control adecuado de la diabetes es importante, ya que los cambios que ocurren en etapas tempranas pueden ser reversibles. Con el fin de disminuir el número de complicaciones de la diabetes y retrasar su desarrollo, se ha recomendado el uso de componentes biológicos activos presentes en plantas. Los principios activos biológicos más importantes para este propósito son vitaminas y minerales, proteínas, polisacáridos, lectinas, saponinas y flavonoides (Adams y Strandige, 2006). Según reportes científicos, dentro de los alimentos más empleados con este fin se encuentra el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Savickiene, 2002).

8.7.1 Parámetros bioquímicos en orina

Las alteraciones renales son una de las principales complicaciones de la diabetes e implican un aumento de la excreción de proteínas en orina, anomalías en el aclaramiento de creatinina y pérdida de la función renal. Diversos estudios han mostrado correlaciones entre el nivel de albúmina en la orina y una disminución en la tasa de filtración glomerular (Kanwar y col., 2008).

En este estudio (**Cuadro 8**), los niveles de excreción de albúmina en la orina se incrementaron significativamente en las ratas diabéticas (2 veces, comparado con el grupo control de ratas sanas), lo que indica cambios en la

barrera de filtración capilar que se traducen en el aumento de la permeabilidad de la membrana basal glomerular como lo sugiere Wolf y colaboradores (2005); mientras que, los niveles de glucosa y urea mostraron mayores incrementos (aproximadamente 20 y 3 veces, respectivamente) y el aclaramiento de creatinina disminuyó en un 50%. Estos resultados demostraron la presencia de anormalidad en la función renal de los animales diabéticos (**Cuadro 8**).

La incorporación de frijol en la dieta de las ratas disminuyó la concentración de albúmina en orina y, por otro lado, aumentó el aclaramiento de creatinina (excepto la variedad Negro en ambas mediciones).

Las variedades de frijol FJ, FM y P disminuyeron los niveles de albúmina en orina al mismo nivel que el de las ratas sanas, mientras que N8025 mostró un menor efecto. Así mismo, es evidente el efecto de frijol sobre los niveles de glucosa y urea en orina, ya que estos parámetros disminuyeron en un 50% y 15%, respectivamente, siendo FM, FJ y P las variedades que mejoraron estos parámetros.

Lo anterior sugiere que el consumo de frijol cocido puede proteger contra el daño renal, posiblemente disminuyendo los efectos causados por la hiperglucemia. Sin embargo, el consumo de frijol también puede conferir protección a los riñones a través de otros mecanismos tal como la inducción de sistemas de defensa antioxidantes, entre otros, ya que algunas variedades no disminuyen significativamente los niveles de glucosa en la sangre, pero muestran protección de las alteraciones del riñón, como el frijol P.

Cuadro 8. Efecto de la dieta suplementada con frijol cocido sobre parámetros funcionales renales de ratas diabéticas*

Grupo	Glucosa ¹	Albúmina ¹	Proteína ¹	Urea ¹	Creatinina ¹	Vol. Orina ²	CCr ³
Sanas	20.5 ± 1.6 ^f	1.4 ± 0.3 ^c	3.7 ± 0.7 ^b	5.1 ± 0.6 ^c	5.5 ± 2.3 ^c	22.0 ± 2.6 ^c	1.63 ± 0.04 ^a
Diabéticas							
Control	392.5 ± 23.4 ^a	2.8 ± 0.6 ^a	7.2 ± 1.6 ^a	30.4 ± 3.2 ^a	23.1 ± 4.6 ^a	43.6 ± 6.5 ^a	0.78 ± 0.03 ^c
Peruano[§]	190.0 ± 18.9 ^{cd}	1.4 ± 0.2 ^c	2.3 ± 0.9 ^c	19.3 ± 1.9 ^b	8.2 ± 2.5 ^c	28.6 ± 4.9 ^b	0.86 ± 0.11 ^{bcd}
Flor Mayo[§]	205.0 ± 22.3 ^c	1.2 ± 0.2 ^c	1.0 ± 0.6 ^c	20.6 ± 3.2 ^b	10.6 ± 4.8 ^{bc}	34.5 ± 8.2 ^a	1.11 ± 0.17 ^b
Negro[§]	243.3 ± 13.4 ^b	2.4 ± 0.1 ^a	4.1 ± 1.6 ^b	26.0 ± 2.5 ^{ab}	10.5 ± 2.5 ^{bc}	29.8 ± 1.4 ^b	0.61 ± 0.04 ^d
Flor Junio[§]	119.2 ± 21.2 ^d	1.5 ± 0.3 ^c	3.9 ± 0.9 ^b	15.3 ± 4.9 ^b	17.4 ± 1.6 ^{ab}	17.7 ± 5.3 ^c	1.03 ± 0.07 ^b
Negro 8025[§]	277.1 ± 20.3 ^b	1.9 ± 0.3 ^b	2.1 ± 0.6 ^c	23.2 ± 4.4 ^{ab}	12.6 ± 3.9 ^b	37.6 ± 5.0 ^a	1.49 ± 0.18 ^a

Los valores se presentan como la media ± E.E. (n=8). Aclaramiento de creatinina (Ccr). [§]Todos los frijoles se incorporaron en la dieta a una concentración de 100 g/kg dieta. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro evaluado (P ≤ 0.05), la prueba de Tukey. ¹mg/24 h, ²mL/24 h, ³mL/min.

8.7.2 Parámetros bioquímicos en suero

8.7.2.1 Perfil de lípidos

Además de las disfunciones en el metabolismo de la glucosa, los pacientes diabéticos presentan alteraciones en el perfil de lípidos en suero, el cual constituye uno de los principales factores de riesgo cardiovascular (Sun y col., 2002). Así mismo, en años recientes, un gran número de estudios ha concluido que la dislipidemia también tiene un papel importante en la progresión de enfermedad renal en pacientes con diabetes (Schrijvers y col., 2004; Rutledge, y col., 2010). La disminución de colesterol LDL, incremento del colesterol HDL y disminución de los triglicéridos han demostrado tener una mejora en las complicaciones de la enfermedad y mortalidad.

Se ha reportado que las ratas diabéticas inducidas con STZ muestran hiperlipidemia (Ramesh y col., 2006) y, en el presente estudio, se observaron un aumento en el nivel triglicéridos y colesterol total (**Cuadro 9**).

En cuanto a los niveles de triglicéridos podemos observar que existe un incremento significativo en el grupo de ratas diabéticas control (131.4 ± 6.6 mg/dL) comparado con el grupo de ratas sanas (79.2 ± 3.9 mg/dl), como era de esperarse. Ramesh y colaboradores (2006) reportaron que las ratas sanas control tuvieron niveles de triglicéridos de 80 mg/dl y las ratas diabéticas de 180 mg/dl.

El consumo de frijol común de todas las variedades en estudio, durante cuatro semanas, disminuyó significativamente los niveles de triglicéridos hasta en un 40% (**Cuadro 9**). Este efecto puede explicarse por la acción de la insulina, la cual puede mejorar la incorporación de glucosa en adipocitos. Al incorporarse la glucosa a las células del tejido adiposo, ésta se metaboliza produciendo glicerol-3-fosfato, permitiendo la re-esterificación y el almacenamiento de ácidos grasos provenientes del torrente sanguíneo, transportados mediante las lipoproteínas. Por lo que, aquellos componentes del frijol que pudieran regular los niveles de glucosa

sanguínea, también pueden ayudar al almacenamiento de ácidos grasos en tejido adiposo en forma de triglicéridos, disminuyendo así las concentraciones de éstos en sangre (El-Tantawy y Hassanin, 2007). La disminución de los niveles de triglicéridos implica un beneficio a la salud, al reducir el riesgo de que un paciente diabético desarrolle alteraciones cardiovasculares y renales a medida que progresa la enfermedad (Anandh y col., 2006).

Cuadro 9. Concentración de perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes variedades de frijol cocido

Grupo	Triglicéridos ¹	Colesterol ¹	HDL ¹	LDL ¹
Sanas	79.2 ± 3.9 ^b	52.5 ± 1.3 ^b	49.0 ± 1.7 ^a	4.6 ± 0.3 ^b
Diabéticas				
Control	131.4 ± 6.6 ^a	63.3 ± 1.6 ^a	21.0 ± 0.9 ^b	42.3 ± 1.0 ^a
Peruano[§]	117.6 ± 4.6 ^{ab}	71.7 ± 2.4 ^a	19.0 ± 1.2 ^b	52.7 ± 1.8 ^a
Flor Mayo[§]	73.3 ± 3.6 ^b	69.8 ± 0.9 ^a	20.5 ± 1.0 ^b	49.4 ± 0.8 ^a
Negro[§]	114.7 ± 6.9 ^{ab}	79.4 ± 2.6 ^a	20.0 ± 1.4 ^b	54.2 ± 2.7 ^a
Flor Junio[§]	77.2 ± 4.4 ^b	79.7 ± 1.9 ^a	22.8 ± 1.7 ^b	45.4 ± 0.8 ^a
Negro 8025[§]	89.0 ± 3.5 ^b	75.2 ± 1.5 ^a	19.9 ± 1.8 ^b	54.4 ± 2.4 ^a

Los valores se presentan como la media ± E.E. (n=8). ¹(mg/dL), [§]Todos los frijoles se incorporaron en la dieta a una concentración de 100 g/kg dieta. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro evaluado (P < 0.05), por la prueba de Tukey.

En cuanto al colesterol total (**cuadro 9**), al igual que los triglicéridos, el grupo de ratas sanas presenta una menor concentración de colesterol (52.5 ± 1.3 mg/dL), comparada con el grupo de ratas diabéticas control (63.3 ± 1.6 mg/dL). Así mismo, el **cuadro 9** se puede observar que las ratas sanas presentan niveles bajos de LDL (4.6 ± 0.3 mg/dL) comparada con las ratas diabéticas control (42.3 ± 1.0 mg/dL) las cuales presentan hasta 4 veces más concentración de LDL, incrementando el riesgo cardiovascular. Sin embargo, ninguna de las variedades de frijol reguló los niveles de colesterol total, LDL y HDL.

