

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS**

**Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas**

**Verónica Elina Di Loreto**

---

**EFFECTOS DE LA INSULINA Y LA GLUCOSA SOBRE  
LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO EN LA DIABETES  
EXPERIMENTAL**

---

**Directora: Dra. Martha E. Locatto**

Cátedra de Química Biológica, Departamento de Ciencias

Fisiológicas. Facultad de Ciencias Médicas. U.N.R.

Año 2003

## INDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>1.1. IMPORTANCIA Y ROL DEL FOSFATO</b>	<b>2</b>
1.1.2. Distribución del fosfato en el organismo	3
<b>1.2. HOMEOSTASIS DEL FOSFATO</b>	<b>5</b>
1.2.1. Importancia de la reabsorción renal de fosfato en la homeostasis del anión	8
1.2.2. Absorción intestinal de fosfato	9
<b>1.3. FUNCION RENAL Y METABOLISMO DEL FOSFATO</b>	<b>10</b>
1.3.1. Transporte renal de fosfato	10
1.3.1.1. Filtración glomerular	11
1.3.1.2. Reabsorción tubular	11
1.3.1.3. Medición de la reabsorción	12
1.3.1.4. Localización	13
1.3.1.5. Mecanismos moleculares del transporte tubular de fosfato	14
1.3.1.6. Transporte a través de la membrana apical	15
1.3.2. Factores reguladores del transporte renal de fosfato	16
1.3.2.1. Hormona paratiroidea (PTH)	17
1.3.2.2. Insulina	18
1.3.3. Fosfato y glucosa	20

<b>1.4. DIABETES</b>	21
1.4.1. Definición	21
<b>1.5. MODELO EXPERIMENTAL: DIABETES POR ALOXANO</b>	22
1.5.1. Inducción química de la diabetes	23
1.5.1.1. Aloxano	23
<b>1.6. DIABETES Y FOSFATO</b>	26
<b>1.7. DIABETES Y HORMONAS</b>	28
<b>1.8. DIABETES Y RIÑÓN</b>	29
<b>CAPITULO 2: OBJETIVOS</b>	33
<b>CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS</b>	36
<b>3.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS</b>	36
3.1.1. Animales	36
3.1.2. Modelo experimental: diabetes inducida por aloxano	36
<b>3.2. TECNICAS</b>	37
3.2.1. Hemodinamia renal	37
3.2.1.1. Preparación y cirugía de los animales	37
3.2.1.2. Estudio de la función renal: medición de la velocidad de filtración glomerular y del flujo plasmático renal. Tamaño renal	40
3.2.1.3. Medición del volumen del líquido extracelular (VEC)	41
3.2.1.4. Medición de la actividad del sistema renina-angiotensina	42
<b>3.2.2. Estudio de la función paratiroidea</b>	43

<b>3.2.3. Efecto de la hiperglicemia y/o el déficit de insulina sobre la reabsorción renal de fosfato</b>	47
3.2.3.1. Administración de insulina a ratas diabéticas	47
3.2.3.2. Preparación y cirugía de los animales	47
3.2.3.3. Reabsorción tubular de glucosa y fosfato	48
<b>3.3. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS</b>	49
3.3.1. Contenido de fosfato en los tejidos blandos	49
3.3.2. Análisis del mineral y matriz óseos	50
<b>3.4. TECNICAS ANALITICAS</b>	50
<b>3.5. ANALISIS DE LOS RESULTADOS</b>	51
<b>CAPITULO 4: RESULTADOS</b>	52
<b>4.1. HEMODINAMIA RENAL</b>	52
4.1.1. Efecto de la glucosa	52
4.1.2. Tamaño renal	56
4.1.3. Volumen extracelular	58
4.1.4. Sistema renina-angiotensina	61
<b>4.2. HORMONA PARATIROIDEA Y FOSFATO</b>	62
<b>4.3. EFECTO DE LA GLUCOSA Y/O EL DEFICIT DE INSULINA SOBRE LA REABSORCION RENAL DE FOSFATO</b>	64
4.3.1. Administración de insulina a ratas diabéticas	64
4.3.2. Reabsorción tubular de glucosa y fosfato	65

<b>4.4. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS</b>	70
4.4.1. Contenido de fósforo en los tejidos blandos	70
4.4.2. Análisis del mineral y matriz óseos	71
<b>CAPITULO 5: DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	73
<b>5.1. ESTUDIO DE LA HEMODINAMIA RENAL</b>	73
5.1.1. Efecto de la glucosa	75
5.1.2. Volumen extracelular	78
5.1.3. Sistema renina-angiotensina	80
5.1.4. Tamaño renal	81
<b>Conclusiones</b>	82
<b>5.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA FUNCION PARATIROIDEA</b>	83
<b>Conclusiones</b>	86
<b>5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERGLICEMIA Y/O EL DEFICIT DE INSULINA SOBRE LA REABSORCION RENAL DE FOSFATO</b>	87
<b>Conclusiones</b>	93
<b>5.4. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS</b>	94
<b>Conclusiones</b>	97
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b>	98
<b>CAPITULO 6: BIBLIOGRAFÍA</b>	99
<b>ABREVIATURAS</b>	118
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	120

<b>INDICE DE TABLAS</b>	122
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	123

a Raúl y Martina

a mamá, papá y Mariela

## RESUMEN

La diabetes está asociada a pérdidas urinarias de fosfato. Los objetivos generales de esta tesis fueron identificar los mecanismos afectados por la insulina y la glucosa en relación al manejo renal de fosfato en la diabetes experimental y estudiar la repercusión de las pérdidas urinarias en la homeostasis del fosfato.

Como modelo se utilizó la diabetes inducida por aloxano en la rata. Se estudiaron: las variables hemodinámicas renales, función paratiroidea, efecto de la hiperglicemia y del déficit de insulina sobre el manejo renal de fosfato. Se analizó la repercusión de las pérdidas urinarias de fosfato en tejidos representativos.

Nuestros hallazgos indican que en las ratas diabéticas por aloxano:

- La gran cantidad de glucosa excretada en orina compite con el fosfato por los mecanismos reabsortivos. La hiperfosfaturia coexiste con niveles variables de insulina y es corregida disminuyendo la sobrecarga de glucosa al túbulo renal.
- La hiperfosfaturia no puede atribuirse a:
  - Alteraciones en la filtración glomerular. Esta disminuye en las ratas diabéticas.
  - Niveles elevados de la hormona paratiroidea. La extirpación de la glándula paratiroidea acentúa la hiperfosfaturia.
- Los tejidos blandos y el hueso pierden fosfato en relación a la severidad de la diabetes.
- Los niveles plasmáticos de fosfato se mantienen dentro del rango normal debido a la disminución en la reabsorción tubular causada por la gran oferta de glucosa.

## 1.INTRODUCCION

---

### 1.1. IMPORTANCIA Y ROL DEL FOSFATO

El fósforo<sup>1</sup> (P) es el sexto elemento más abundante del cuerpo humano y es componente de sustancias de gran importancia funcional tanto desde el punto de vista estructural como metabólico.

En un organismo adulto forma parte de la fase mineral del hueso como cristal de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . El resto se encuentra formando ésteres orgánicos, anhídridos de ácidos dentro de moléculas y también como ión fosfato libre. Todos estos compuestos están presentes en la constitución de estructuras celulares e intervienen en diversas etapas de vías metabólicas. El fosfato es un nutriente esencial y participa en los procesos de glucólisis y fosforilación oxidativa, entre otros.

Durante el crecimiento, la concentración extracelular de fosfato se mantiene a niveles mayores que durante la vida adulta lo que sugiere que es esencial para la proliferación celular y la mineralización del esqueleto. Recientemente, se ha implicado al fosfato inorgánico como determinante esencial del crecimiento y replicación celular, al ser un factor limitante en la estimulación de la síntesis de ADN por agentes mitogénicos (1, 2).

---

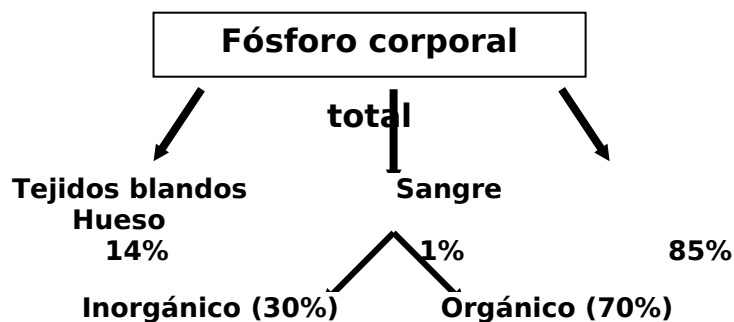
<sup>1</sup> El término "fósforo" se refiere al elemento P. El fósforo participa en los procesos fisiológicos y bioquímicos del organismo como anión "fosfato". El fosfato contenido en las muestras biológicas se mide y expresa como fósforo elemento total en la muestra. Sin embargo, se informa como fosfato. Por lo tanto, a lo largo de toda la tesis utilizaremos la abreviatura P indistintamente para fósforo y fosfato.

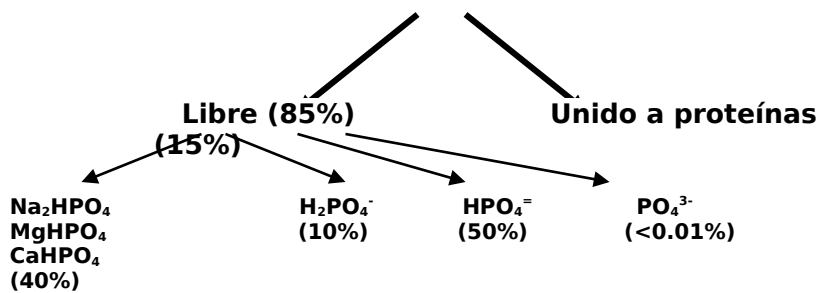
Es el principal buffer componente de la orina contribuyendo al equilibrio ácido-base del organismo. Por otra parte, la fosforilación de proteínas celulares es uno de los mecanismos más importantes por el cual se controlan funciones celulares.

### **1.1.2. Distribución del fosfato en el organismo**

En muchas especies de mamíferos, aproximadamente el 85 % del fosfato del organismo está presente en el mineral óseo y en los dientes, principalmente como hidroxapatita. El resto se distribuye en los tejidos blandos (14%, principalmente en tejido muscular, piel y tejido hepático) y en el líquido extracelular (1%).

Alrededor del 70% del fosfato sanguíneo se encuentra en forma orgánica, como constituyente de los fosfolípidos. El 30% restante es fosfato inorgánico. Las medidas de laboratorio clínico de fosfato plasmático se refieren al P en las fracciones inorgánicas. El fosfato inorgánico circula unido a proteínas (15%) o libre (85%). A pH fisiológico la forma predominante de fosfato libre circula como  $\text{HPO}_4^-$  (Figura 1.1) (3).





*Figura 1.1. Distribución del fósforo en el humano (3)*

La concentración plasmática de fosfato varía según la especie animal. Los mayores niveles se encuentran en algunos peces y los menores en el humano adulto. El nivel plasmático de fosfato también se modifica en relación con la edad y el crecimiento. Así, en humanos, el rango de P plasmático es de 1.4 y 2.7 mmol/l en recién nacidos, 1.3 y 2.0 mmol/l en los niños y 0.7 y 1.4 mmol/l en individuos adultos (4). Por otra parte, la concentración plasmática de P se incrementa desde la mañana hacia mitad de la noche, teniendo su menor valor alrededor de las 11:00 AM y su máximo, aproximadamente a las 3:00 AM. Esto no guarda relación con la ingesta de alimentos. (5)

## **1.2. HOMEOSTASIS DEL FOSFATO**

Walter Cannon propuso el término de “homeostasis” para designar el mecanismo empleado por un organismo para mantener su integridad. Involucra el mantenimiento de equilibrios relativos respecto de variables fisiológicas que deben ser mantenidos por separado dentro de estrictos márgenes de tolerancia (6). El término homeostasis es frecuentemente

utilizado por los fisiólogos para denotar una serie de mecanismos que tienen el efecto de limitar el rango de variaciones de volumen y composición del líquido extracelular que puedan ocurrir en el organismo. Ninguno de los mecanismos involucrados puede entenderse independiente del resto.