La hipercolesterolemia en el grupo diabético podría deberse a un incremento en la síntesis de colesterol independiente de insulina, por aumento de VLDL circulante que aporta el 20% del colesterol total y por disminución del catabolismo de LDL.

8.7.2.2 Contenido de TNF- α , adiponectina y proteína C reactiva (PC-R)

Respecto al proceso inflamatorio, que es reconocido como el principal factor de complicaciones de la diabetes (Jawl y col., 2008), los niveles de TNF- α y PC-R en plasma fueron más altas en el grupo de animales diabéticos en comparación con los del control sano (**Cuadro 10**). Se ha reportado que la vía de TNF- α incrementa directamente la vasoconstricción glomerular y la permeabilidad de la albúmina (Navarro y Mora-Fernández, 2006).

Respecto a los tratamientos, las ratas alimentadas con frijol común disminuyeron significativamente los niveles séricos de TNF- α en comparación con las ratas diabéticas control, de un 40% para N8025 hasta en un 60% para FJ, excepto para la variedad N (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Efecto de dietas suplementadas con frijol cocido sobre marcadores de inflamación en ratas diabéticas

Grupos	TNF- α ($\mu\text{g/mL}$)	PC-R (pg/mL)	Adiponectina (pg/mL)
Sanas control	6.8 \pm 1.0 ^d	600.4 \pm 9.3 ^b	15.6 \pm 2.6 ^a
Diabéticas			
Control	40.5 \pm 5.4 ^a	882.3 \pm 30.6 ^a	1.8 \pm 0.3 ^d
Peruano[§]	21.1 \pm 2.2 ^b	998.0 \pm 26.7 ^a	2.9 \pm 0.5 ^d
Flor Mayo[§]	18.4 \pm 0.9 ^{bc}	559.8 \pm 63.8 ^b	5.2 \pm 0.7 ^{bc}
Negro[§]	36.4 \pm 7.5 ^a	861.7 \pm 87.3 ^a	2.7 \pm 0.2 ^d
Flor Junio[§]	15.0 \pm 2.7 ^{bc}	583.8 \pm 84.1 ^b	6.2 \pm 0.5 ^b
Negro 8025[§]	24.5 \pm 2.2 ^b	660.1 \pm 56.2 ^b	3.6 \pm 0.5 ^{cd}

Los valores se presentan como la media \pm E.E. (n=8). PC-R: proteína C reactiva, TNF- α : factor de necrosis tumoral α . [§]Todos los frijoles se incorporaron en la dieta a una concentración de 100 g/kg dieta. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro ($P \leq 0.05$), por la prueba de Tukey.

Por otro lado, con excepción de P y N, el consumo de frijol común aumentó significativamente los niveles de adiponectina, en comparación con el grupo control diabético (de 3.6 hasta 6.2 pg/mL vs. 1.8 pg/mL), respectivamente y disminuyó hasta en un 30% la concentración de PC-R para FM y FJ y en un 20%

para N8025 (**Cuadro 10**), así mismo, recordando estos grupos también mostraron protección renal. A este respecto, se ha informado que la baja concentración de adiponectina en plasma contribuye a la alteración de la permeabilidad en los riñones durante la enfermedad renal temprana (Sharma y col., 2008). Los resultados encontrados en nuestra investigación concuerdan con los reportados por Okada y colaboradores (2010), quienes observaron que el extracto etanólico de semillas secas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) mejora la producción de adiponectina y disminuye los niveles de TNF- α en los adipocitos 3T3-L1.

El mecanismo por el cual las diferentes variedades de frijol reducen las concentraciones de marcadores inflamatorios se puede explicar por los efectos hipoglucémicos observados, lo cual conlleva a una disminución del estrés oxidativo inducido por la glucosa. En un estado de hiperglucemia, este estrés induce la expresión de múltiples genes en los monocitos y otras células, como moléculas de señalización, la sobreexpresión de estos genes estimulan la secreción de citocinas proinflamatorias (Devaraj y col., 2005).

Por tanto, la disminución de las concentraciones de glucosa en la sangre induce bajos niveles de proteínas inflamatorias y por consiguiente la protección de daño renal. Independiente de la regulación de los niveles de glucosa en sangre, se sabe que los flavonoides reducen la translocación de NF- κ B, con la consiguiente inhibición de la expresión de TNF- α ; mientras que, los polifenoles disminuyen directamente la expresión de PC-R (Santangelo y col., 2007).

En general, los resultados sugieren que el consumo de frijol (10%) ayuda a reducir el estado inflamatorio crónico observado en la diabetes, y así prevenir el desarrollo de las complicaciones de esta enfermedad.

8.7.3 Parámetros bioquímicos en riñón

8.7.3.1 Oxidación de proteínas y lípidos

El estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia en los diabéticos parece ser una de las causas principales para el desarrollo y progresión de complicaciones diabéticas microvasculares, como la nefropatía (Shimoi y col., 2001). Diversos estudios han demostrado que la oxidación de proteínas y lípidos aumenta durante el proceso patológico de la diabetes relacionada con el estrés oxidativo. Por lo que, en este experimento se evaluó la capacidad antioxidantes del consumo de frijol a través de la disminución de la oxidación de lípidos y proteínas.

Como se explicó anteriormente, una condición de hiperglicemia provoca un notable incremento en los niveles de oxidación tanto de lípidos como de proteínas. En este estudio, los resultados mostraron que es más evidente la oxidación de lípidos que de proteínas, ya que la oxidación de lípidos incrementa cerca de 3 veces comparado con el grupo sano ($P \leq 0.05$) (**Figura 36 y 37**). Todas las variedades de frijol evaluadas disminuyen la oxidación de lípidos en una misma proporción (cerca de un 50% en comparación con el grupo diabético control). En cuanto a la oxidación de proteína todas las variedades de frijol reducen significativamente este parámetro (**Figura 37**), sin embargo, el tratamiento con P ejerce un menor efecto antioxidante.

En el presente trabajo, se evaluó la participación de los radicales libres en la progresión de la enfermedad y el efecto protector de diferentes variedades de frijol común. Los resultados muestran la elevación de la oxidación de lípidos y proteínas en el grupo diabético control; sin embargo, la administración del frijol disminuye la oxidación de estos dos parámetros en el riñón.

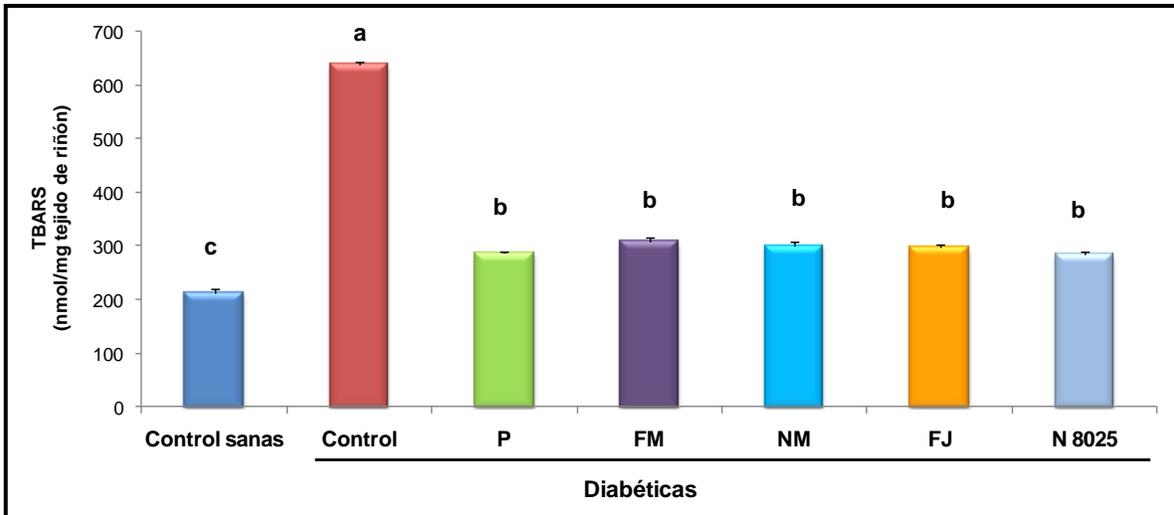


Figura 36. Contenido de TBARS en riñón de ratas diabéticas alimentadas con diferentes variedades de frijol cocido (10%)

Los valores se presentan como la media de los gramos consumidos de alimento \pm E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades ($P \leq 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

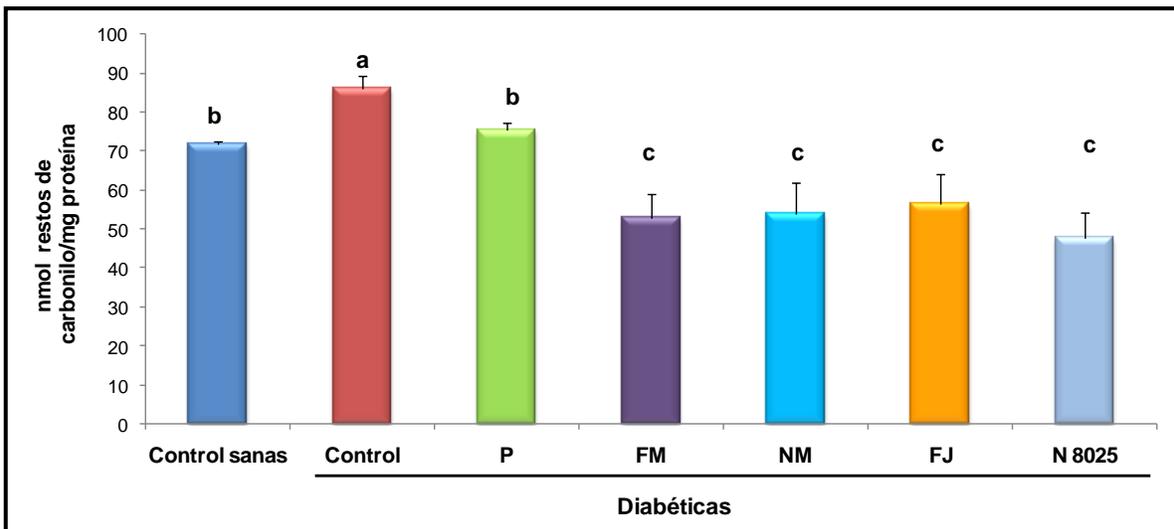


Figura 37. Oxidación de proteínas en el riñón de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con diferentes variedades de frijol cocido

Los valores se presentan como la media de los gramos consumidos de alimento \pm E.E. (n=8). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades ($P \leq 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

La capacidad de frijoles cocidos para inducir los sistemas antioxidantes podría depender también de la composición química de cada variedad. Por lo que los resultados antes descritos sugieren que la naturaleza química de los compuestos fenólicos también podría afectar a su capacidad para inducir la actividad antioxidante *in vivo*. Así mismo, otros compuestos de naturaleza química diferente a los fenoles pueden participar en el efecto antioxidante, como el ácido butírico producido por la fermentación de la fracción indigerible de frijol (Hernández Salazar y col., 2010).

La capacidad antioxidante *in vitro* (valores TEAC) de las variedades de frijoles cocidos fueron similares a los reportados para otras frutas, con capacidad de inducir en el sistema antioxidante *in vivo* (Luo y col., 2004). Por lo tanto, la cantidad de fenoles que se conservan en el frijol cocido, su formación o conversión de otros compuestos podría estar relacionado con la inducción de las enzimas antioxidantes o el atrapamiento de radicales libres (Xu y Chang, 2009).

8.7.3.2 Contenido de glutatión-S-transferasa, catalasa y glutatión reducido en riñón

Una disminución del estrés oxidativo mediante el tratamiento con antioxidantes puede ser una estrategia eficaz para reducir las complicaciones de la diabetes (Kędziora y col., 2003; Vega y col., 2004.). Otro mecanismo adicional a la capacidad de atrapamiento de los radicales libres por parte de los fitoquímicos de frijol, podría basarse en su capacidad de inducir enzimas antioxidantes. Para determinar este último efecto, se midió la actividad de las enzimas como CAT y GST, así como los niveles del cofactor GSH (**Cuadro 11**).

En el **Cuadro 11** se muestran las concentraciones de GSH y la actividad de CAT y GST en el riñón de ratas sanas y diabéticas. Se puede observar que las variedades FM y N indujeron la mayor activación de GST, alrededor de un 35% comparado con el grupo control diabético; así mismo, estas variedades incrementaron los niveles de GSH y la actividad de CAT (30 y 25% respectivamente). Las variedades P y FJ inducen efectivamente la actividad de las

dos enzimas evaluadas, pero tienen un mayor efecto sobre la actividad de CAT, alrededor de un 50%. Cabe destacar que la variedad N incrementó hasta dos veces las concentraciones de GSH, siendo esta la mejor variedad con capacidad inductora de este cofactor.

Cuadro 11. Actividad de enzimas antioxidantes y concentración de glutatión reducido en riñón de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol

Grupos	CAT (U/g proteína)	GST nmol/(mg proteína · min)	GSH (µM/mg proteína)
Sanas control	3.1 ± 0.2 ^a	246.8 ± 8.0 ^e	40.3 ± 1.8 ^f
Diabéticas			
Control	1.0 ± 0.1 ^f	264.1 ± 4.0 ^d	45.9 ± 4.4 ^e
Peruano[§]	1.8 ± 0.1 ^c	306.8 ± 6.4 ^c	67.8 ± 3.5 ^d
Flor Mayo[§]	1.5 ± 0.2 ^d	367.0 ± 19.2 ^a	61.3 ± 3.4 ^d
Negro[§]	1.3 ± 0.3 ^e	363.4 ± 23.2 ^a	106.9 ± 5.1 ^a
Flor Junio[§]	2.1 ± 0.2 ^b	339.1 ± 10.1 ^b	84.2 ± 3.5 ^c
Negro 8025[§]	1.4 ± 0.2 ^d	321.5 ± 11.0 ^c	92.3 ± 9.5 ^b

Los valores se presentan como la media ± E.E. (n=8). [§]Todos los frijoles se incorporaron en la dieta a una concentración de 100 g/kg dieta. CAT: catalasa, GST: glutatión-S-transferasa, GSH: glutatión reducido. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro evaluado (P ≤ 0.05), por la prueba de Tukey.

Es importante señalar que las mismas variedades que ejercieron una protección renal, también aumentaron los niveles de GSH y la actividad de GST y CAT (excepto la variedad N). Sin embargo, el grado de inducción y de la actividad de las enzimas es diferente para todas las variedades de frijol evaluadas. Por lo tanto, los compuestos capaces de inhibir un mecanismo específico pueden no ser suficientes para evitar la activación de todas las otras vías interrelacionadas, dado que el grupo alimentado con la variedad N presentó el más alto estado antioxidante en el riñón, posiblemente como respuesta al alto nivel de estrés oxidativo en este grupo por lo que no hubo protección. Por lo tanto, la capacidad del frijol cocido para inducir a los sistemas antioxidantes en gran medida podría depender de la composición química de cada variedad después del procesamiento.

El presente estudio nos proporciona la primera evidencia que el consumo de frijol (10%) a través de la dieta, protege significativamente a ratas diabéticas inducidas con STZ contra la inflamación relacionada con el estrés oxidativo en riñón.

8.8 Efecto del consumo de frijol sobre el transcriptoma diferencial del riñón de ratas diabéticas

En base a los resultados obtenidos a nivel bioquímico, se sugiere que el consumo de frijol mejora la regulación de la filtración de proteína a través del glomérulo del riñón, evitando la hipertrofia del tejido y el daño renal progresivo hacia una insuficiencia renal crónica, presente de la diabetes. Adicionalmente, la protección renal relacionada con el consumo de frijol cocido podría relacionarse con la modulación de algunos genes identificados en este trabajo.

Se ha propuesto que múltiples moléculas blanco participan en el desarrollo de ND, incluyendo los AGE (productos de glicosilación avanzada), el colágeno tipo IV, TGF- β , vía de los polioles, estrés oxidativo, inflamación y cambios hemodinámicos (Lea-Yea y Jinn-Yuh, 2001). Sin embargo, es importante la investigación de otras moléculas de señalización que ayuden a diseñar nuevas terapias para pacientes con ND. En la primera etapa del proyecto, previamente se identificaron varios EST's reprimidos y sobreexpresados relacionados con nefropatía diabética, usando la técnica de SSH.

Dichos EST's se emplearon para evaluar el efecto del frijol cocido, a través de la técnica de Northern blot y se emplearon los dos bancos de genes como se mencionó en materiales y métodos. Para realizar la técnica de Northern blot, primero se generó un macroarreglo con las clonas obtenidas del banco diferencial, el cual se muestra en la **Figura 38**. Cabe mencionar que cada pozo (slot) contenía el ADN plasmídico de cada diferente clona que presentó las mayores diferencias en su expresión, ya sea menor o mayor. En este caso, dicho arreglo de membrana de nylon se cargó con las 45 clonas y se empleó para los diferentes grupos alimentados con frijol.

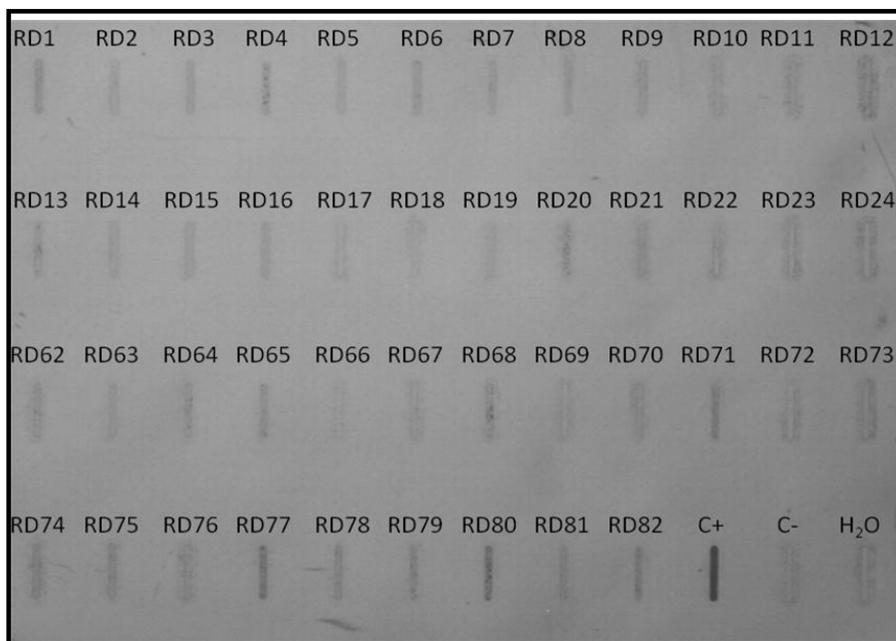


Figura 38. Representación del arreglo de genes reprimidos en el riñón de ratas diabéticas para hibridar mediante Northern blot con sondas obtenidas de los diferentes ADNc de riñón de ratas alimentadas con frijol.

C+: control positivo, C-: control negativo, H₂O: agua, RD1 hasta RD82: código de identificación para cada clona diferencial específica de cada banco.

En este experimento, 45 EST's de cada banco de genes se seleccionaron para evaluar el efecto de frijol común en ratas diabéticas. Sin embargo, como se muestra en los **Cuadros 12 y 13**, el consumo de frijol no tuvo efecto en todos los genes evaluados.

Como ya se mencionó anteriormente, el riñón juega un papel importante en el metabolismo de la arginina, mediante la actividad de ASL. Por otro lado, también la glutamina sintetasa (GS) produce glutamina y es importante para la liberación del amoníaco generado por las células renales. Por lo tanto, la alteración de ambas enzimas podría afectar la función renal.

En este estudio, la expresión de ASL y GS son reprimidas en el riñón de ratas diabéticas; sin embargo, los resultados muestran que FM y FJ incrementaron la expresión de ARNm de ASL y GS, lo que podría aumentar la concentración de L-Arg. Por otro lado, en el riñón se puede sintetizar glutamina y disminuir el riesgo

de acidosis metabólica, y lo que podría relacionarse con una protección del frijol FM y FJ contra la nefropatía diabética (**Figura 39** a y b).