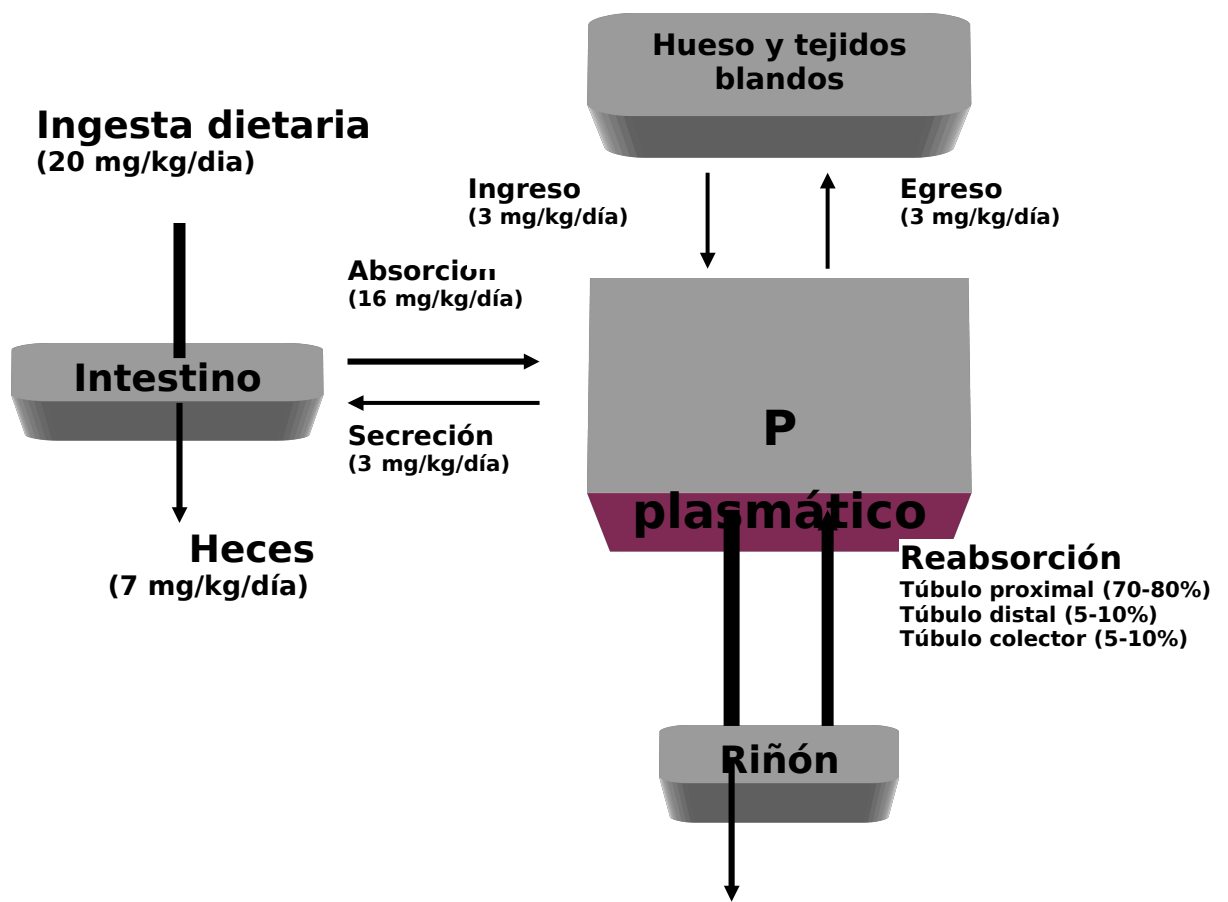
La homeostasis del fósforo es inseparable de la del calcio por dos razones: la concentración de cada uno en los fluidos del organismo está limitada por la concentración del otro, y ambos son requeridos en proporciones fijas para la mineralización ósea.

Como otras sustancias inorgánicas esenciales, la disponibilidad de P en general y P plasmático en particular dependen fundamentalmente del balance entre la absorción intestinal y la excreción renal por reabsorción selectiva en los riñones (7).

La masa de P contenida en el plasma y el líquido extracelular es de aproximadamente 15 mmoles en el humano adulto. Esta cantidad representa menos del 0.1 % del fósforo del organismo. El fósforo extracelular está en intercambio con todas las células del organismo. Los valores del plasma reflejan los valores del compartimiento extracelular.

El fósforo *ingresa* al compartimiento extracelular a partir del intestino, tejidos blandos y hueso. *Egres*a a través de la orina, como resultado de la diferencia entre la filtración glomerular y la reabsorción tubular, por la excreción de fósforo fecal endógeno, por transferencia a los tejidos blandos y al hueso durante su mineralización (4). El fósforo absorbido por el intestino

es eliminado por el riñón, incorporado a las células o depositado en el mineral óseo. La deposición ósea da cuenta de un gran porcentaje del P retenido, principalmente durante el período de crecimiento. Sin embargo, aún en el organismo en crecimiento solo un pequeño porcentaje del P dietario es retenido. La mayor parte del P absorbido es excretado en la orina. Así, la homeostasis del P y la concentración plasmática dependen primariamente del mecanismo renal que regula el transporte tubular de P (8). El siguiente esquema representa los intercambios de P en un organismo adulto en situación de balance.



**Orina**  
**(13 mg/kg/día)**

*Figura 1.2. Metabolismo del fosfato en humanos (Nordin, (1976) modificado).*

### **1.2.1. Importancia de la reabsorción renal de fosfato en la homeostasis del anión**

Entre los mecanismos de transferencia de fosfato, la reabsorción tubular parece ser particularmente importante en relación a establecer, en forma aguda, los niveles de fósforo plasmático. En el humano adulto con una concentración plasmática de 1.2 mmol/l y una velocidad de filtración glomerular de 120 ml/min, la cantidad diaria de fosfato filtrado será de 210 mmoles. Si el 20 % de la carga filtrada es excretada en la orina, la masa de fosfato reabsorbida será de 168 mmoles/día. Esta variable es alrededor de 10 veces superior al flujo absorbivo intestinal neto, que puede observarse en individuos adultos con un suministro de fosfato en la dieta de 4 a 30 mg/kg/día y una absorción fraccional intestinal de 60-70 %. Lo que es más

importante aún, este flujo reabsortivo renal puede tener un amplio rango de variación de acuerdo al suplemento dietario y la utilización de fosfato por el organismo. En realidad, la reabsorción fraccional puede extenderse de 0 a 100 % de la carga filtrada. Por lo tanto, debido a tal enorme flexibilidad la reabsorción tubular de fosfato juega un rol central en la regulación de los niveles plasmáticos (4). Para el ajuste a largo plazo del contenido corporal de fósforo, la regulación de la absorción intestinal de fosfato también es importante.

### **1.2.2. Absorción intestinal de fosfato**

El fósforo ingresa en la dieta en forma de fosfato inorgánico y orgánico. Alrededor del 60-70 % del fosfato es absorbido a partir de una dieta mixta típica. La leche y sus derivados son la principal fuente de P en la dieta. La mayor parte del P de la leche es inorgánico, mientras que gran cantidad del P de la carne, vegetales y otras fuentes, está localizado intracelularmente y está formando parte de fosfoproteínas, fosfoazúcares y fosfolípidos. Aunque ciertos fosfolípidos pueden ser absorbidos sin hidrólisis previa, la mayor parte del P es absorbido como anión, previa hidrólisis de los compuestos mencionados en la luz del intestino (9).

El rol del intestino delgado en la homeostasis del P ha recibido menos atención que el del riñón. La absorción intestinal de P (llevada a cabo principalmente en duodeno y yeyuno) representa la suma de un componente

saturable mediado por una proteína transportadora y un componente no saturable dependiente de la concentración. La regulación hormonal de la absorción intestinal juega solo un rol menor en la homeostasis del P (7).

En condiciones normales, la absorción pasiva puede satisfacer las necesidades de P. En sujetos normales, la absorción neta de P (diferencia entre P dietario y fecal) es una función lineal de la ingesta de P sin tendencia a la saturación. Puede expresarse en cantidades absolutas o como porcentaje de la ingesta. Para un rango de P dietario de 4 a 30 mg/kg/día, el % de absorción neta es de 60-70 % de lo ingerido (9).

### **1.3. FUNCION RENAL Y METABOLISMO DE FOSFATO**

Ludwig fue el primero en proponer, en 1844, la teoría de la filtración glomerular y la reabsorción tubular selectiva para explicar la formación de la orina. De acuerdo con la “teoría moderna” de Cushny formulada en 1917, algunas sustancias son filtradas pasivamente en los glomérulos renales y reabsorbidas activamente a través de las paredes de los túbulos junto con el agua a una velocidad requerida para producir una concentración “óptima” en el fluido reabsorbido y, por lo tanto, en el fluido extracelular. De esta manera, se mantienen en la sangre las concentraciones óptimas de los solutos importantes. El nivel de concentración en el fluido reabsorbido debería entonces caracterizar la función renal con respecto a una dada sustancia.

Con algunas modificaciones, esta teoría aún describe el manejo renal de P (10).

### **1.3.1. Transporte renal de fosfato**

El glomérulo produce un ultrafiltrado del plasma. A medida que este ultrafiltrado pasa a través de los túbulos renales, su composición es modificada porque sustancias específicas son sustraídas por reabsorción y adicionadas por secreción tubular. Entonces, existen tres procesos que determinan la composición final de la orina: ultrafiltración, reabsorción tubular y secreción tubular. Con relación al P, esta última no ha sido claramente demostrada ni en humanos ni en otros mamíferos (7, 11), por lo tanto, se acepta que la excreción urinaria de P depende únicamente de la filtración y la reabsorción.

**1.3.1.1. Filtración glomerular:** el P es filtrado libremente por el glomérulo. Estudios de micropuntura en anfibios y ratas, aunque con algunas dificultades técnicas, parecen indicar que la concentración de P en el plasma y en el filtrado glomerular no difieren entre sí. Estudios controlados disponibles en el humano muestran que el ultrafiltrado tiene aproximadamente la misma concentración que el plasma. Esto se cumple para un amplio rango de concentraciones plasmáticas de P (10).

La carga filtrada de P en el riñón ( $CF_{PO_4}$ ) puede entonces ser calculada como el producto de la concentración plasmática de P ( $[PO_4]_p$ ) y la velocidad de filtración glomerular (GFR):

$$\text{Cantidad filtrada por unidad de tiempo} = CF_{PO_4} = [PO_4]_p \times G.F.R$$

**1.3.1.2 Reabsorción tubular:** bajo condiciones normales (ingesta de P, status hormonal) aproximadamente el 80 % de la carga filtrada de P es reabsorbida.

En el hombre y otros mamíferos, la cantidad de P excretado, es decir, la concentración urinaria de P por volumen minuto de orina ( $[PO_4]_u \times Vo'$ ), siempre es menor que la carga filtrada. La diferencia entre ambos da la cantidad de P reabsorbido.

La velocidad de reabsorción neta de fosfato ( $T_{PO_4}$ ) se define como la diferencia entre la carga filtrada y la velocidad de excreción y solo puede ser medida indirectamente:

$$\text{Cantidad reabsorbida por unidad de tiempo} = T_{PO_4} = [PO_4]_p \times G.F.R. - [PO_4]_u \times Vo'$$

Experimentalmente se demuestra que cuando la carga filtrada de P es extremadamente baja, la excreción del ión es indetectable ya que se reabsorbe completamente. Aumentando la carga filtrada se eleva la velocidad de reabsorción hasta un máximo, denominado "máximo tubular de

P<sup>u</sup> o T<sub>m</sub><sub>PO<sub>4</sub></sub>. Cualquier incremento posterior en la carga filtrada, debido a un aumento en la concentración plasmática, es completamente excretada (10).

**1.3.1.3. Medición de la reabsorción:** existen condiciones en que cambia la reabsorción de P (por ej. cambios en la ingesta, diversas patologías, etc.), en tales casos, es de importancia diagnóstica medir cuanto se altera la reabsorción de P. Para ello puede medirse directamente el T<sub>m</sub><sub>PO<sub>4</sub></sub>/GFR (concentración umbral de P) suministrando una infusión de P. Luego, se grafica la relación entre la velocidad de excreción y la concentración sérica de P para distintos valores de ésta última. Sin embargo, este método consume mucho tiempo y es poco reproducible porque repetidas infusiones de P alteran el nivel de P basal. Una aproximación alternativa usada a menudo para conocer la reabsorción tubular de P ha sido realizar algunas estimaciones empíricas de dicha reabsorción basadas en las relaciones que existen entre la velocidad de excreción, concentración sérica de P y la velocidad de filtración glomerular; esto es, relación entre clearance de P (Cl<sub>P</sub>) y clearance de inulina (Cl<sub>In</sub>).