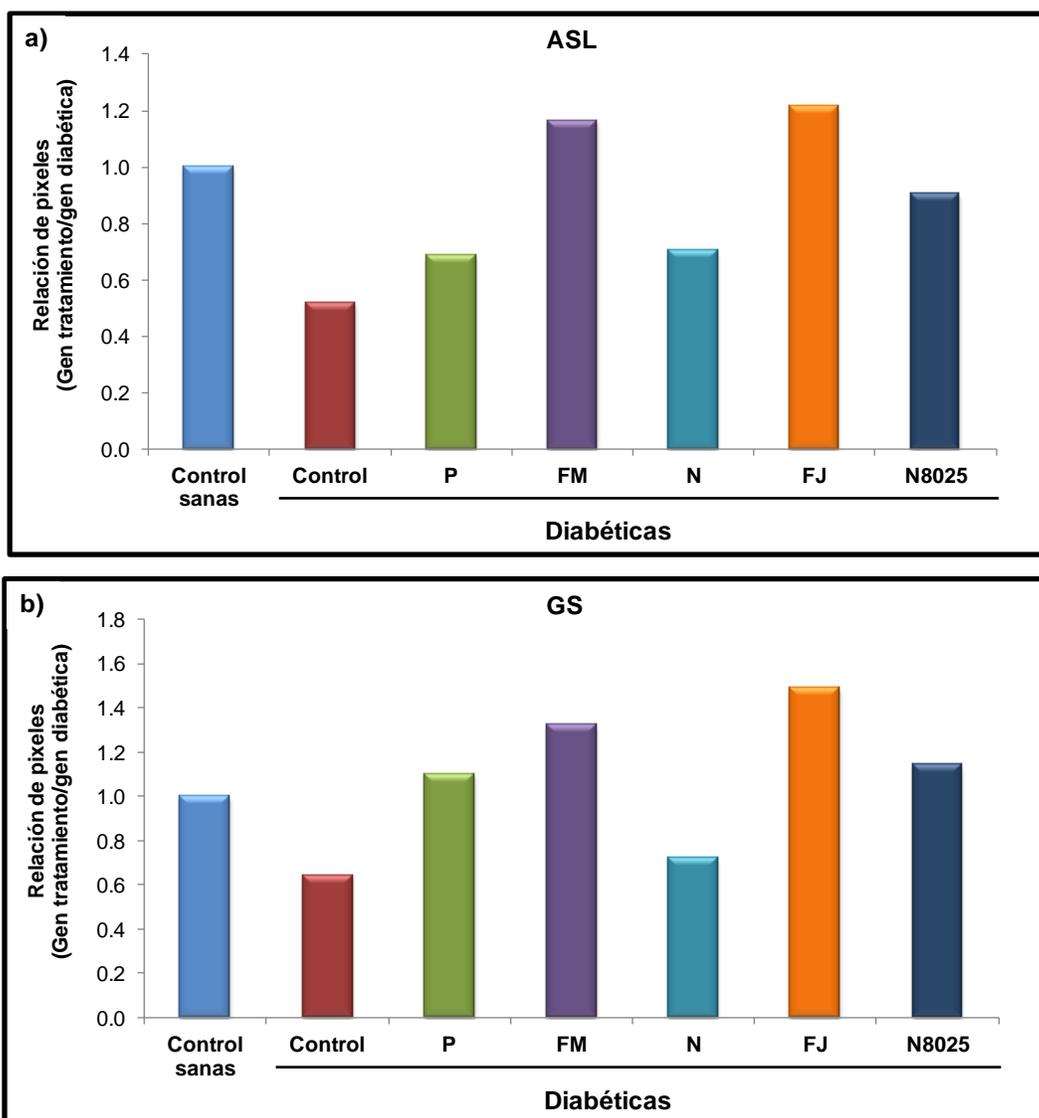


Figura 39. Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre la expresión renal de **a)** ASL y **b)** GS en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ. ASL: arginino succinato liasa, GS: glutamino sintetasa, P: Peruano, FM: Flor de Mayo, N: Negro, FJ: Flor de Junio, N8025: Negro 8025.

También en este experimento, se evaluó el factor de transcripción PPAR δ . Como se mencionó anteriormente, la represión de la expresión de PPAR δ encontrado en nuestro experimento podría relacionarse con la disfunción renal, ya que PPAR δ ejerce una fuerte protección contra la insuficiencia renal. El consumo de las variedades FM, FJ y N8025 aumenta la expresión génica de PPAR δ (**Figura 40**), lo que sugiere que el consumo de frijol inhibe la inflamación y protege al riñón en una condición de diabetes.

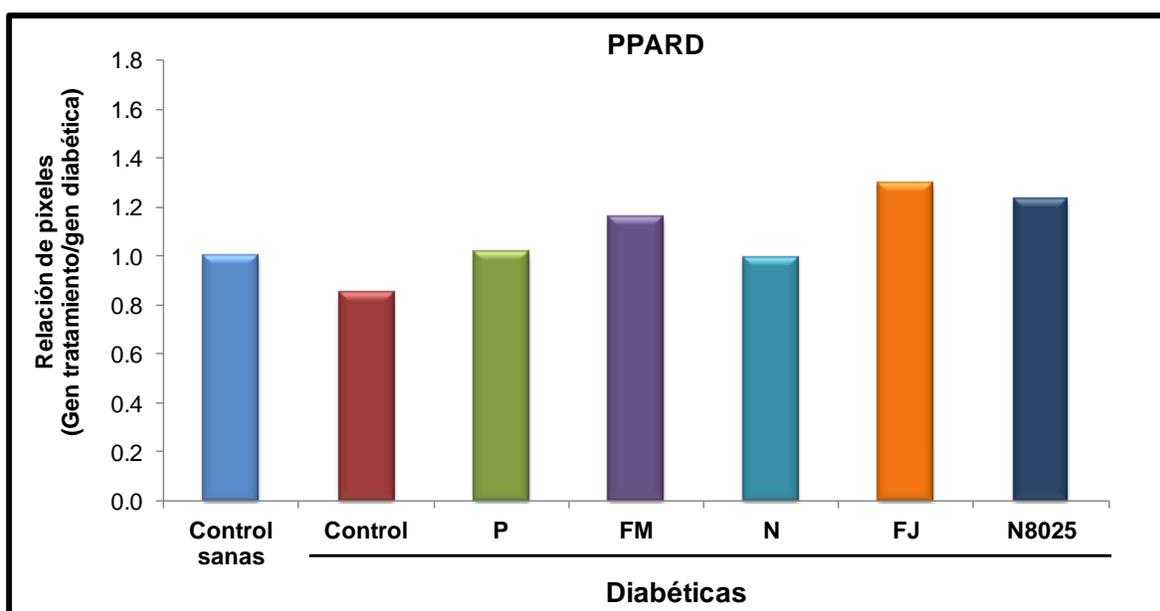


Figura 40. Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre la expresión renal de PPAR δ en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ.

PPAR δ : factor de transcripción proliferador de peroxisoma activado del receptor delta, P: Peruano, FM: Flor de Mayo, N: Negro, FJ: Flor de Junio, N8025: Negro 8025.

Cuadro 12. Efecto del consumo de frijol cocido sobre genes reprimidos en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ

Resultado de Blast (Función)	Sana	Diabética	Intensidad de la señal*				
			P	FM	N	FJ	N8025
a) Genes de metabolismo							
Farnesiltransferasa subunidad beta (Fntb)	27,721	20,581	36,661	27,408	31,717	38,369	23,446
NADH deshidrogenasa	36,745	22,898	39,338	51,993	38,838	48,697	35,651
Treonina-proteína quinasa (PIM-1)	32,780	16,449	13,239	35,985	16,191	30,579	23,249
Arginino succinato liasa (ASL)	50,836	26,273	17,934	30,534	18,514	31,950	23,703
Peptidasa ubiquitina-específica 2 (USP2)	38,897	26,306	25,644	35,517	27,081	45,240	38,662
Hidroxi-isobutirato deshidrogenasa (Hibadh)	29,186	27,104	42,261	31,300	48,694	23,851	45,086
Proteína de unión al DNA helicasa 8 (Chd8)	24,570	23,134	30,773	43,970	15,985	39,693	37,635
UDP glucosa ceramida glicosiltransferasa (Ugcg)	19,338	10,970	13,911	16,749	23,811	27,905	20,199
Proteína serina/treonina quinasa (WNK1)	29,186	28,304	33,844	47,328	31,337	47,954	35,939
Citocromo b-245, alfa polipéptido (Cyba)	35,123	27,805	35,039	48,973	23,693	41,853	36,774
Glutamino-sintetasa (GS)	50,838	32,548	35,807	42,989	23,400	48,531	31,137
Enzima conjugación-ubiquitina E2O (Ube2o)	55,106	51,916	45,586	58,321	40,675	55,236	46,754
Diguanilato fosfodiesterasa	21,489	18,178	25,076	19,259	32,449	35,540	13,024
Malato sintasa (MS)	42,640	40,458	36,228	48,013	37,840	47,323	48,721
b) Transportadores y canales							
Familia de transporte de solutos (transportador de yoduro) 5 (Slc5a5)	35,296	31,985	25,478	47,257	26,759	48,685	36,659
Receptor sensible a calcio (CaSR)	50,827	34,914	52,644	60,662	45,480	61,878	46,955
Canal de cloro tipo CIC (CIC-5)	46,627	36,657	38,025	48,322	31,635	47,152	34,483

Resultado de Blast (Función)	Intensidad de la señal*						
	Sana	Diabética	P	FM	N	FJ	N8025
c) Factores de transcripción							
Caja polipéptido DEAD 20 (Ddx20)	24,788	19,646	31,933	30,959	33,872	38,691	33,647
Proliferador de peroxisoma activado por receptor delta (PPARD)	55,119	46,929	47,667	54,590	46,662	60,854	57,715
d) Genes hipotéticos							
Gen hipotético (clona 5)	34,454	10,055	17,279	26,838	21,562	14,369	31,658
Gen hipotético (clona 11)	40,788	34,348	41,362	23,785	33,640	29,251	27,361
Gen hipotético (clona 13)	31,477	25,955	33,333	41,069	39,297	48,707	48,696
Gen hipotético (clona 19)	31,162	19,763	36,462	33,219	36,553	34,729	35,664
Gen hipotético (clona 31)	55,117	34,845	38,188	43,644	48,624	47,235	33,328
Gen hipotético (clona 32)	55,105	30,857	38,659	41,078	47,568	46,213	48,677
Gen hipotético (clona 34)	55,018	52,901	42,108	40,666	48,704	47,052	48,619
Gen hipotético (clona 43)	47,041	42,760	39,148	26,652	48,622	47,612	34,022
e) Función desconocida							
Función desconocida (clona 1)	36,000	29,730	29,973	47,182	24,204	48,640	43,316
Función desconocida (clona 12)	33,238	25,902	18,745	40,025	15,554	37,663	20,945
Función desconocida (clona 17)	31,840	29,727	41,065	34,439	45,203	38,662	38,715
Función desconocida (clona 22)	48,477	41,275	41,644	30,427	26,024	48,656	41,425
Función desconocida (clona 26)	37,815	28,225	27,813	31,172	25,775	48,626	29,189
Función desconocida (clona 29)	40,612	23,061	30,240	46,615	37,835	47,510	45,225
Función desconocida (clona 40)	28,530	26,275	36,809	37,395	15,937	48,703	40,839
Función desconocida (clona 41)	55,104	52,986	35,564	49,344	18,695	47,604	39,634

*Los valores son expresados en unidades arbitrarias (píxeles)

Cuadro 13. Efecto del consumo de frijol cocido sobre genes sobreexpresados en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ

Resultado de Blast (Función)	Intensidad de la señal*						N8025
	Sana	Diabética	P	FM	N	FJ	
a) Genes de metabolismo							
Leucil-tRNA sintetasa (Lars)	41,666	45,409	42,448	42,814	44,482	42,057	40,735
Dedos de Zinc, tipo-DHHC 16 (Zdhhc16)	34,685	46,900	42,945	21,155	39,108	14,478	33,365
Glutación-S-transferasa (Gsta5)	61,974	70,099	80,568	80,215	76,492	81,403	80,531
Quinasa de la sintasa de glucógeno (Gsk3b)	76,356	87,322	78,966	78,456	77,480	79,062	79,489
Piruvato deshidrogenasa beta (Pdhb)	47,754	80,656	70,561	55,500	79,034	53,313	61,975
Inositol polifosfato multiquinasa (IPMK)	42,835	62,970	52,320	32,980	57,351	29,391	38,885
NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 2 (Nqo2)	78,458	79,214	79,552	77,788	80,631	79,555	78,995
Gama-glutamyltranspeptidasa 1 (Ggtp1)	27,530	46,530	65,078	55,062	65,643	54,394	65,426
Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1 (Itpr1)	40,271	44,037	45,396	45,583	45,589	45,521	45,435
Glutamato deshidrogenasa 1 (Glud1)	43,980	48,526	49,595	39,602	53,215	45,513	59,583
Fenilalanil-tRNA sintetasa, subunidad beta (Farsb)	78,474	79,394	79,410	43,211	79,293	79,416	79,536
Carbamoil-fosfato sintasa subunidad 1 (Cps1)	40,970	56,679	51,371	33,480	52,418	40,364	48,373
b) Transportadores y canales							
Transportador de solutos de aniones orgánicos (Slco6c1)	44,060	78,092	65,466	45,155	71,213	43,312	49,769
Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo 1 (Camk1)	50,328	72,116	57,541	53,408	60,587	46,441	52,997
Canal de calcio, voltaje-dependiente, tipo L, subunidad alfa 1C (Cacna1c)	60,519	82,523	71,629	47,995	74,781	49,426	61,308

Resultado de Blast (Función)	Intensidad de la señal*						
	Sana	Diabética	P	FM	N	FJ	N8025
c) Factores de transcripción							
Caja ADNP 2 (Adnp2)	39,535	77,797	46,498	66,861	43,209	41,696	43,425
Regulador de diferenciación 1 (ROD1)	39,906	78,367	79,438	40,781	72,204	45,412	48,607
Proteína de unión al elemento de respuesta de los esteroides (SREBF2)	27,183	36,164	44,279	39,838	47,062	41,369	43,758
d) Genes hipotéticas							
Gen hipotético (clona 7)	47,754	80,656	59,244	40,986	74,424	43,865	78,850
Gen hipotético (clona 9)	35,426	77,875	56,035	53,980	64,026	44,983	58,967
Gen hipotético (clona 14)	42,423	83,661	79,581	51,502	74,571	79,423	44,318
Gen hipotético (clona 24)	38,603	47,641	79,417	78,701	77,335	78,940	40,758
Gen hipotético (clona 67)	63,261	83,204	79,078	79,329	79,397	79,552	79,032
Gen hipotético (clona 75)	38,424	80,651	79,288	79,013	71,818	79,573	79,573
Gen hipotético (clona 76)	50,434	85,632	79,564	79,578	66,375	79,193	79,311
Gen hipotético (clona 80)	20,431	41641	79,077	79,384	79,362	79,303	79,582
e) Función desconocida							
Función desconocida (clona 4)	33,378	77,881	37,568	37,942	75,787	47,159	41,970
Función desconocida (clona 19)	37,912	80,433	79,586	79,421	77,604	78,915	79,216
Función desconocida (clona 71)	77,880	78,794	79,560	70,038	76,462	79,552	79,120
Función desconocida (clona 72)	58,503	77,466	79,590	70,143	79,404	79,483	79,585
Función desconocida (clona 73)	48,340	79,265	79,586	72,112	79,370	79339	79,502
Función desconocida (clona 74)	38,429	80,641	79,419	79,479	79,420	79,192	79,018
Función desconocida (clona 77)	68,440	77,858	43,181	79,534	58,681	79,193	79,545
Función desconocida (clona 78)	53,513	70,658	79,497	79,575	78,725	79,452	79,508

*Los valores son expresados en unidades arbitrarias (píxeles)

Por otro lado, con respecto a los genes que se sobreexpresaron en el riñón de ratas diabéticas se incluye el gen que codifica para la proteína inositol polifosfato multiquinasa (IPMK), cuya supresión genética disminuye el crecimiento celular (Li y col., 2004). En este experimento, la sobreexpresión de IPMK se encontró en el riñón de la condición diabética; sin embargo, las variedades FM, FJ y N8025 disminuyeron la expresión de este gen. Posiblemente, esto se relacione con una disminución de la proliferación de las células, tales como macrófagos y miofibroblastos, contribuyendo a la infiltración túbulointersticial observada en la ND. Se ha demostrado que diversas plantas y compuestos polifenólicos, como la quercetina (180 nM), pueden actuar como inhibidores de IP3K e IPMK (Mayr y col., 2005) y, considerando que los frijoles evaluados en este estudio mantienen cierta concentración de compuestos fenólicos, estos podrían contribuir a dicho efecto.

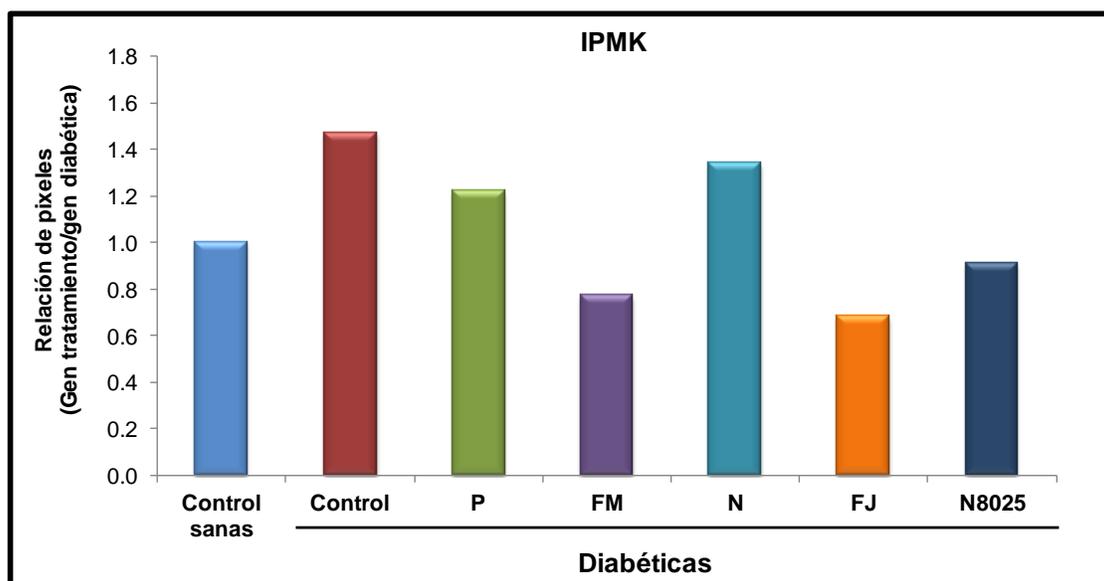


Figura 41. Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre la expresión renal de IPMK en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ.

IPMK: Inositol polifosfato multiquinasa, P: peruano, FM: Flor de Mayo, N: Negro, FJ: Flor de Junio, N8025: Negro 8025.

La sobreexpresión de CPS1 en el riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ no ha sido previamente descrita. Hay dos tipos de CP sintetasas: una enzima mitocondrial, CPS-I, que sintetiza CP destinado para su inclusión en el ciclo de la urea, y una CP sintetasa citosólica (CPS-II), que está involucrada en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina. CPS-I es positivamente regulada por el efector alostérico N-acetilglutamato, mientras que la enzima citosólica es independiente de acetilglutamato. Por otro lado, Kötggen y colaboradores (2010) reportaron que las CPS1 están asociadas con la enfermedad renal crónica, específicamente con la producción de creatinina. En el presente estudio, el gen *CPS1* se encontró sobreexpresado en los animales diabéticos, pero el consumo de la variedad FM y FJ disminuyó la expresión génica de CPS1, lo que sugiere que el frijol podría regular la producción de creatinina.