La reabsorción fraccional de P (TRP) se obtiene fácilmente utilizando medidas de la concentración de inulina y P en plasma y en orina recolectadas simultáneamente. El TRP es igual a:

$$TRP = (CF_{PO_4} - [PO_4]_u \times V_0') / CF_{PO_4} = 1 - ([PO_4]_u \times V_0' / CF_{PO_4}) = TRP = 1 - Cl_P / Cl_{In}$$

donde  $Cl P / Cl In$  representa la excreción fraccional de P (EFP) (10).

**1.3.1.4. Localización:** la mayor parte del P filtrado es reabsorbido en el túbulo proximal, con aproximadamente 60 % de la carga filtrada reabsorbida por la parte contorneada y un 15-20 % en la parte recta del túbulo. Además, una porción pequeña pero variable del filtrado es reabsorbida en segmentos más distales del nefrón (túbulo distal = 5-10 %, túbulos colectores = 5-10 %) (8). El hecho de que la cantidad de P reabsorbida disminuya desde el comienzo al final del nefrón, no permite concluir que los segmentos proximales sean más importantes que los terminales en términos de control homeostático de la excreción de P. Al contrario, puede sugerirse (por analogía con el control de la excreción de sodio) que el ajuste fino en el manejo tubular de fosfato ocurre en estos segmentos terminales. (11)

**1.3.1.5. Mecanismos moleculares del transporte tubular de fosfato:** en el túbulo proximal, la membrana apical de las células tubulares está provista de microvellocidades que forman un borde en cepillo a lo largo del lumen tubular. El P ingresa en la membrana del borde en cepillo, se transloca a través de la célula y egresa por la membrana basolateral. Los niveles de P intracelular son relativamente altos y el interior celular es electronegativo (alrededor de  $-65$  mV). Así, la reabsorción tubular de P se realiza en contra de un gradiente electroquímico en la membrana del borde en cepillo. El

anión deja la célula a favor de un gradiente electroquímico en la membrana basolateral. Se acepta que el P transportado transcelularmente se mezcla con el “pool” citosólico de P. El P citosólico interactúa con procesos metabólicos tales como el metabolismo oxidativo y la glucólisis, los cuales incorporan P en compuestos orgánicos, y la gluconeogénesis, la cual libera P (12).

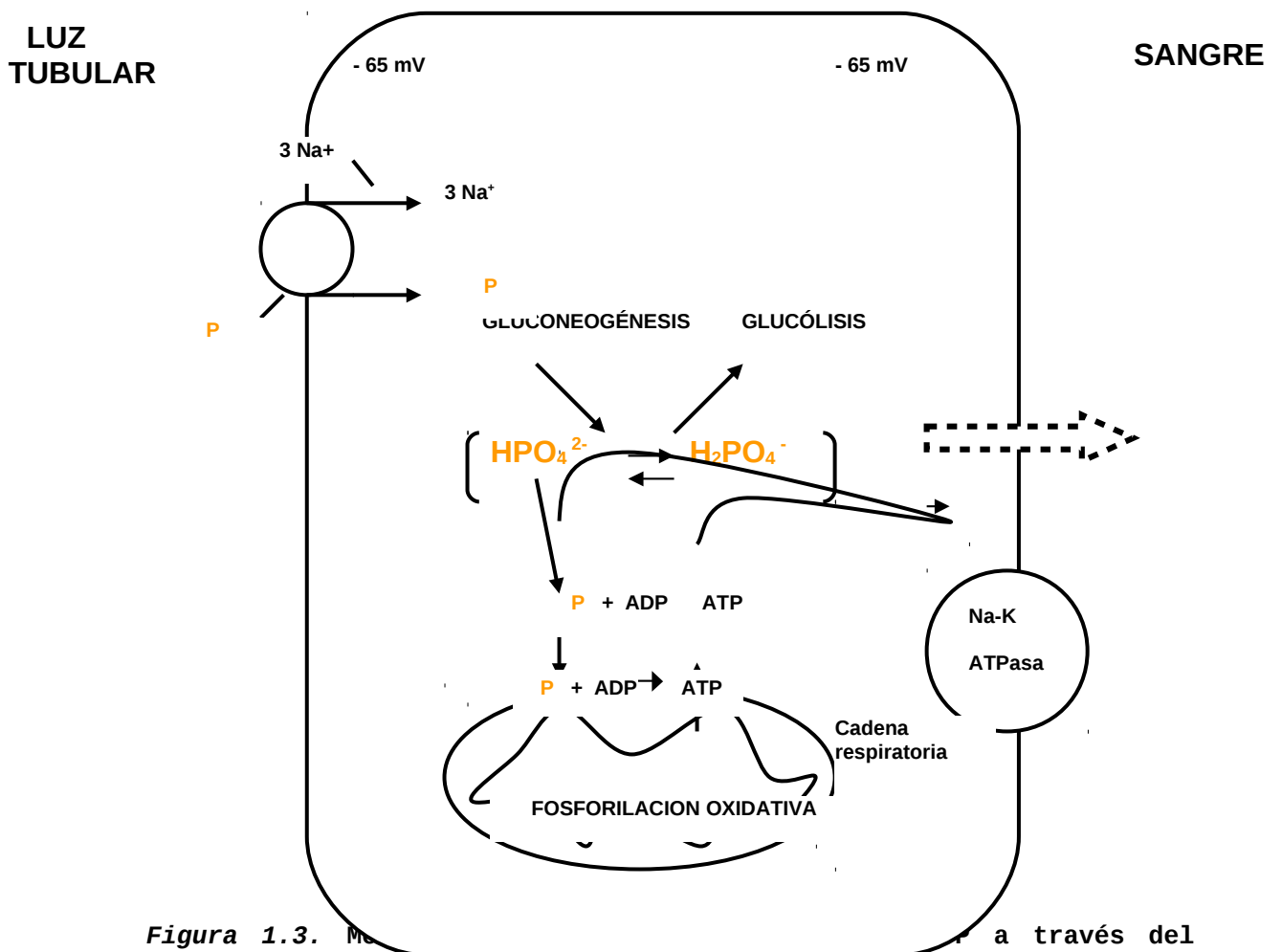


Figura 1.3. Mecanismo de transporte de  $\text{P}$  a través del túbulo proximal. [(12) modificado]

**1.3.1.6. Transporte a través de la membrana apical:** en el túbulo proximal, el transporte de P es dependiente del sodio. Es la etapa inicial en la reabsorción de P y representa el paso crucial en la homeostasis del mismo. El transporte se realiza por medio de cotransportadores de P dependientes de sodio ( $3\text{Na}^+/1\text{P}$ ) ubicados en la membrana del borde en cepillo del túbulo proximal (13).

La mayor parte de las situaciones que resultan en un manejo deteriorado del P renal están relacionadas con alteraciones en la expresión y contenido del cotransportadores. Esto se refleja por cambios en la velocidad máxima de transporte ( $V_{\text{máx}}$ ) (14).

### **1.3.2. Factores reguladores del transporte renal de fosfato**

La concentración de P plasmático es mantenida dentro de un rango estrecho. Como el riñón juega un rol principal en la homeostasis del P, no es sorprendente que existan diferentes factores que regulen el transporte renal de P. Varios factores hormonales (hormona paratiroidea, insulina, hormona tiroidea, calcitonina, vitamina D, hormona del crecimiento e IGF-I, glucocorticoides, péptido natriurético atrial, péptido relacionado a la hormona paratiroidea, factores de crecimiento tumoral alfa y beta), actividad nerviosa renal, y liberación de neurotransmisores tanto como factores no hormonales

(ingesta dietaria de P, ayuno, estado ácido-base y diuréticos) alteran la velocidad de la reabsorción renal de P (15).

Varios de dichos factores afectan la expresión y distribución celular del cotransportador Na/P en el epitelio del túbulo renal. Cambios en el transporte tales como los producidos por la hormona paratiroidea y la ingesta dietaria alterada de P correlacionan con cambios del número de transportadores en la membrana apical. Estos datos sugieren que el transportador Na/P representa el blanco principal para la regulación fisiológica de la homeostasis del P (13).

#### **1.3.2.1. Hormona paratiroidea (PTH)**

Entre los distintos agentes que pueden influenciar el manejo tubular renal de P, la PTH sigue siendo la hormona peptídica mejor caracterizada en términos de señales intracelulares involucradas y de respuesta celular (15).

La acción fosfatúrica de la PTH ha sido estudiada extensamente y se debe, principalmente, a la inhibición de la reabsorción de P en el túbulo proximal renal. También inhibe más del 10 % del transporte de P en el túbulo distal, el cual puede ser un sitio adicional para la regulación final (9).

La inhibición inducida por la PTH del cotransportador Na/P en la membrana apical del borde en cepillo involucra una disminución en la  $V_{máx}$  que es probablemente la responsable de la disminución en la reabsorción tubular de P(16). La acción de la PTH radica en promover la remoción

endocítica de los transportadores Na/P de la membrana del borde en cepillo del túbulo proximal (14, 15). Este proceso es irreversible (17). La recuperación del transportador Na/P después de su remoción es enteramente dependiente de síntesis de novo de proteínas (17, 18, 19).

La PTH se une a receptores específicos en la membrana basolateral (4). El complejo hormona-receptor activa tanto al sistema adenilato ciclasa/proteína quinasa A como al fosfolipasa C/proteína quinasa C e induce los cambios metabólicos en la célula que en última instancia disminuyen el transporte de P a través de la membrana del borde en cepillo (15).

### **1.3.2.2. Insulina**

Otra hormona de importancia en el manejo renal de P es la insulina. Se conoce que la insulina afecta tanto las funciones metabólicas como las de transporte de la célula renal tubular proximal. Esta hormona interviene en la regulación de los procesos de reabsorción de P en el túbulo proximal.

En la membrana basolateral del túbulo proximal existen receptores para insulina (20). Se ha demostrado que la insulina estimula el transporte de P. El efecto antifosfatúrico ha sido documentado tanto en animales (21, 22, 23) como en humanos (24). El efecto de la insulina ha sido demostrado en ausencia de cambios en las concentraciones plasmáticas de glucosa, fosfato y PTH o excreción urinaria de sodio (9). Además, se demostró in vitro

que la insulina actúa directamente sobre las células del túbulo proximal. Este proceso está mediado por una alteración en las características de transporte en la membrana del borde en cepillo resultante de un incremento en la capacidad del cotransporte Na/P (20, 25).

La infusión de somatostatina disminuye los niveles de insulina plasmática produciendo una reducción en el transporte de P en el túbulo contorneado proximal lo que ocasiona una mayor pérdida de P por orina. Esta fosfaturia es independiente de la natriuresis, hiperglicemia, PTH y concentración de P plasmático, sugiriendo que los niveles basales endógenos de insulina tienen importancia en la regulación de la homeostasis de P. El incremento en la excreción de P que sigue a la inhibición de la liberación de insulina endógena por somatostatina, junto con la reversión del incremento de P excretado por la administración de insulina exógena, miden el grado de estimulación crónica del transporte de P por insulina en el túbulo contorneado proximal de los animales normales (23)

Por otra parte, la administración de insulina disminuye la concentración de P circulante promoviendo el movimiento de P desde el espacio extracelular al intracelular (26, 27).

### **1.3.3. Fosfato y glucosa**

Desde mucho tiempo atrás existen evidencias de una alteración en el metabolismo del P relacionados a incrementos en los niveles de glucosa plasmática. Pitts y Alexander (28) observaron en perros que un aumento progresivo en la concentración de la glucosa plasmática resultó en una disminución del transporte máximo de P ( $T_m PO_4$ ) el cual pudo ser revertido por florizina, un conocido glucósido inhibidor de la reabsorción tubular de glucosa. Estudios subsecuentes realizados en perros confirmaron estas observaciones. Cohen et al. (29) demostraron que la glucosa compite ventajosamente por los mecanismos reabsortivos con varios aniones tales como el fosfato, sulfato y acetoacetato.

Fox et al (30) investigaron el efecto de la infusión de glucosa sobre la función tubular renal en sujetos normales y encontraron que cuando la concentración de glucosa plasmática alcanza los 200 mg/dl, existe un aumento tanto en la excreción absoluta como en el clearance de P.

Existen varias formas posibles de interacción entre el transporte tubular de P y glucosa, siendo las más comúnmente descritas la competencia por la energía disponible para el transporte y la competencia por sitios de un transportador. Durante la administración de glucosa sería requerido un incremento en la provisión de energía por el metabolismo celular para un transporte adicional de glucosa, reduciendo la disponibilidad

de energía para el transporte de P. Ginsburg (31) demostró en perros que los ácidos grasos libres revierten los efectos (disminución) en el  $TmPO_4$  mediados por glucosa y postuló que la energía derivada del metabolismo de los ácidos grasos puede ser un limitante de la velocidad en la reabsorción de este anión.