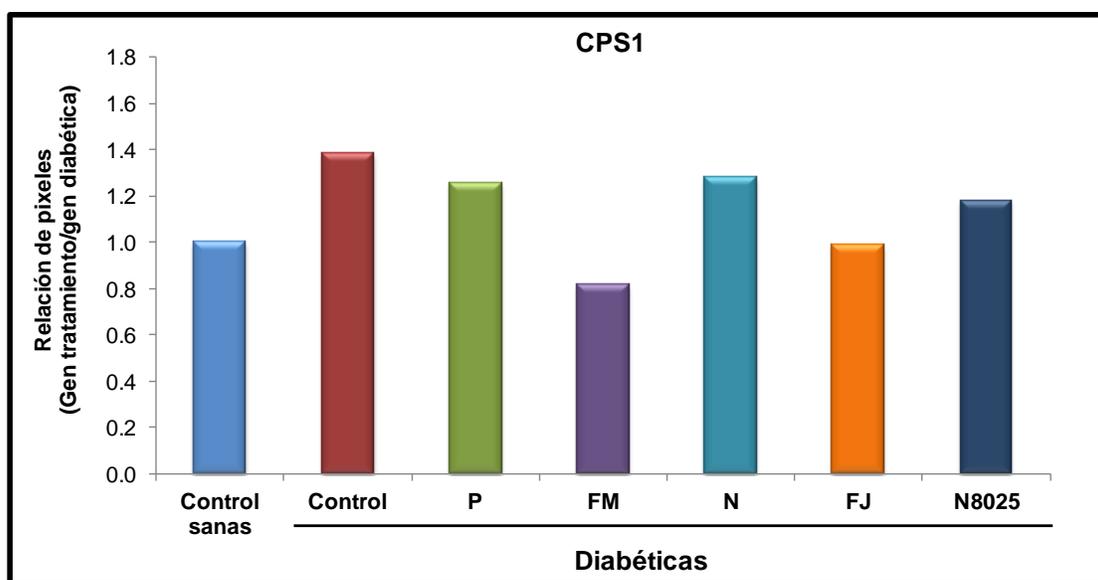


Figura 42. Efecto del consumo de diferentes variedades de frijol cocido sobre CPS1 en riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ.

CPS1: carbamoil fosfato sintasa subunidad 1, P: Peruano, FM: Flor de Mayo, N: Negro, FJ: Flor de Junio, N8025: Negro 8025.

9. CONCLUSIONES

En los bancos del riñón de ratas diabéticas se encontraron genes, reprimidos y otro sobreexpresados cuyas funciones incluyen, metabolismo del nitrógeno, transporte de iones y factores de transcripción relacionados con la inflamación.

El consumo de frijol disminuyó los niveles de glucosa en ratas diabéticas y parte de estos efectos podrían explicarse a través de la secreción de insulina, sin embargo, podrían estar involucrados otros mecanismos hipoglucemiantes.

El consumo de frijol cocido tuvo un efecto benéfico sobre las alteraciones renales relacionadas con la diabetes, y algunas variedades pudieran disminuir estas alteraciones por efectos independientes a la disminución de los niveles de glucosa y al control del estrés oxidativo en el riñón.

La concentración total de fenoles, taninos condensados y antocianinas no muestran una relación directa con la protección renal, por lo que posiblemente el perfil de fenoles o algún otro componente del frijol podrían influir en este beneficio

En este estudio se reporta por primera vez la sobreexpresión de CPS1 en el riñón de ratas diabéticas inducidas con STZ, y el consumo de la variedad FM y FJ disminuyó la expresión génica de CPS1, lo que sugiere que el frijol podría regular la producción de creatinina en animales diabéticos.

La regulación más importante producida por las variedades de frijol FM y FJ, fueron las correspondientes a los transcritos de glutamino sintetasa, receptor extracelular de calcio, arginino succinato liasa e inositol polifosfato multiquinasa, los cuales están relacionados con diferentes funciones metabólicas del riñón,

La evidencia molecular obtenida mediante la técnica de SSH identificó nuevos genes candidatos que podrían considerarse como blancos moleculares relacionados con las alteraciones renales en la diabetes, los cuales pueden ser regulados por el consumo de las variedades de frijol común.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- Adams, S. M., Standridge, J. B. 2006. What should we eat? Evidence from observational studies. *South Med. J.* 99:744-748.
- Afman, L., Müller, M. 2006. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 106:569-576.
- Aggarwal, K., Kelvin, H. L. 2003. Functional genomics and proteomics as a foundation for systems biology. *Briefings in functional genomics and proteomics.* 2:175-184.
- Agnès, C., Ola, K., Hélène, D., Michelle, B., Mireille, M., Bernard, F., Gabriel, B. 2003. Inhibition of glutamine synthetase in the mouse kidney. *J. Biol. Chem.* 40:38159–38166.
- Agostini, L. R., Morón, M. J., Ramón, A. N., Ayala, A. 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *ALAN.* 54:89-92.
- Aguilar, A., Rull, J. A., García, E., Zúñiga, S., Vázquez, C., Palacios, A., Frati, A., Altamirano, E., Herrera, M., Rosas, J. 2000. Consenso mexicano para la prevención de las complicaciones crónicas de la diabetes tipo 2. *Res. Invest. Clin.* 52:325-363.
- Aguilar Raymundo, V. G. 2008. Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) sobre células normales intestinales tratadas con TNF- α . Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

- Aguilar-Salinas, C. A., Velázquez Monroy, O., Gómez-Pérez, F. J., González Chávez, A. G., Esqueda, A. L., Molina Cuevas, V. 2003. Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care*. 26:2021-2026.
- Akbarzadeh, A., Norouzzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S. H., Farhangi, A., Verdi, A. A., Mofidian, S. M. A., Lame-Rad, B. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Ind. J. Clinic. Biochem*. 22:60-64.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Biología Molecular de la célula. Capítulo I: Intriducción a La célula*. 5ta. Edición. Editorial Omega.
- Aparicio-Fernández, X., Yousef, G. G., Loarca-Piña, G., De Mejía, E., Lila, M. A. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem*. 53:4615–4622.
- Aronson, D. 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol*. 45:1-16.
- Arreola Ortíz, J. F., Partida Hernández, G. 2005. *Diabetes Mellitus. “Etiopatogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1”*. Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección II. Cap. 5. p. p. 109-119.
- Atlas de la diabetes. Ian, N. Scobie, M. D. 2002. *Medway maritime hospital*. 2a. edición. *The encyclopedia*. 7-31.
- Ávila-Curiel, A., Shamah-Levy, T., Galindo-Gómez, C., Cuevas-Nasu, L., Moreno-Macías, H. Chávez-Villasana, A. 2007. Diabetes mellitus within low socioeconomic strata in Mexico City: a relevant problem. *Rev. Invest. Clin*. 59:246-255.

- Awad, A. S., Huang, L., Ye, H., Duong, E. T., Bolton, W. K., Linden, J., Okusa, M. D. 2006. Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290:828-837.
- Bennett, P. H., Knowler, W. C. 2001. Diabetes Mellitus. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and Glucose Metabolism. 13th edition. C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir; eds. Philadelphia; Lea & Febiger. 19:331-339.
- Beckman, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P. G., Chen, J., Accavitti, M. A., Tapey, M. M. 1994. Extensive nitration of protein tyrosine in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe. Seylee.* 375:81-85.
- Böttinger, E. R., Bitzer, M. 2002. TGF- β signaling in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:2600-2610.
- Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. 1998. Principios de medicina interna Harrison. 15^a edición. Editorial Mc. Graw-Hill. p. p. 2467-2487.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-819.
- Caramori, M. L., Mauer, M. 2003. Diabetes and nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12:273-282.
- Cardador-Martínez, A.; Loarca-Piña, G.; Oomah, B. D. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975-6980.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005. Actividad antioxidante en seis cultivares de frijol común. Participación de la mujer en la ciencia.

- Cardador-Martínez, A., Albores, A., Bah, M., Calderón-Salinas, V., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R., Shimada-Miyasaka, A. Loarca-Piña G. 2006. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Foods Hum. Nutr.* 61:161-168.
- Cavallé de Moya, C., Grant, G., Frühbeck, G., Urdaneta, E., García, M., Marzo, F., Santirdrián, S. 2003. Local (gut) and systemic metabolism of rats is altered by consumption of raw bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *athropurpurea*). *Br. J. Nutr.* 89:311-318.
- Ceballos, I., Chauveau, P., Guerin, V., Bardet, J., Parvy, P., Kamoun, P., Jungers, P. 1990. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta.* 188:101–108.
- Chen, G. F., Baylis, C. 2010. *In vivo* renal arginine release is impaired throughout development of chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298:95–102.
- Chen, G., Yang, Y., Fröhlinch, O., Klein, J. D., Sands, J. M. 2010. Suppression subtractive hybridization analysis of low-protein diet- and vitamin D-induced gene expression from rat kidney inner medullary base. *Physiol Genomics.* 41:203-211.
- Chou-Long, H., Kuo, E. 2007. Mechanism of disease: WNK-ing at the mechanism of salt-sensitive hypertension. *Nature.* 3:623-630.
- Chmielewski, M., Sucajty-Szulc, E., Kossowska, E., Swierczynski, J., Rutkowski, B., Boguslawski, W. 2007. Increased gene expression of liver *SREBP-2* in experimental chronic renal failure. *Atherosclerosis.* 191:326–332.
- Coffman, T. M. 2006. A WNK in the kidney controls blood pressure. *Nature Genetics.* 38:1105-1106.

- Cutrín, J. C., Zingaro, B., Camandola, S., Boveris, A., Pompella, A., Poli, G. 2000. Contribution of gamma glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney. *Kidney Int.* 57:526–533.
- Dalla, V. M., Saller, A., Bortoloso, E., Mauer, M., Fioretto, P. 2000. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab.* 26:8–14.
- Dembinska-Kiec, A., Mykkänen, O., Kiec-Wilk, B., Mykkänen, H. 2008. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.* 99:109-117.
- Desphande, S. S., Cheryan, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* 52:332-334.
- Devaraj, S., Venugopal, S. K., Singh, U., Jialal, I. 2005. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c-alpha and -beta. *Diabetes.* 54:85-91.
- Diatchenko L., Lau, Y. F., Cambell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:6025-6030.
- Díaz Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C. Jr., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. 2006. Chemical components and health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54:2045-2052.
- DiPetrillo, K., Coutermarsh, B., Gesek, F. A. 2003. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284:113-121.