Con respecto a la posibilidad de que dos sustancias de tan disímil estructura como glucosa y fosfato compitan por sitios de un mismo transportador, Ginsburg (31) encontró que la inhibición de la reabsorción de P por glucosa no puede ser revertida por el incremento en la concentración plasmática de P lo cual parece argumentar contra una competencia directa entre P y glucosa por un sitio común.

## **1.4. DIABETES**

### **1.4.1. Definición**

La Diabetes Mellitus es una condición patológica caracterizada por hiperglicemia y glucosuria y síntomas resultantes de un serio desequilibrio metabólico general (32). Es producida por deficiencia de insulina (Diabetes Mellitus Insulino Dependiente o Tipo I) o resistencia de los tejidos efectores a la misma (Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente o Tipo II) (33).

Experimentalmente, la diabetes puede ser producida por pancreatectomía total o por administración parenteral de drogas como la estreptozotocina o el aloxano (32).

### **1.5. MODELO EXPERIMENTAL: DIABETES POR ALOXANO**

Un gran número de animales de diferentes líneas y especies han sido usados como modelos para estudiar la diabetes.

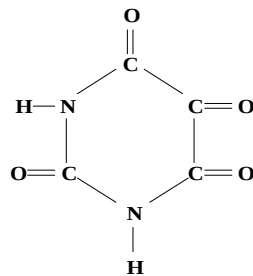
El término “modelo animal de diabetes” es usado frecuentemente cuando se informan trabajos con animales diabéticos y se extrapola su significado a la diabetes humana. Un “modelo” no es una reproducción de la diabetes humana en un animal, ni representa el rango completo de aberraciones o complicaciones observadas en la diabetes humana. El potencial de un modelo animal radica en la oportunidad de explorar variables específicas (morfológicas, bioquímicas, inmunológicas, metabólicas) o medidas terapéuticas (drogas, transplantes) no accesibles aún en los humanos. Las conclusiones deberán estar confinadas a la patogénesis de un desarreglo en particular o a su corrección, porque la equivalencia total con la enfermedad es rara (34).

#### **1.5.1. Inducción química de la diabetes**

Varios agentes químicos son tóxicos selectivos de las células beta del páncreas; entre ellos los principales son: el aloxano, una pirimidina con similitud estructural al ácido úrico (2,4-5,6 tetraoxohexahidropirimidina) y la estreptozotocina, la cual puede ser considerada como glucosa con una cadena lateral de nitrosourea con alta reactividad (34).

Como se enfatizó anteriormente, aunque no se puede extrapolar un modelo animal a la diabetes humana, es comúnmente aceptado que este modelo de inducción química se asemeja a la diabetes humana tipo I.

**1.5.1.1. Aloxano:** el aloxano tiene una estructura electrónica compleja y existe en varias formas tautoméricas, es altamente inestable en agua a pH neutro, y razonablemente estable a pHs menores a 3 (34). Existe evidencia de que la acción diabetogénica del aloxano es anulada alrededor de 5 a 10 minutos después de la inyección intravenosa o intraperitoneal debido a que el aloxano es inestable a pH fisiológico (35). Ha sido sugerido que el aloxano por si mismo no es citotóxico y que serían sus metabolitos los responsables de la acción citotóxica (34).



**Figura 1.4. Estructura química del aloxano**

La administración de aloxano puede realizarse por inyección endovenosa en dosis de 40 a 45 mg/kg (34) o utilizando dosis intraperitoneales entre 50 y 200 mg/kg (36). En ratas normales el valor de glucosa plasmática, con acceso al agua y alimento, es de 90-160 mg/dl. Con una dosis intraperitoneal de 200 mg/kg, a las 48 hs. los niveles de glucosa son de 150 a 900 mg/dl (37). La severidad de la diabetes producida por el aloxano inyectado por vía endovenosa es la misma que la de la inyección intraperitoneal (36). Esto produce daño funcional irreversible en las células beta pancreáticas en minutos y cambios estructurales en horas en la mayoría de roedores, perros, gatos, conejos, monos, ovejas, peces y pájaros (34). Para el desarrollo de la diabetes es necesario destruir o inactivar más del 95 % de los islotes (36).

La respuesta al aloxano puede ser dividida en tres fases: hiperglicemia inicial que dura aproximadamente 2 horas, debida

probablemente a glucogenolisis hepática, seguida por una hipoglicemia transitoria aproximadamente a las 6 horas, debida a la salida de la insulina desde las células dañadas, y por último hiperglicemia permanente que comienza a las 12 horas (34).

El porcentaje de ratas diabéticas obtenidas una semana después de la administración de aloxano es variable y depende de la sensibilidad de la camada de ratas (38). Los animales que sobreviven los 5 días posteriores a la inyección de aloxano usualmente muestran diabetes con severidad variable caracterizada por polifagia, marcada pérdida de peso (36, 37), poliuria y glucosuria, pero sin cetonemia ni cetonuria significativas (37). Aunque en algunos trabajos se describe cetonemia y cetonuria durante la primera semana, estos luego desaparecen. La explicación de este fenómeno sería que la repentina carencia de insulina permite la rápida movilización y catabolismo de las grasas acumuladas en el organismo. Cuando los lípidos endógenos han sido agotados, la cetosis desaparece (39).

Los cambios metabólicos en la diabetes inducida por aloxano son similares a otras condiciones de deficiencia de insulina. Histológicamente, a nivel de las células beta se observa degeneración de la membrana celular, del retículo endoplásmico y mitocondrias a las 2 horas, seguido por la desintegración nuclear y celular (38).

Patogénesis: aunque la actividad diabetogénica del aloxano es conocida desde hace aproximadamente 50 años, el mecanismo patogénico

no ha sido aún completamente clarificado, ni ha sido establecido si la acción primaria de la droga se localiza en la membrana plasmática o el citosol, o en ambos sitios (35). Entre los factores a los que se les ha atribuido un rol prominente puede mencionarse que el aloxano produce formación de radicales libres (40), depleción de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) debido a lesiones en el ADN e inhibición de la glucoquinasa, o cambios mitocondriales que incluyen inhibición de la actividad enzimática, disminución del contenido de glutatión reducido, manejo alterado del calcio y producción deficiente de ATP (35).

#### **1.6. DIABETES Y FOSFATO**

En la diabetes, la reabsorción de la glucosa en las células tubulares es varias veces mayor que en el riñón normal. Como se trató anteriormente, este exceso en la reabsorción de glucosa puede interferir con los sistemas de transporte de distintos iones. Existe evidencia de un aumento en la eliminación renal de P en pacientes diabéticos, incluyendo aquellos con función renal normal (41). Levitan (42) refiere que pacientes con diabetes no controlada pierden grandes cantidades de P por orina y postula que la hiperglicemia y la glucosuria presentes en la diabetes no controlada podrían tomar parte en la pérdida de P del organismo. En niños diabéticos, Ditzel et al (43) encuentran que la concentración renal umbral para el fosfato esta

correlacionada negativamente con la velocidad de reabsorción de glucosa sugiriendo que la reabsorción tubular de glucosa incrementada lleva a una disminución en la afinidad del P por su transportador tubular. Observaciones posteriores mostraron el  $Tm_{PO_4}/GFR$  significativamente disminuido e inversamente correlacionado con el grado de hiperglicemia y con la reabsorción tubular de glucosa (44). El aumento en la excreción de P, sin embargo, no lleva a una disminución en la concentración de P en el plasma sanguíneo (41).

Cuando la diabetes se trata con insulina, la excreción urinaria de P disminuye y esto puede atribuirse a la disminución de la glucosa urinaria, a una acción directa de la insulina sobre los túbulos renales o a una supresión del glucagón o de la PTH (45).

En la diabetes experimental por aloxano no existe mucha información al respecto. En diabetes inducida por estreptozotocina se han observado incrementos significativos en la excreción urinaria de P (46, 47).

### **1.7. DIABETES Y HORMONAS**

Han sido descritos varios desórdenes endócrinos asociados a la diabetes mellitus. La falta de insulina y el consecuente deterioro del control de la glicemia, pueden llevar a distintas anormalidades endócrinas, entre otras, disminución de la IGF-I (48) a pesar de los incrementos en los niveles de hormona del crecimiento (49), elevación de los niveles plasmáticos de glucagón (49, 50, 51) y otras hormonas pancreáticas tales como gastrina,

secretina y somatostatina (49), disminución de las hormonas tiroideas (48), aumentos de catecolaminas circulantes (50, 52) y disminución del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (53, 54). Varios de estos factores hormonales pueden modificar la eficiencia de reabsorción renal de P. Respecto a la PTH, hormona fosfatúrica por excelencia, tanto en la diabetes humana como en la experimental, se han encontrado niveles circulantes bajos (55, 56, 57, 58), normales (44, 59) y elevados (47, 60, 61, 62, 63, 64).

### **1.8. DIABETES Y RIÑÓN**

La hemodinamia renal está alterada en la diabetes mellitus tanto clínica como experimental y esto puede jugar un rol importante en la patogénesis de la nefropatía diabética.

Desde hace muchos años, en numerosos estudios ha sido demostrado que la velocidad de filtración glomerular (GFR) está marcadamente incrementada en la diabetes juvenil temprana en humanos (65, 66, 67). Se mostró que esta filtración anormalmente elevada está asociada con alteraciones metabólicas (65) pero el mecanismo que lleva a la anomalía no ha sido completamente clarificado. Existen muchos factores que han sido sugeridos como mecanismos que contribuyen a estas alteraciones hemodinámicas renales. Entre ellos el aumento del tamaño renal (68, 69) y glomerular (70), cambios en el volumen extracelular (71, 72),

altos niveles de glucosa plasmática, pobre control metabólico de la enfermedad (65), anormalidades en los sistemas hormonales que pueden involucrar una compleja interacción entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores (73), entre otros, han sido sugeridos como posibles factores implicados.

Algunos hallazgos sugieren que dentro de los mecanismos que llevan a este aumento en la GFR no estarían involucradas anormalidades en las propiedades filtrantes de la membrana glomerular ya que fue demostrado que la diabetes temprana no está asociada con alteraciones en el clearance de dextrano (65) ni en la excreción urinaria de albúmina (74).

Se ha sugerido (y aún es un tema discutido) un incremento en el tamaño renal como posible causa del aumento en la GFR (68, 75). El tamaño renal incrementado probablemente refleja un aumento también en el tamaño de los glomérulos (70). Estudios clínicos demostraron que el tamaño renal aumenta temprano en esta condición, y que el tamaño incrementado está de alguna manera (desconocida) relacionado con el grado de control metabólico y puede ser revertido con una terapia insulínica rigurosa (69, 70).

En la diabetes avanzada, a medida que la enfermedad progresa y aparecen síntomas clínicos de nefropatía diabética, la GFR disminuye (67). Cuando la hiperglicemia es más severa (como durante la cetoacidosis diabética), no ocurre la hiperfiltración. La caída en la GFR observada en pacientes diabéticos con cetoacidosis diabética está usualmente

acompañada de una caída del flujo plasmático renal (RPF) y depleción del volumen extracelular (VEC) (76). Sin embargo, con grados menores de hiperglicemia el VEC tiende a aumentar, más que a contraerse, presumiblemente a causa de que la diuresis osmótica asociada a la glucosuria es menos pronunciada que en aquellos pacientes con hiperglicemia severa. Se ha sugerido que estos cambios en el volumen extracelular explican, al menos en parte, los patrones de hiperfiltración y reducción de la filtración vista en estos dos grupos de pacientes diabéticos(72).

En la diabetes experimental, en cambio, los resultados son bastante contradictorios encontrándose tanto aumento (71, 77, 78) como disminución (76, 79, 80, 81) de la filtración. Estos cambios generalmente se asocian con el grado de hiperglicemia.

Hostetter et al (76) encuentra que ratas diabéticas con hiperglicemia severa tienen disminuidos el SNGFR<sup>2</sup> y GFR respecto a controles a causa de una disminución en  $Q_A$ <sup>3</sup> y lo señalan como el principal factor responsable. Estos cambios en la dinámica glomerular en este modelo, ocurren en una etapa de la diabetes experimental donde las lesiones estructurales aún están ausentes.

Por otra parte, se ha sugerido la posibilidad de que uno o más sistemas hormonales sean responsables de las variaciones hemodinámicas.

---

<sup>2</sup> SNGFR: velocidad de filtración por nefrón

<sup>3</sup>  $Q_A$ : flujo plasmático glomerular

Entre ellos, la insulina puede jugar un rol ya que se demostró que reduce agudamente la GFR en diabéticos no controlados y es capaz de unirse a receptores específicos en el glomérulo aislado (82, 83) y podría producir efectos por algún mecanismo independiente de sus efectos sobre la glucosa sanguínea. El estado diabético también ha sido asociado con alteraciones en la respuesta vascular a sustancias vasoactivas potentes tales como la angiotensina II y catecolaminas, agentes humorales capaces de iniciar alteraciones profundas en la dinámica microcirculatoria glomerular (84, 85, 86).

## 2. OBJETIVOS

---

En estudios preliminares efectuados en nuestro laboratorio se observó que las ratas diabéticas por aloxano excretaban una mayor cantidad de fosfato por orina: (controles, n = 18:  $11.4 \pm 2.18$  mg/min x100 g de peso, diabéticas, n = 21:  $35.7 \pm 3.35$  mg/min x100 g de peso,  $p < 0.001$ ). Igualmente, estudios realizados en humanos demostraron que la diabetes mellitus insulino-dependiente está asociada al aumento en la excreción urinaria de fosfato (41, 42). Sin embargo, no está completamente aclarado cuáles son los mecanismos involucrados en las pérdidas de fosfato y las implicancias que dichas pérdidas pueden tener sobre el organismo.

Así, se decidió estudiar las causas que pudieran explicar el aumento en la excreción de fosfato.

Por lo tanto, los **objetivos generales** de esta tesis fueron :

- Identificar los mecanismos hemodinámicos y hormonales afectados por la insulina y la glucosa en relación al manejo renal de fosfato en la diabetes experimental
- Estudiar la repercusión de la diabetes experimental en la homeostasis del fosfato y en tejidos representativos.

### **Objetivos particulares:**

1) Es conocido que la filtración glomerular y la reabsorción tubular son los principales mecanismos que regulan la excreción de fosfato. Por consiguiente, en una primera etapa del estudio centramos nuestra atención en como podría influenciar una alteración en la hemodinamia renal las pérdidas de fosfato. Muchos investigadores informan que la diabetes cursa con alteración en la filtración glomerular y siendo ésta un determinante de la excreción urinaria de fosfato nos propusimos:

- Estudiar las variables hemodinámicas renales (velocidad de filtración glomerular y flujo plasmático renal)
- Analizar los distintos factores que pueden contribuir a alteraciones en dichas variables hemodinámicas: efecto de la glucosa, tamaño renal, volumen extracelular y sistema renina-angiotensina.

2) Entre los distintos factores que pueden influenciar el manejo tubular de fosfato, la hormona paratiroidea es considerada uno de los agentes más importantes involucrados en su regulación. Por lo tanto pareció relevante

- Analizar el estado de la función paratiroidea y su participación en las modificaciones de la excreción renal de fosfato en ratas diabéticas.

3) Se ha sugerido la participación de la insulina en la regulación del transporte renal de fosfato como factor antifosfatúrico. Por otra parte, se

conoce que la glucosa y el fosfato compiten a nivel tubular por sus reabsorciones. Considerando estos hechos resultó importante:

- Estudiar en ratas diabéticas el efecto de la hiperglicemia y el déficit de insulina, dos características fundamentales que distinguen al estado diabético, como determinantes de la pérdida urinaria de fosfato.

4) En condiciones normales, la depleción de fosfato es evitada eficazmente por la capacidad del riñón de conservar P en respuesta a las necesidades del organismo. Sin embargo, las ratas diabéticas presentan incrementos en la eliminación de P por orina. A pesar de ello, mantienen los niveles de P plasmático dentro del rango normal. La falta de insulina podría promover el movimiento de P desde el compartimiento intracelular hacia el extracelular. Esto traería como consecuencia inmediata la pérdida de P desde los tejidos. Por lo tanto, nos propusimos:

- Estudiar la repercusión de las pérdidas de fosfato urinario sobre diferentes tejidos representativos: hueso, riñón, hígado y músculo.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

---

#### **3.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS**

##### **3.1.1. Animales**

Para la realización de estos estudios se utilizaron ratas macho de la línea IIM/Fm sublínea "m" (87) del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas.

##### **3.1.2. Modelo experimental: diabetes inducida por aloxano**

Al menos que se indique otra cosa, se utilizaron animales de 7 semanas de edad con un peso promedio de  $170 \pm 29$  g (promedio  $\pm$  error estándar). Todos los animales fueron alimentados ad libitum con una dieta balanceada (Cargill, contenido de fosfato: 0.9 %). El estado diabético se indujo por una única inyección de aloxano (20 mg/100gr de peso corporal, Sigma Chemical Co.) por vía intraperitoneal. El aloxano se disolvió en un buffer de citrato-fosfato (pH = 4) a una concentración de 20 g/100ml (38). Las ratas controles recibieron el mismo buffer de citrato-fosfato.

Alrededor del 50 % de los animales inyectados con aloxano murieron dentro de la semana siguiente a la inyección (38). Los animales sobrevivientes presentaron un amplio rango en los niveles sanguíneos de glucosa (200-900 mg%). Las glicemias de los animales tratados se midieron una vez por semana dentro de los 20-30 días posteriores a la administración del aloxano con sangre obtenida de la cola recogida en tubos capilares heparinizados. Se utilizaron las ratas cuyas glicemias fueron superiores a 300 mg% (ratas no ayunadas) (88). Se midió el pH sanguíneo arterial y la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) a los animales diabéticos, para evaluar su estado ácido-base, con un aparato Radiometer. Se obtuvieron valores dentro del rango normal: pH = 7.42 ± 0.03, pCO<sub>2</sub> = 38 ± 3.4 mmHg (5.07 ± 0.45 kPa). Los animales permanecieron sin tratamiento durante un mes (a menos que se indique otra cosa)<sup>4</sup> y fueron mantenidos bajo condiciones de luz y temperatura de acuerdo a las normas internacionales de cuidado de animales de laboratorio (895).

## **3.2. TÉCNICAS**

### **3.2.1. HEMODINAMIA RENAL**

#### **3.2.1.1. Preparación y cirugía de los animales**

Los animales fueron hidratados por vía oral (5 ml / 100 g peso corporal) a través de una intubación intragástrica con una sonda de polietileno (BS N 35) 10 minutos antes de cada experimento (90). Se anestesiaron con uretano (120 mg / 100 g peso corporal) por vía intraperitoneal (91). Con el fin de obtener las muestras de sangre y perfundir los animales, se colocaron catéteres heparinizados de polietileno (PC 40) en la arteria y la vena femoral respectivamente. Además, en los experimentos en los cuales fue necesario recolectar muestras de orina, se realizó una incisión suprapúbica y se colocó una sonda de polietileno (BS N 35) en la vejiga (*figura 3.1*). La perfusión se realizó con una bomba peristáltica multicanal y durante todo los experimentos, se utilizó una velocidad de perfusión de 0.1 ml/min. En todos los casos, durante la cirugía los animales fueron mantenidos sobre una superficie quirúrgica termostaticada. Un sensor de temperatura fue insertado en

el recto. La temperatura de la superficie de cirugía se ajustó para mantener la temperatura corporal de los animales dentro de lo 36-37 °C.





*Figura 3.1. Cateterización de arteria y vena femorales. Sondaje de vejiga*

**3.2.1.2. Estudio de la función renal: medición de la velocidad de filtración glomerular, flujo plasmático renal. Tamaño renal**

Animales diabéticos (n=30) y sus respectivos controles (n=16) se perfundieron con una solución isotónica compuesta por: inulina 9 mOsm, para-aminohipurato (PAH) 17.74 mOsm y manitol 275 mOsm a un pH = 7,4 (**solución I**), previa administración de una dosis única de 18 mg de inulina y 6 mg de PAH . Luego de un período de 45 minutos, necesario para estabilizar los

niveles plasmáticos de inulina y PAH, se recolectó orina durante dos períodos de 60 minutos cada uno, se midió su volumen y se extrajeron alícuotas de sangre en la mitad de cada período (a los 30 minutos).

Sobrecarga con glucosa: con el fin de estudiar el efecto de la sobrecarga de glucosa sobre la GFR y el RPF, el experimento se extendió durante dos períodos más. La sobrecarga de glucosa se realizó suministrando un bolo intraperitoneal de glucosa (2 ml de una solución de glucosa 2.8 M) y se reemplazando en la solución de perfusión el manitol por glucosa 275 mOsm (**solución II**). Nuevamente se recolectó orina durante dos períodos de 60 minutos, en la mitad de los cuales se extrajeron muestras de sangre. Al igual que en los períodos basales se midió el volumen de orina con el fin de calcular el volumen-minuto de orina excretada. Al finalizar el experimento los animales se sacrificaron por exsanguinación mediante punción cardiaca (90) y se extrajeron ambos riñones, de los cuales se registró el peso húmedo. Se centrifugaron las muestras de sangre para separar el plasma. Alícuotas del mismo se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para medir insulina. En las muestras de plasma y orina se midieron inulina, p-aminohipurato y glucosa. Se calcularon los clearances de

inulina (estimadores de la GFR y expresado en ml/min  $\times$  100 g peso corporal) y los clearances de PAH (estimadores del RPF y expresado en ml/min  $\times$  100 g peso corporal).

### **3.2.1.3. Medición del volumen de líquido extracelular (VEC)**

Un grupo de ratas controles y otro de ratas diabéticas fueron alojados durante 6 días en jaulas metabólicas individuales, con el objeto de adaptarlas al nuevo medio ambiente, en el bioterio de la cátedra, con comida y agua ad-libitum. Durante los últimos dos períodos de 24 horas, se registró el consumo de agua y la diuresis. Se recolectó la orina donde se determinó la excreción de sodio y glucosa. Luego de las 48 horas, se estimó el volumen de líquido extracelular utilizando el Principio de dilución, método de la inyección única, para la medición de volúmenes de distribución (92). Como sustancia "test" se utilizó la inulina.

El protocolo utilizado fue el siguiente:  
posteriormente a la anestesia y cirugía, se administró una dosis única de inulina (18 mg disuelta en 2 ml de solución fisiológica, pH = 7.4) por la vena femoral e inmediatamente se extrajo una alícuota de sangre por la

arteria femoral. Luego se realizaron extracciones consecutivas a los 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos posteriores a la dosis de inulina. Se midió la concentración de inulina en plasma (por duplicado), se determinó gráficamente la concentración instantánea y se calculó el VEC, el cual se expresó por 100 g de peso corporal.

#### **3.2.1.4. Medición de la actividad del sistema renina-angiotensina**

Siguiendo el mismo protocolo experimental que el punto 3.2.1.2 dieciocho ratas controles y dieciocho ratas diabéticas, se les recolectaron muestras de sangre, usando EDTA como anticoagulante, durante dos períodos de infusión de 60 minutos con la solución I (períodos basales) y durante dos períodos de infusión de 60 minutos post-sobrecarga de glucosa e infusión con solución II. Las muestras se centrifugaron inmediatamente a ser extraídas en centrífuga refrigerada (HERMLE - Z 323 K) a 4° C y, previo separar una alícuota de plasma para la determinación de glucosa, se almacenaron a -20°C para la posterior medición de la actividad de renina plasmática

(PRA) por radioinmunoanálisis (RIA). La determinación se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Immunotech, Beckman Coulter Company, Czech Republic). En forma resumida, el principio del método está basado en la determinación de angiotensina I (ANG I), generada in vitro durante la reacción enzimática de renina con su sustrato (angiotensinogeno) en una muestra de plasma incubada bajo condiciones controladas (temperatura, tiempo y pH) y en presencia de inhibidores enzimáticos que bloquean la conversión de ANG I a ANG II. Bajo estas condiciones, la cantidad de ANG I generada es directamente proporcional a la cantidad de renina activa en plasma. Los resultados se expresaron como ng de ANG I generada en 1 ml de muestra por hora [(ng/ml)/hr].

### **3.2.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PARATIROIDEA**

Con el fin de estudiar el efecto de la función paratiroidea sobre el metabolismo del P en las ratas diabéticas, tres semanas después de la administración de aloxano, un grupo de ratas diabéticas (n=9) y sus respectivos controles (n=9) se sometieron a la extirpación de la glándula paratiroidea (TPTX, *figura*

3.2). La cirugía se realizó utilizando éter como anestesia (93). A continuación se describe brevemente la técnica quirúrgica utilizada. Con la rata ubicada en posición de decúbito dorsal, se realiza una incisión en la piel a la altura de la tráquea cortando hacia el borde de los maxilares. Luego, se divide y separa el músculo esternomastoideo en la línea media con forceps quirúrgicos curvos dejando de este modo expuestas las glándulas tiroideas. Una vez ubicadas, cada glándula se sujeta fuertemente con una pinza y es extraída cuidadosamente hacia arriba y lateralmente hasta dejarla libre por medio de una aguja filosa.