- Douglas, E., Pooler, J. 2006. Fisiología renal de vander. Serie LANGE de Fisiología. Editorial McGraw Hill. Sexta Edición. México.
- Dubinina, E. E., Burmistrov, S. O., Khodov, D. A., Porotov, I. G. 1995. Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. Vopr. Med. Khim. 41:24-26.
- El-Tantawy, W. H., Hassanin, L. A. 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of alcoholic extract of *Tribulus alatus* in streptozotocin-induced diabetic rats: a comparative study with *T. terrestris* (Caltrop). Indian J. Exp. Biol. 45:785-790.
- Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., Paredes-López, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). J. Agric. Food Chem. 54:4436-4444.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. 2002. Stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 Diab. Endocr. Rev. 23:599–622.
- Federación Mexicana de Diabetes. 2003. Control total de la diabetes para el médico tratante. Editorial Intersistemas, S. A. de C. V. México, D. F.
- Figuerola, D. 1999. Diagnóstico en: Diabetes. Ed. Masson, Barcelona, España: 29, 30.
- FIRA. 2001. El frijol en México, competitividad y oportunidades de desarrollo.” Boletín Informativo 316.
- Flores Martínez, S. E., Machorro Lozano, M. V., García Zapién, A. G., López Cardona, M. G., Morán Miguel, M. C., Sánchez Corona, J. 2005. Diabetes Mellitus. “Epidemiología molecular en la diabetes mellitus y sus complicaciones”. Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 3. p. p. 35-69.

- Foster-Powell, K., Holt, S. H. A., Brand-Miller, J. C. 2002. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:5-56.
- Forbes, J. M., Coughlan, M. T., Cooper, M. E. 2008. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 57:1446-1454.
- Funk, J. A., Odejinmi, S., Schnellmann, R. G. 2010. SRT1720 induces mitochondrial biogenesis and rescues mitochondrial function after oxidant injury in renal proximal tubule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333:593–601.
- Gal, I. B., López-Gallardo, M., Martín-Velasco, A. I., Prieto-Montalvo, J. 2007. *Bases de la fisiología. Capítulo 9: fisiología renal.* 2da. Edición. Editorial Tébar.
- Geibel, J. P. 2010. The calcium-sensing receptor. *J. Nephrol.* 16:130–135.
- Gill, P. S., Wilcox, C. S. 2006. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid. Redox Signal.* 8:1597-1607.
- Guía Mexicana de Diabetes. Dr. Joel Rodríguez Saldaña. 2005.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Paredes-López, O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America, quinoa, common beans and botanicals. *Functional Foods Biochemical and processing Aspects.* Edit. Technomic, Lancaster. p.p. 239-328.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139.
- Hao, C. M., Redha, R., Morrow, J., Breyer, M. D. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress. *J. Biol. Chem.* 277:21341–21345.

- Hayes, M. G., Pluzhnikov, A., Miyake, K., Sun, Y., Ng, M. C., Roe, C. A., Below, J. E., Nicolae, R. I., Konkashbaev, A., Bell, G. I., Cox, N. J., Hanis, C. L. 2007. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes*. 56:3033-3044.
- Hernández-Salazar, M., Osorio-Díaz, P., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., Tovar, J., Bello-Pérez, L. A. 2010. In vitro fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *J. Sci. Food Agric*. 90:1417-1422.
- Hicks, J. J., Medina, S. R. 2001. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. *Bioquímica*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. p.p. 411-433.
- Iniestra-González, J. J., Ibarra-Pérez, F. J., Gallegos-infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo R. F. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39:603-610.
- Islas Andrade, S., Revilla Monsalve, M. C. 2005. Diabetes Mellitus. "Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 1. p.p. 3-20.
- Iwashima, Y., Horio, T., Suzuki, Y., Kihara, S., Rakugi, H., Kangawa, K., Funahashi, T. Ogihara, T., Kawano, Y. 2006. Adiponectin and inflammatory markers in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*. 188:384-390.
- Jawl, H., Tsu, W., Chou, S. C. 2008. Development of multiple complications in type 2 diabetes is associated with the increase of multiple markers of chronic inflammation. *J. Clin. Lab. Anal*. 22:6-13.

- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116:1784-1792.
- Kanwar, Y. S., Wada, J., Sun, L., Xie, P., Wallner, E. I., Chen, S., Chugh, S., Danesh, F. R. 2008. Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Renal Disease Progression. *Exp. Biol. Med.* 233:4-11.
- Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., Athar, M. 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J. Ethnopharm.* 108:340-348.
- Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y. 2007. Transcriptomics resources for functional genomics. *Briefings in functional genomics and proteomics.* 6:171-179.
- Kędziora, K.; Szram, S.; Kornatowski, T. 2003. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron. Exp. Nephrol.* 95:134-143.
- King, G. L. 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J. Periodontol.* 79:1527-1534.
- King, S. S. 1991. Líquidos corporales y análisis de orina. Función y enfermedades del riñón. Ed. El manual moderno. México, D.F. p.p. 23-25.
- Klimes, I., Haffner, S. M., Seböková, E., Howard, B. V., Storlien, L. H. 1997. Lipids and syndromes of insulin resistance. Regulation of lipolysis. Ed. Staff. New York, NY. p.p. 204-205.
- Köttgen, A., Pattaro, K., Böger, C. A., Fuchsberger, C., Olden, M., Glazer, N. L. 2010. Multiple New Loci Associated with Kidney Function and Chronic kidney disease: The CKDGen consortium. *Nat. Genet.* 42:376-384.

- Lahera, V., Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., Garcia-Estaño, J., Ruilope, L. M. 1997. Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 10:129-140.
- Lea-Yea, C., Jinn-Yuh, G. 2001. Extracellular signals and intracellular pathways in diabetic nephropathy. *Nephrology.* 6:165-172.
- Lemieux, G., Baverel, G., Vinay, P., Wadoux, P. 1976. Glutamine synthetase and glutamyltransferase in the kidney of man, dog, and rat. *Am. J. Physiol.* 4:1068–1073.
- Letavernier, E., Perez, J., Joye, E., Bellocq, A., Fouqueray, B., Haymann, J. P., Heudes, D., Wahli, W., Desvergne, B., Baud, L. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ exerts a strong protection from ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:2395–2402.
- Li, S., Wu, P., Yarlagadda, P., Vadjunec, N. M.; Proia, A. D., Harris, R. A., Portilla, D. 2004. PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286:572–580.
- Li, L., Techel, N. G., Hildebrandt, A. 2005. A novel transcriptome subtraction method for the detection of differentially expressed genes in highly complex eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 36:e136.
- Lin, S., Chugh, S., Pan, X., Wallner, E. I., Wada, J., Kanwar, Y. S. 2001. Identification of up-regulated Ras-like GTPase, Rap1b, by suppression subtractive hybridization. *Kindney Int.* 60:2129-2141.
- Liang, P., Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257:967-971.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946-951.

- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50:2926-2930.
- Lockless, S. W., Zhou, M., MacKinnon, R. 2007. Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K⁺ channel. *Plos. Biol.* 5:121.
- Lomas Soria, M. C. 2008. Efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cocido sobre citocinas proinflamatorias relacionadas con daño renal en ratas diabéticas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maag, D., Maxwell, M. J., Hardesty, D. A., Boucher, K. L., Choudharib, N., Hannob, A. G., Mab, J. F., Snowmana, A. S., Pietropaolia, J. W., Xua, R., Stormb, P. B., Saiardid, A., Snydera, S. H., Resnickb, A. C. 2010. Inositol polyphosphate multikinase is a physiologic PI3-kinase that activates Akt/PKB. *Cell Biology.* 108:1391-1396.
- Mahan, K., Escott S. 1996. *Nutrición y dietoterapia de Krause.*
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Tox.* 17:24-38.
- Martínez-González, J., Llorente-Cortes, V., Badimon, L. 2001. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev. Esp. Cardiol.* 54:218-231.
- Martínez-González, M. A., de la Fuente-Arrillaga, C., Nunez-Cordoba, J. M., Basterra-Gortari, F. J., Beunza, J. J., Vazquez, Z., Benito, S., Tortosa, A., Bes-Rastrollo, M. 2008. Adherence to Mediterranean diet and Risk of Developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ.* 336:1348-1351.

- Mathias, R. S., Nguyen, H. T., Zhang, M. Y., Portale, A. A. 1998. Reduced expression of the renal calcium-sensing receptor in rats with experimental chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:2067–2074.
- Mayr, G. W., Windhorst, S., Hillemeier, K. 2005. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J. Biol. Chem.* 280:13229-13240.
- McCormick, J. A., Ellison, D. H. 2011. The WNKs: Atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol. Rev.* 91:177–219.
- Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories. *Nat. Rev. Cancer.* 4:61–70.
- Moreno-Altamirano, L. 2001. Epidemiología y Diabetes. *Medicina actual. Rev. Fac. Med. UNAM.* 44:35-37.
- Muntaner, J. A., Luciardi, H. E., Altman, R. 1999. Atherosclerosis: ¿por qué una enfermedad inflamatoria?. Parte I. Fundamentos, marcadores, biología molecular. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 28:201-216.
- Navarro, J. F., Mora-Fernandez, C. 2006. The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:441:450.
- Nawroth, P., Borcea, V., Bierhaus, V., Joswig, M., Schiekofer, S., Tritschler, H. J. 2000. Oxidative stress, NFκB activation, and late diabetic complications. *Antioxidants in diabetes management.* Edit. Marcel Dekker, Inc. 13:185-200.
- O'Connor, T. P., Crystal, R. G. 2006. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature reviews.* 7:261-276.