**Figura 3.2. PARATIROIDECTOMIA: Foto superior:** previa a cirugía. **Foto inferior:** post-cirugía

El nervio laríngeo recurrente puede visualizarse a los costados de la tráquea y debe ser evitado cuidadosamente durante la extracción. El objetivo de la cirugía es remover intactos cada lóbulo de la tiroides sin dañar el nervio. Posteriormente a la extracción, los bordes del músculo son juntados sin suturar y la incisión en la piel es suturada (94).

Simultáneamente, un grupo de ratas controles (n=9) y diabéticas (n=9) fueron sometidas a una cirugía simulada sin extirpación de las glándulas (ratas Sham).

Luego de la cirugía y hasta su recuperación, los animales se mantuvieron sobre la superficie quirúrgica termostatzada. Posteriormente a la recuperación de los animales, tanto las ratas TPTX como las ratas sham, se alojaron en jaulas metabólicas individuales durante 10 días en el bioterio de la cátedra, en ambiente con temperatura constante de 23-27 °C, con ciclo luminoso natural, agua y alimento ad libitum. El control del éxito de la ablación se realizó por la medición de la calcemia a las 48 horas de la extirpación. Se utilizaron las ratas cuya calcemia fue inferior a los 2 mM. Para los experimentos de balance, las jaulas se ubicaron sobre

embudos de acero inoxidable con rejillas del mismo material diseñadas para la recolección de heces.

Con el fin de mantener la función tiroidea, ya que las glándulas tiroideas se extirparon junto con las glándulas paratiroides, el agua de bebida de las ratas TPTX se suplementó con L-tiroxina (Glaxo). En base a la cantidad de agua que los animales consumieron espontáneamente, se calculó la dosis de L-tiroxina para que la ingesta promedio fuese de 1  $\mu\text{g}/\text{día}$ . La cantidad adicionada fue de 12  $\mu\text{g}/\text{l}$  en las ratas controles y 8  $\mu\text{g}/\text{l}$  para las diabéticas. Diariamente, se registró peso, consumo de agua e ingesta de alimento de cada animal. La medición de la ingesta se realizó, cada día, completando el comedero con alimento hasta un determinado valor constante y se halló la diferencia con el peso del comedero al día siguiente. Se recolectó orina (sobre tolueno como preservativo), se midió el volumen y se determinó la cantidad de P en la misma. La materia fecal de cada animal fue recogida y pesada. Alícuotas de las muestras de heces y alimento (por triplicado) fueron incineradas a 500 °C durante 10 horas, las cenizas se disolvieron en HCL 5 N y posteriormente se determinó en

ellas el contenido de P. Los balances de P se calcularon como diferencia entre la cantidad de P ingerido y de P excretado. Al final del período de experimentación, los animales se sacrificaron por exsanguinación mediante punción cardiaca bajo anestesia de éter y se guardó plasma para medir PTH, P y Ca.

### **3.2.3. EFECTO DE LA HIPERGLICEMIA Y/O EL DÉFICIT DE INSULINA SOBRE LA REABSORCIÓN RENAL DE FOSFATO**

#### **3.2.3.1. Administración de insulina a ratas diabéticas**

Previo al estudio del efecto de la hiperglicemia y déficit de insulina, se realizó un experimento a fin de investigar la dosis de insulina necesaria para normalizar el estado metabólico de los animales diabéticos. Después de la inyección de aloxano, se alojaron 4 grupos de animales diabéticos (n=6 por cada grupo) y un grupo de animales controles (n=6) en jaulas metabólicas individuales a lo largo de un mes. En días alternados se

administró insulina (bovina Lilly) en forma subcutánea a ratas diabéticas. Se suministraron dosis de 1, 2 o 4 UI/100 g de peso corporal. Además, se dejó un grupo de ratas diabéticas sin tratamiento. Semanalmente se midió la ingesta de comida y se recolectó orina y materia fecal, donde se determinó el contenido de P, para calcular los balances de P. La ganancia de peso corporal se calculó como peso final menos peso inicial (promedio de tres pesadas).

#### **3.2.3.2. Preparación y cirugía de los animales**

Se realizó siguiendo el mismo protocolo que en 3.2.1.1.

#### **3.2.3.3. Reabsorción tubular de glucosa y fosfato**

Los animales se perfundieron con una de las siguientes soluciones isotónicas durante dos períodos de 30 minutos:

**SII-a:** inulina 9 mOsm, manitol 275 mOsm y fosfato 3 mOsm a pH = 7.4

**SII-b:** inulina 9 mOsm, glucosa 275 mOsm y fosfato 3 mOsm  
a pH = 7.4

Se necesitó un período inicial de perfusión de 30 minutos hasta que los niveles de P se estabilizaron en el plasma (2.7 - 3.0 mM).

Se realizaron cinco tratamientos distintos que dieron lugar a los cinco grupos experimentales:

- **C:** ratas controles ( n=19) perfundidas con la solución **SII-a**
- **D:** ratas diabéticas ( n=29) perfundidas con la solución **SII-a**
- **D + I:** ratas diabéticas que recibieron la solución **SII-a** con el agregado de 2 UI/ml de insulina ( n=16)
- **C + G:** ratas controles perfundidas con la solución **SII-b** ( n=22).
- **D + I + G:** ratas diabéticas perfundidas con la solución **SII-b** a la que se le adicionó 2 UI/ml de insulina ( n=13).

En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre en la mitad del período de perfusión y orina al final de los mismos donde se determinaron los niveles de inulina, glucosa y fosfato. Los datos fueron utilizados para calcular la GFR, estimada por el

clearance de inulina y expresada en ml/min.100g peso corporal, la reabsorción tubular de glucosa (TRG) y fosfato (TRP) ambos expresados en  $\mu$ moles/min/100g de peso corporal, y la excreción fraccional de P (EFP) según lo descrito en la introducción (1.3.1.3, página 12). También se determinaron los niveles de insulina en plasma.

### **3.3. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS**

Con el objeto de estudiar la repercusión de la diabetes experimental en el contenido de fosfato de los tejidos y su relación con las pérdidas urinarias del ión, se midió la cantidad de P en tejidos blandos (hígado, músculo y riñón) y en hueso.

#### **3.3.1. Contenido de fosfato en tejidos blandos**

Seis animales controles y seis diabéticos fueron sacrificados por exsanguinación mediante punción cardiaca. Se obtuvieron muestras de hígado, riñón y músculo y se registró su peso húmedo. Se obtuvieron alícuotas de aproximadamente 0.5 g. Las muestras se

procesaron según el Método de Kjeldahl (95). Se midió el contenido de N (como amonio) y P en alícuotas del digesto. El contenido de P tisular se informó como  $\mu\text{moles}$  de P/mg de N.

### **3.3.2. Análisis del mineral y matriz óseos**

Inmediatamente después del destete, un grupo de ratas fueron inyectadas con aloxano. Dichos animales fueron alojados en jaulas en el bioterio de la cátedra con agua y alimento ad libitum y no recibieron tratamiento alguno. Se les controló la glicemia semanalmente. Al cabo de 17 semanas, se seleccionaron 14 ratas cuyas glicemias promedio fueron superiores a 300 mg %. Como controles se utilizaron 12 ratas del mismo sexo y edad. Se aislaron ambos fémures, se desengrasaron con una mezcla de cloroformo:metanol, 1:1, y se secaron a 110 °C hasta peso constante. Se incineraron a 500 °C y se obtuvo el peso de las cenizas. El peso de la matriz ósea se calculó como la diferencia entre el peso seco del hueso y el peso de las cenizas. Las cenizas se retomaron con 10

ml de solución HCl 4 N y en caliente. Sobre una alícuota de cenizas se midió el contenido de P y Ca.

#### **3.4. TECNICAS ANALÍTICAS**

- a) Determinación de glucosa: técnica enzimática con colorimetría según Trinder (96).
- b) Determinación de fósforo: método colorimétrico (97).
- c) Determinación de calcio: espectrofotometría de absorción atómica (AROLAB, MK4).
- d) Determinación de sodio: fotometría de llama (NAN II; modelo Crudo Ionometer).
- e) Determinación de amonio: método colorimétrico (98)
- f) Determinación de pH y pCO<sub>2</sub>: aparato Radiometer.
- g) Determinación inulina (99).
- h) Determinación de PAH (100).
- i) Determinación de insulina: RIA en fase sólida- COAT-A-COUNT-Diagnostic Products Corporation. USA (101).
- j) Determinación de PTH: RIA por doble anticuerpo. Diagnostic Products Corporation. USA (102).
- k) Determinación de angiotensina: RIA, Immunotech, Beckman Coulter Company, Czech Republic (103).

### **3.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Para el tratamiento de los datos, gráficos y análisis estadísticos, se utilizó el programa Prism Graph Pad 2.0.

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Los datos obtenidos se analizaron con técnicas estándar: test t-Studentes a ..... y análisis de regresión y covariancia (104).

## 4. RESULTADOS

---

### (12) HEMODINAMIA RENAL

#### 4.1.1. Efecto de la glucosa

El efecto de la hiperglicemia sobre los parámetros hemodinámicos renales se investigó con experimentos de clearance. La velocidad de filtración glomerular (GFR) y el flujo plasmático renal (RPF) fueron estimados por el clearance de inulina y el clearance de PAH respectivamente. Los datos expresados en la *tabla 4.1*, muestran que entre veinte y treinta días después de la inyección de aloxano, las ratas diabéticas, con glicemias promedio significativamente mayores que sus respectivos controles, presentaron valores de GFR y RPF significativamente disminuidos. El límite de confianza utilizado para agrupar a las ratas como hipofiltrantes fue del 95 % del GFR de las ratas controles . El mismo criterio se usó para los datos de RPF.

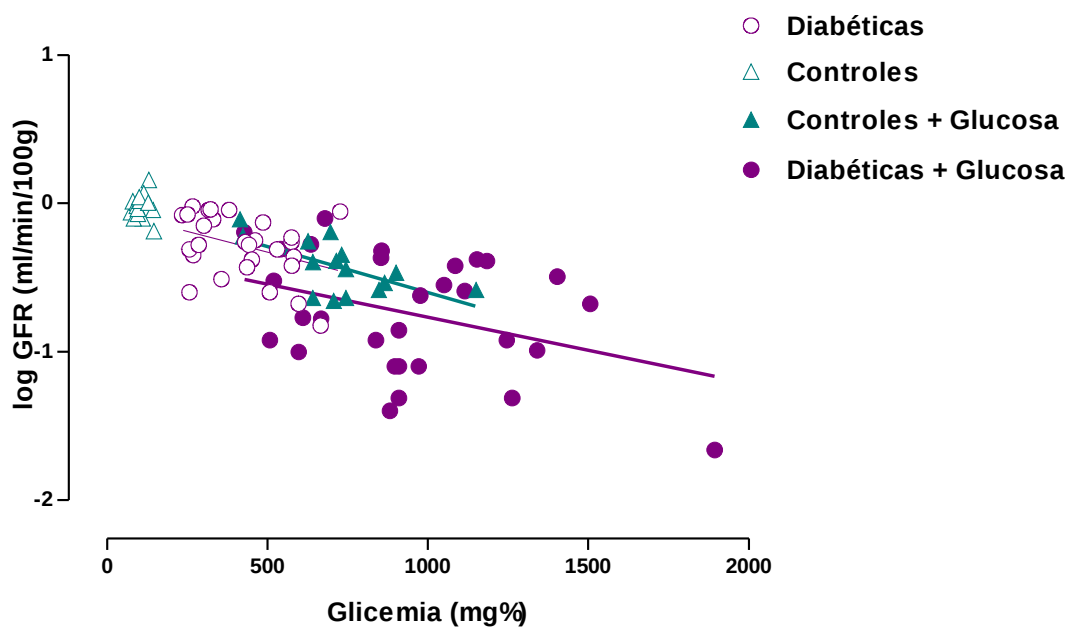
**Tabla 4.1. Efecto de la hiperglicemia sobre los parámetros hemodinámicos renales, insulinemia y glicemia en ratas controles y diabéticas.** Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas: #  $p < 0.001$  ratas diabéticas vs. controles. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  sobrecarga con glucosa respecto a los valores basales.

	Periodo Basal		Sobrecarga con glucosa	
	Controles n = 16	Diabéticas n = 30	Controles n = 16	Diabéticas n = 30
<b>GFR</b>				
CI <sub>IN</sub> ml/ min/ 100g	0.97 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.44 $\pm$ 0.05 <sup>***</sup>	0.26 $\pm$ 0.038 <sup>**</sup>
<b>RPF</b>				
CI <sub>PAH</sub> ml/min/100g	3.93 $\pm$ 0.25	2.11 $\pm$ 0.39 <sup>#</sup>	1.55 $\pm$ 0.21 <sup>***</sup>	1.09 $\pm$ 0.20 <sup>***</sup>
<b>Fracción de Filtración</b>	0.25 $\pm$ 0.013	0.40 $\pm$ 0.032 <sup>#</sup>	0.29 $\pm$ 0.027	0.32 $\pm$ 0.03
<b>Insulina</b> $\mu$ UI/ml	48 $\pm$ 4	10 $\pm$ 2 <sup>#</sup>	160 $\pm$ 18 <sup>***</sup>	11 $\pm$ 3
<b>Glicemia</b> mg/dl	105 $\pm$ 6	442 $\pm$ 33 <sup>#</sup>	714 $\pm$ 45 <sup>***</sup>	909 $\pm$ 95 <sup>**</sup>

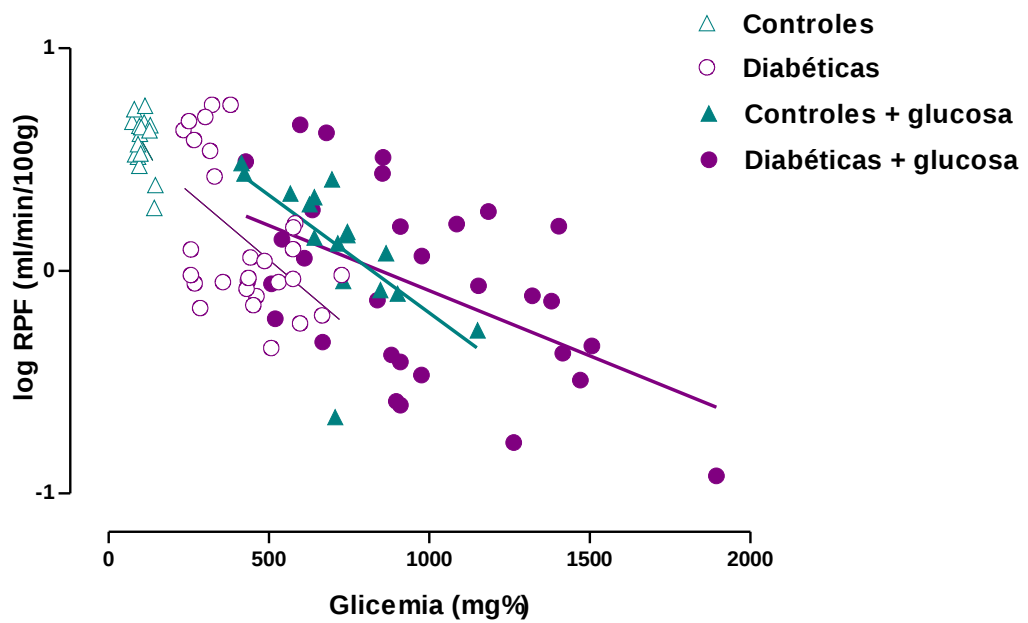
Se evaluó el efecto de una sobrecarga de glucosa sobre las variables hemodinámicas renales. Los resultados de la *tabla 4.1* muestran que la sobrecarga con glucosa disminuyó ambos parámetros, GFR y RPF, a un 50% del valor basal, tanto en las ratas controles como en las diabéticas. La

secreción de insulina endógena se triplicó en los controles pero no se modificó en las diabéticas. La fracción de filtración fue significativamente superior en las ratas diabéticas y no fue afectada por la sobrecarga con glucosa.

Se analizaron los datos basales y post sobrecarga de glucosa de controles y diabéticas. Tanto la GFR como el RPF mostraron una correlación exponencial negativa significativa con respecto a los niveles de glucosa plasmática, excepto para las ratas controles en el período basal. En las *figuras 4.1 y 4.2* se representan, respectivamente, los valores del logaritmo de GFR y RPF en función de los valores de glicemia para los cuatro grupos experimentales.



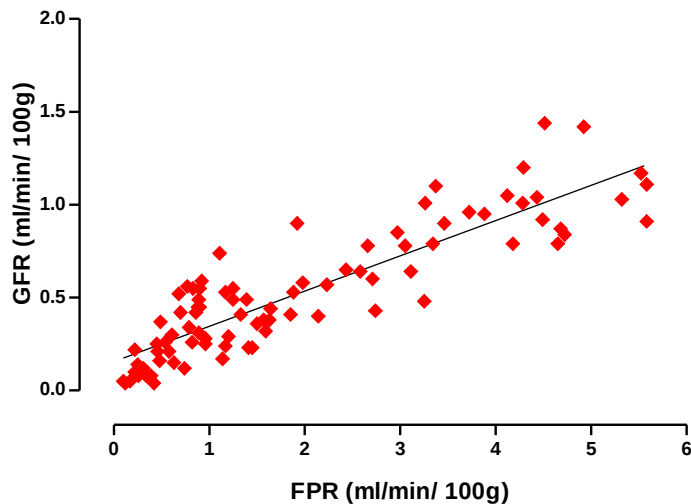
**Figura 4.1. Relación entre log de GFR y glicemia de los grupos experimentales**



**Figura 4.2. Relación entre log de RPF y glicemia de los grupos experimentales.**

Ambos parámetros hemodinámicos correlacionaron positivamente entre sí según la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{GFR ml/min.100g} = 0.1564 + [ ( 0.1897 \pm 0.0.010) \times \text{RPF ml/min.100g} ]$$



**Figura 4.3.** Relación entre GFR y RPF en todos los grupos experimentales ( $r = 0.88$ ).

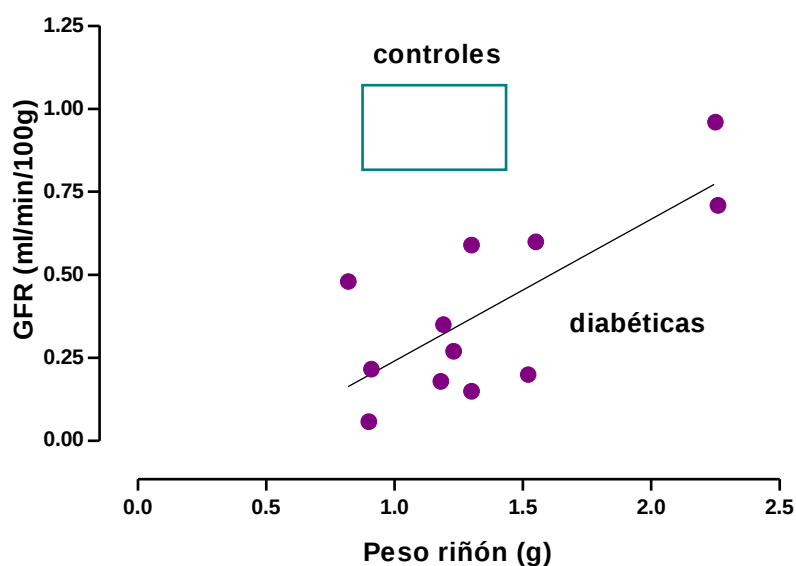
#### **4.1.2. Tamaño renal**

Frecuentemente se relaciona el tamaño renal y/o el área de filtración con las modificaciones en la velocidad de filtración glomerular. Se estudiaron 12 ratas diabéticas y 8 controles a las cuales se les registró el peso corporal y el peso húmedo del riñón (promedio de riñones izquierdo y derecho).

**Tabla 4.2. Peso corporal y renal de ratas controles y diabéticas.** Los datos representan el promedio  $\pm$  error estandar. Diferencias significativas: \*\*  $p < 0.01$  respecto a los controles.

	Controles n = 8	Diabéticas n = 12
<b>Peso corporal</b> (gramos)	260 ± 13	184 ± 15**
<b>Peso del riñón</b> (gramos)	1.30 ± 0.07	1.61 ± 0.35

En la *tabla 4.2* se presentan los valores de peso corporal y peso del riñón en ratas diabéticas. El peso corporal de las ratas diabéticas fue significativamente menor respecto a las controles. Aunque el peso renal no fue afectado, se observó una correlación positiva con los valores de GFR. No obstante, estos se mantuvieron siempre por debajo de las GFR de los controles (*figura 4.4*).



**Figura 4.4.** Relación entre la GFR y el peso renal para ratas diabéticas ( $r = 0.74$ ). El rectángulo indica los

límites del 95 % de confianza de ambas variables para las ratas controles

- **Volumen extracelular (VEC)**

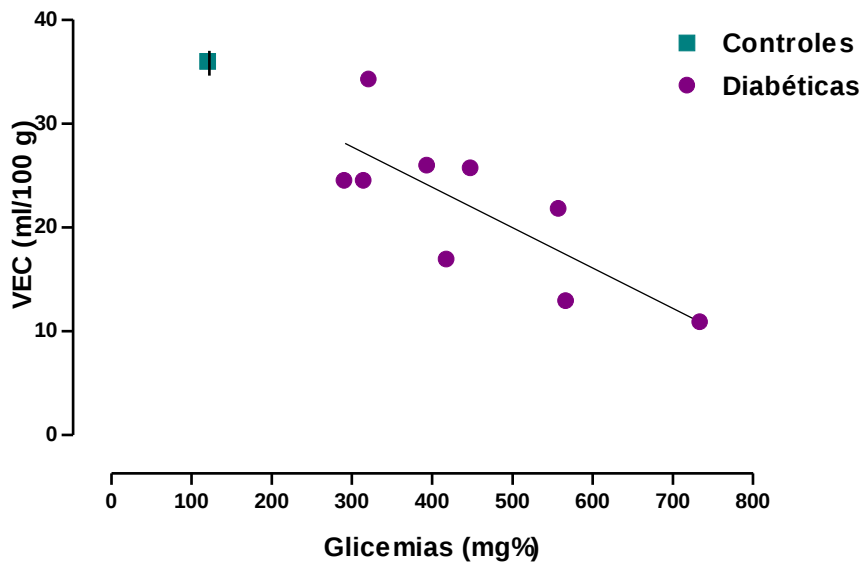
Dado que una alteración en el VEC puede condicionar una variación en la filtración glomerular, se investigó si existía alguna modificación en dicho parámetro en las ratas diabéticas.

**Tabla 4.3. Datos analíticos del efecto de la diuresis osmótica y pérdidas de Na<sup>+</sup> sobre el volumen del líquido extracelular de ratas controles y diabéticas por aloxano. Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.**

	<b>Controles n = 9</b>	<b>Diabéticas n = 9</b>
<b>Volumen extracelular (ml/100 g)</b>	36 $\pm$ 5	22 $\pm$ 2 *
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	108 $\pm$ 11	453 $\pm$ 53 ***
<b>Natremia (mEq/l )</b>	140.2 $\pm$ 4.18	126 $\pm$ 4.02 *
<b>Glucosuria (mmoles/l)</b>	---	59.6 $\pm$ 5.84 ***
<b>Natriuria (mmoles/24 hs)</b>	1.25 $\pm$ 0.14	3.12 $\pm$ 0.27 ***
<b>Diuresis (ml/24 hs )</b>	5.85 $\pm$ 1.40	104.5 $\pm$ 9.90 ***
<b>Peso (gramos)</b>	270 $\pm$ 20	190 $\pm$ 5 ***

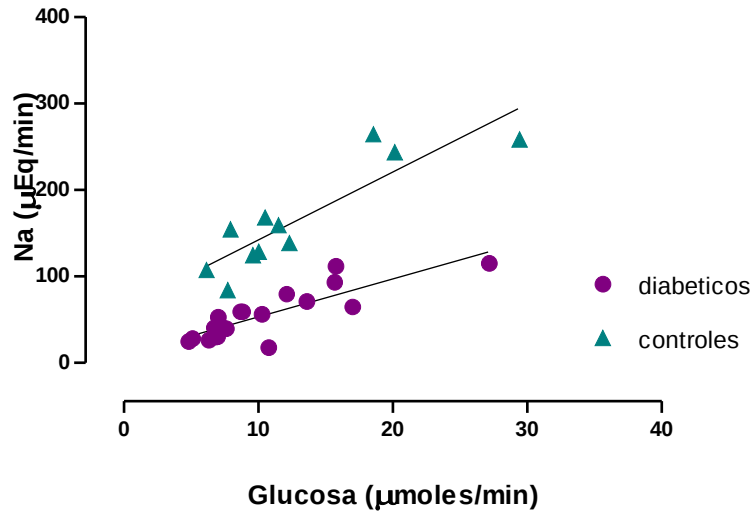
La *tabla 4.3* muestra que las ratas diabéticas presentan disminución del VEC, aumento en la excreción de Na<sup>+</sup> (que se refleja en sus niveles

plasmáticos) y de glucosa. El VEC de las ratas diabéticas correlacionó negativamente con los niveles de glucosa plasmática (*figura 4.5*).