- O'Connor, A. S., Schelling, J. R. 2005. Diabetes and the kidney. *Am. J. Kidney Dis.* 46:766–773.
- Omotayo, O. E., Siti, A. S., Mohd, S. A. W., Sirajudeen, K. N. S., Md, S. M. S., Sunil, G. 2011. Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metmorfin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 12:829–843.
- Okada, Y., Okada, M., Sagesaka, Y. 2010. Screening of dried plant seed extracts for adiponectin production activity and tumor necrosis factor-alpha inhibitory activity on 3T3-L1 adipocytes. *Plant Food Hum. Nutr.* 65:225-232.
- Paredes López, O., Valverde, M. E. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV.* 65-73.
- Pari, L., Venkateswaran, S. 2003. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes. *Pharmazie.* 58:916-919.
- Permutt, M. A., Wasson, J., Cox, N. 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *J. Clin. Invest.* 115:1431-1439.
- Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepsevic, M. 2001. Effect of “antidiabetics” herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J. Ethnopharmacol.* 75:181.
- Pryor, W. 1991. The antioxidant nutrients and disease prevention, what do we know and what do we need to find out?. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:591-593.
- Ramesh, B., Saravanan, R., Pugalendi, K. V. 2006. Effect of dietary substitution of ground oil on blood glucose, lipid profile, and redox status in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacol. Rep.* 3:339-348.

- Ramos Rodríguez, H. G., Domingo Méndez, J. 1994. Diabetes Mellitus Experimental. *Ciencia Vet.* p. p. 347-360.
- Raptis, A., Viberti, G. 2001. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 109:424-437.
- Retel, J., Hoebee, B., Braun, J., Lutgerink, J., Van den Akker, E., WanamartaH. 1993. Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat. Res;* 165-182.
- Reusch, J. E. B. 2003. Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?. *J. Clin. Invest.* 112:986-988.
- Reutens, A. T., Atkins, R. C. 2011. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib. Nephrol.* 170:1–7.
- Rhee, S. J., Kim, M. J., Kwag, O. G. 2002. Effects of green tea catechin on prostaglandin synthesis of renal glomerular and renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11:232-6.
- Ribeiro, M. O., Antunes, E., De Nucci, G., Lovisoló, S. M., Zatz, R. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 20:298-303.
- Rivera, J. A., Barquera, S., Gonzalez-Cossio, T., Olaiz, G., Sepulveda, J. 2004. Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr. Rev.* 62:149-157.
- Rodríguez Morán, M., Guerrero Romero, J. F. 2005. Diabetes Mellitus. "Inflamación y diabetes". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección IV. Cap. 11. p. p. 215-217.
- Román-Ramos, R., Flores-Sáenz, J. L., Alarcón-Aguilar, F. J. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* 48:25-32.

- Rossini, A. A., Liket, A. A., Chick, W. I., Appelt, M. C., Cahill, J. F. 1977. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 2485-2489.
- Ruan, H., Zarnowski, M. J., Cushman, S. W., Lodish, H. F. 2003. Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. *J. Biol. Chem.* 278:47585-47593.
- Rull, J. A., Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Ríos-Torres, J. M., Gómez-Pérez, F. J., Olaiz, G. 2005. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch. Med. Res.* 36:188-196.
- Rutledge, J. C., Ng, K. F., Aung, H. H., Wilson, D. W. 2010. Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology.* 6:361-370.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Silveira, D. 2012. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 15:141-183.
- Salido, E., Hernández, D., Torres, A. 2001. Avances moleculares y terapéuticos en la diabetes: perspectivas de futuro. *Nefrología.* 21:112-120.
- Santangelo, C., Varí, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesì, C., Masella R. 2007. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann. Ist. Super Sanita.* 43:394-405.
- Saran, M., Bors, W. 1990. Radical reactions in vivo: An overview. *Radiat. Environ. Biophys.* 29:249-262.
- Savickiene, N., Dagilyte, A., Lukosius, A., Zitkevicius, V. 2002. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus. *Medicina, Kaunas.* 10:970-975.

- Secretaría de Salud, Dirección General de Evaluación del Desempeño, Dirección General de Información en Salud, Subsecretaría de Innovación y Calidad. 2004. Salud: México. p.p. 46-47.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 2:192-205.
- Serrano, J., Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *ALAN* 54:1.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287-306.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270:467-470.
- Shimoi, K., Okitsu, A., Green, M. H., Lowe, J. E., Ohta, T., Kaji, K., Terato, H., Ide, H., Kinae, N. 2001. Oxidative DNA damage induced by high glucose and its suppression in human umbilical vein endothelial cells. *Mutat. Res.* 480:371–378.
- Schirijvers, B. F., Vriese, A. N., Flyvbjerg, A. 2004. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr. Rev.* 25:971–1010.
- Schultz, J., Harris, A., Rychly, D., Ergul A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic Science to clinical practice. *Rev. Bio. Central.* p.p. 1-11.
- Schultz, L., Bennett, P., Ravussin, E., Kidd, J., Kidd, K. Esparza, J. Valencia, M. 2006. Effects of traditional and Western environments on prevalence of type

- 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes care.* 29:1866-1871.
- Sharma, K. 2008. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J. Clin. Invest.* 118:1645-1656.
- Singh, D. K., Farrington, K. 2010. The tubulointerstitium in early diabetic nephropathy: Prime target or bystander. *Int. J. Diabetes Dev. Ctry.* 30:185–190.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Reventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299:152-178.
- Stienstra, R., Duval, C., Muller, M., Kersten, S. 2007. PPARs, Obesity and Inflammation. *PPAR Res.* 23:5974-5978.
- Stanton, R. C. 2011. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr. Diab. Rep.* 11:330-336.
- Subramanian, V., Leelavinothan, P. 2002. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 11:206-209.
- Szolkiewicz, M., Chmielewski, M., Nogalska, A., Stelmanska, E., Swierczynski, J., Rutkowski, B. 2007. The potential role of sterol regulatory element binding protein transcription factors in renal injury. *J. Ren. Nutr.* 17:62–65.
- Targos, B., Barańska, J., Pomorski, P. 2005. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim. Pol.* 52:397–409.

- Tao, J., Scott, E. L., Scott, L., Jinping, L., Moshe, L. 2005. Role of altered renal lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease. *Kidney Int.* 68:2608–2620.
- Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.* 2:99-116.
- Turk, H. M., Sevinc, A., Camci, C., Cigli, A., Buyukberber, S., Savli, H., Bayraktar, N. 2002. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 3:117-122.
- Userpater, M., Inserra, F. 2004. Pérdida de proteínas urinarias como marcador de daño renal no glomerular y de riesgo cardiovascular. *Rev. Nefrol. Dial. Transpl.* 24:81-86.
- Van Der Berg, R., Haenen, G. R. M., Van Der Berg, H. B. A. 1999. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66:511-517.
- Vega, S., Devaraj, S., Jialal, L. 2004. Oxidative stress and antioxidant supplementation in the management of diabetic cardiovascular disease. *J Invest Med.* 52:24-32.
- Velculescu, E. V., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler W. K. 1995. Serial Analysis of Gene Expression. *Science.* 270:484-487.
- Venkateswaran, S., Pari, L., Saravanan, G. 2002. Effect of *Phaseolus vulgaris* on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Med. Food.* 5:97-103.
- Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 135:357-364.

- Vilar-Rojas, C., Guzman-Grenfell A. M., Hicks J. J. 1996. Participation of oxygen-free radical in the oxido-reduction of protein. Arch. Med. Res. 27:1-6.
- Wada, J., Sun, L., Kanwar, Y. S. 2011. Discovery of genes related to diabetic nephropathy in various animal models by current techniques. Contrib. Nephrol. 169:161–174.
- Wade, J. B., Fang, L., Liu, J., Dimin, L., Chao-Ling, Y., Arohan, R. S., Djikolngar, M., Mason, A., Ellison, D.H., Welling, P. A. 2006. WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. PNAS, 103:8558-8563.
- Wahle, K. W., Caruso, D., Ochoa, J. J., Quiles, J. L. 2004. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. Lipids. 39:1223-1231.
- Wang, Y., Mishra, R., Simonson, M. S. 2003. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II stimulates *c-fos* transcription and DNA synthesis by a Src-based mechanism in glomerular mesangial cells. J. Am. Soc. Nephrol. 14:28–36.
- Wendel, A., Feurstein, S., Konz, K. H. 1979. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. Bioch. Phar. 28:2051-2055.
- Williams, M. D., Nadler, J. L. 2007. Inflammatory mechanism of diabetic complications. Curr. Diab. Rep. 7:242-248.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G, L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44:275-295.
- Wilson, G. L., Leiter, E. H. 1990. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 156:27-54.
- Wiseman, M. J., Saunders, A. J., Keen, H., Viberti, G. 1985. Effect of blood glucose on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes. New England J. Med. 312:617-621.

- Wolf, G. 2004. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from hemodynamics to molecular pathology. *Eur. J. Clin. Invest.* 34:785–796.
- Wolf, G., Chen, S., Ziyadeh, F. N. 2005. From the periphery of glomerular capillary wall toward the center of disease. *Diabetes.* 54:1626–1634.
- Xu, B. J., Yuan, S. H., Chang, S. K. 2007. Comparative studies on the antioxidant activities of nine common food legumes against copper-induced human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Food Sci.* 7:522-527.
- Xu, B., Chang, K. 2008. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *J. Food Sci.* 73:19-27.
- Xu, B., Chang, S. K. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 11:4754-4764.
- Yamabe, N.; Yokozawa, T.; Oya, T.; Kim, M. 2006. Therapeutic potential of (–)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 9:228–236.
- Yamagishi, S., Fukami, K., Ueda, S., Okuda, S. 2007. Molecular mechanism of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug. Targets.* 8:952-959.
- Yang, T., Michelle, D. E., Park, J., Smart, A. M., Lin, Z., Brosius, F. C., Schnermann, J. B., Briggs, J. P. 1999. Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277:966–973.
- Yeh, C., Yeh, G. 2003. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51:1474-1479.

- Yokozawa, T., Yamabe, N., Kim, N., Kim, H. Y., Kang, K. S., Hur, J. M., Park, C. H., Tanaka, T. 2008. Protective effects of morrisonide isolated from Corni Fructus against renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 31:1422-1428.
- Young, E. C., Soo, K. A., Won, T. L., Jong, E. L., Seung, H. P., Bang, B. Y., Kyung, A. P. 2010. Soybeans ameliorate diabetic nephropathy in rats. *Evid. Based. Complement. Alternant. Med.* 7:433-440.
- Young, I. S., Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54:176-86.
- Zhen, L., Hao-Ran, W., Chou-Long, H. 2009. Regulation of ROMK channel and K⁺ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. *J. Biol. Chem.* 284:12198–12206.