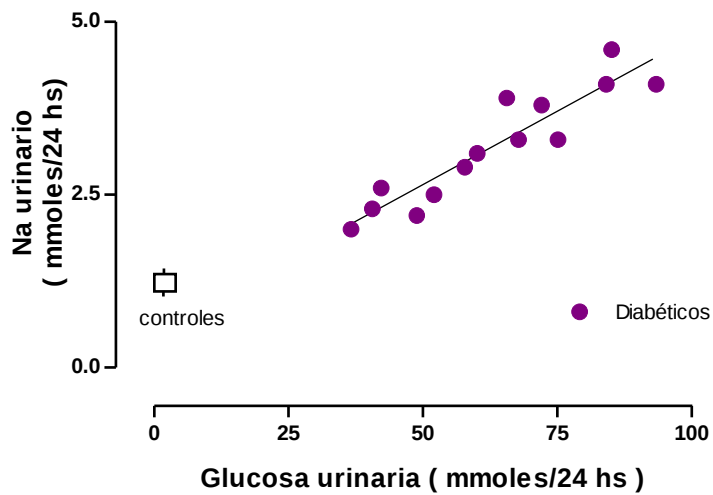


**Figura 4.5.** Relación entre el volumen extracelular y los valores de la glicemia de ratas diabéticas ( $r = -0.78$ ), controles y controles con glucosa.

En la *figura 4.6*. se muestra la reabsorción tubular de sodio en función de la reabsorción de glucosa. La eficiencia en la reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  en las ratas diabéticas se redujo a la mitad respecto a las controles. Los animales diabéticos excretaron un promedio de 19 moles de glucosa por cada mol de  $\text{Na}^+$  (*figura 4.7*).



**Figura 4.6.** Relación entre cantidad de Na y glucosa reabsorbidos para ratas controles ( $r = 0.88$ ) y diabéticas ( $r = 0.84$ ).



**Figura 4.7.** Relación entre la excreción urinaria diaria de Na y glucosa ( $r = 0.92$ ).

#### 4.1.4. Sistema renina angiotensina

Con el fin de determinar si la hiperglicemia afecta al sistema renina angiotensina (RAS) contribuyendo a explicar las modificaciones hemodinámicas renales, se midió la actividad de renina plasmática (PRA) en ratas controles y diabéticas. Los resultados expresados en la *tabla 4.4* muestran en las ratas diabéticas una disminución significativa de la PRA respecto de los controles que no se modificó por sobrecarga con glucosa.

**Tabla 4.4. Actividad de renina plasmática.** Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas: \*\*  $p < 0.01$  diabéticas respecto a los controles.

	CONTROLES (n = 18)		DIABÉTICAS (n = 18)	
	Basal	Post-glucosa	Basal	Post-glucosa
<b>Actividad de renina plasmática (ng/ml/hora)</b>	8.64 $\pm$ 0.79	8.06 $\pm$ 0.97	3.33 $\pm$ 0.44 **	2.98 $\pm$ 0.48 **

- **HORMONA PARATIROIDEA Y FOSFATO**

**Tabla 4.5. Metabolismo del P y función paratiroidea en ratas controles y ratas diabéticas ( n. d. por debajo del límite de detección del método, TPTX tiroparatiroidectomizadas) Datos expresados como promedio  $\pm$  error estandar. Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$  respecto a ratas controles intactas, excepto para calcemia de ratas diabéticas TPTX donde la diferencia es respecto a las ratas diabéticas intactas.**

Ratas controles TPTX (n = 9)	Ratas diabéticas		
	<u>Intactas</u> (n = 9)	<u>TPTX</u> (n = 9)	<u>Intactas</u> (n = 9)
<b>PTH (ng/dl)</b>	15.6 $\pm$ 0.3	n. d.	52.7 $\pm$ 1.8 ***
<b>Calcemia (mM)</b>	2.43 $\pm$ 0.04	1.91 $\pm$ 0.06 **	2.41 $\pm$ 0.2
	1.83 $\pm$ 0.09 *		
<b>Fosfatemia (mM)</b>	1.92 $\pm$ 0.07	2.43 $\pm$ 0.15	1.88 $\pm$ 0.39
	1.73 $\pm$ 0.46		
<b>Ingesta de P</b> 94.7 $\pm$ 10.5 (mg/día /100g peso corp)	70.2 $\pm$ 3.8	75.1 $\pm$ 2.0	85.7 $\pm$ 5.0
<b>P fecal</b> 54.8 $\pm$ 14.2 (mg/día/100g peso corp)	45.3 $\pm$ 3.7	50.5 $\pm$ 23.8	53.7 $\pm$ 5.0
<b>P urinario</b> 41.5 $\pm$ 5.5 (mg/día/100g peso corp)	15.9 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 2.0 *	28.7 $\pm$ 3.6 *
<b>Balance de P</b> 0.8 $\pm$ 6.3 (mg/día/100 g peso corp)	11.2 $\pm$ 3.8	14.1 $\pm$ 4.3	- 0.1 $\pm$ 8.1

Se estudió el efecto de la función paratiroidea sobre el metabolismo del fosfato de las ratas diabéticas. La *tabla 4.5* muestra que las ratas diabéticas intactas tienen la hormona paratiroidea significativamente elevada con respecto a los controles intactos. Esto podría indicar que dicho aumento es la causa de la excreción de P anormalmente elevada que muestran estos animales. Al extirparse la glándula paratiroidea, en las ratas controles la relación en la excreción urinaria de P entre ratas intactas y TPTX fue de 1:0.66, lo que revela el efecto antifosfatúrico de la ablación. Los animales diabéticos, en cambio, mostraron una relación intactas:TPTX de 1:1.44. Estos datos revelan un efecto paradójico producido por el déficit simultáneo de insulina y PTH, debido a que las pérdidas urinarias de P aumentaron, aunque no significativamente, en lugar de producirse una compensación en dicha pérdidas a causa del efecto opuesto de ambas hormonas.

### **4.3. EFECTO DE LA GLUCOSA Y/O EL DÉFICIT DE INSULINA SOBRE LA REABSORCIÓN RENAL DE FOSFATO**

#### **4.3.1. Administración de insulina a ratas diabéticas**

En la *tabla 4.6* se muestran los resultados de la administración de distintas dosis de insulina sobre el estado metabólico de los animales diabéticos. Estos resultados revelan que la administración de una dosis de insulina de 2 UI/100 g de peso corporal a ratas diabéticas reestablece a los valores normales la ganancia de peso corporal, ingesta de comida y balances de fósforo.

**Tabla 4.6.** Efecto del estado diabético y de la administración de insulina sobre la ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y balance de fósforo (n = 6 animales para cada grupo). Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas: \*p<0.05, \*\* p < 0.01 respecto a controles.

	Incremento en el peso corporal (g/mes)	Ingesta de alimento (g/día x 100 g peso)	Balance de fósforo (mg/día x 100 g peso)
<b>Controles</b>	115 $\pm$ 36	8.3 $\pm$ 1.4	15.7 $\pm$ 2.7
<b>Diabéticas</b>	10 $\pm$ 7.5 *	15.1 $\pm$ 2.5 *	- 8.7 $\pm$ 6.2 **
<b>Diabéticas + Insulina 1 UI</b>	18 $\pm$ 4.0 *	12.3 $\pm$ 3	1.1 $\pm$ 5.3 *
<b>Diabéticas + Insulina 2 UI</b>	104 $\pm$ 14	10.6 $\pm$ 4.9	11.8 $\pm$ 6.0

<b>Diabéticas + Insulina 4 UI</b>	44 ± 21	13.2 ± 2.4	37.5 ± 6.9 *
---	---------	------------	--------------

#### **4.3.2. Reabsorción tubular de glucosa y fosfato**

Se realizó la perfusión de ratas con soluciones conteniendo P para eliminar la influencia de las variaciones de P sobre la reabsorción tubular de fosfato y permitir experimentos con una sobrecarga de P controlada. Para aumentar el rango de carga tubular de glucosa (G) y la insulina plasmática, se administró glucosa a ratas controles e insulina o insulina + glucosa a ratas diabéticas. En la *tabla 4.7* se comparan los niveles de insulinemia, fosfatemia, glicemia y glucosa urinaria para los 5 grupos experimentales.

**Tabla 4.7. Niveles de insulinemia, fosfatemia, glicemia y glucosa urinaria en los cinco grupos experimentales.** Datos representados como promedio ± error estándar. Diferencias significativas: \*\*\*p < 0.001, D y C + G respecto a controles; D + I y D + I + G respecto a diabéticas.

	Insulina (μUI/ml)	Fosfatemia (mM)	Glicemia (mg%)	Glucosa urinaria <sup>a</sup>
<b>Controles detectada (n = 19)</b>	49 ± 3	2.4 ± 0.06	122.4 ± 7.2	no
<b>Diabéticas ± 2.1 μmol/min</b>	12 ± 2 ***	2.8 ± 0.32	439.2 ± 37.8	6.0

(n = 27)

**Controles + glucosa** 167 ± 22 \*\*\* 2.8 ± 0.25 482.4 ± 25.2 2.2  
± 1.2 µmol/min

(n = 22)

**Diabéticas + insulina** 719 ± 61 \*\*\* 2.8 ± 0.58 207.0 ± 21.6 1.6  
± 1.0 µmol/min

(n = 16)

**Diabéticas + insulina** 729 ± 83 \*\*\* 2.0 ± 0.19 547.2 ± 7.2 3.8  
± 0.9 µmol/min

**+ glucosa**

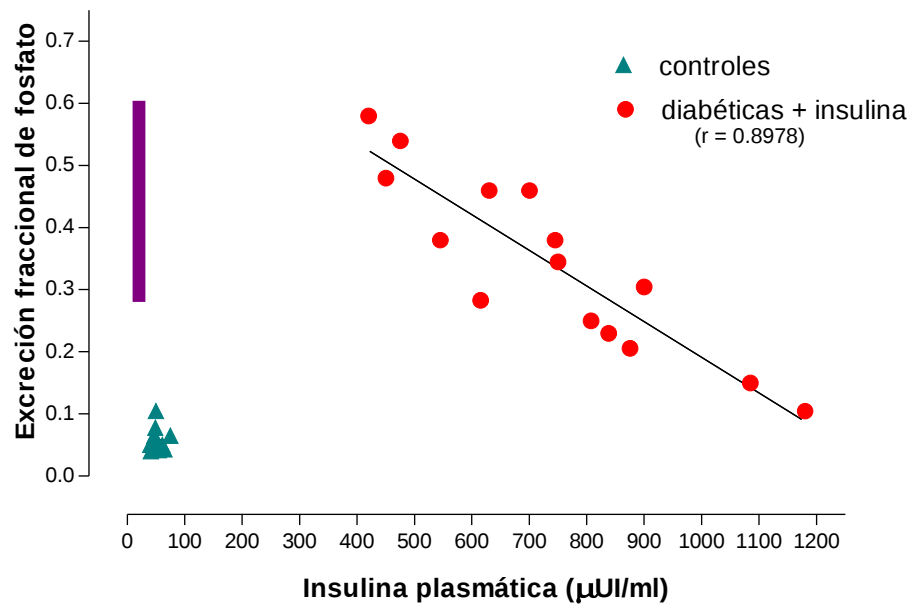
(n = 8)

---

<sup>a</sup> Velocidad de excreción

Es de notar que para que las ratas diabéticas normalicen los niveles de glucosa plasmática se necesitaron niveles de insulinemia anormalmente elevados. Esto sugiere una disminución de la sensibilidad a la acción de la insulina en las ratas diabéticas.

La insensibilidad de las ratas diabéticas a la insulina se analiza en la *figura 4.8* en la cual observamos la excreción fraccional de P (EFP) en función de la insulina plasmática en ratas controles y ratas diabéticas que no han recibido insulina.

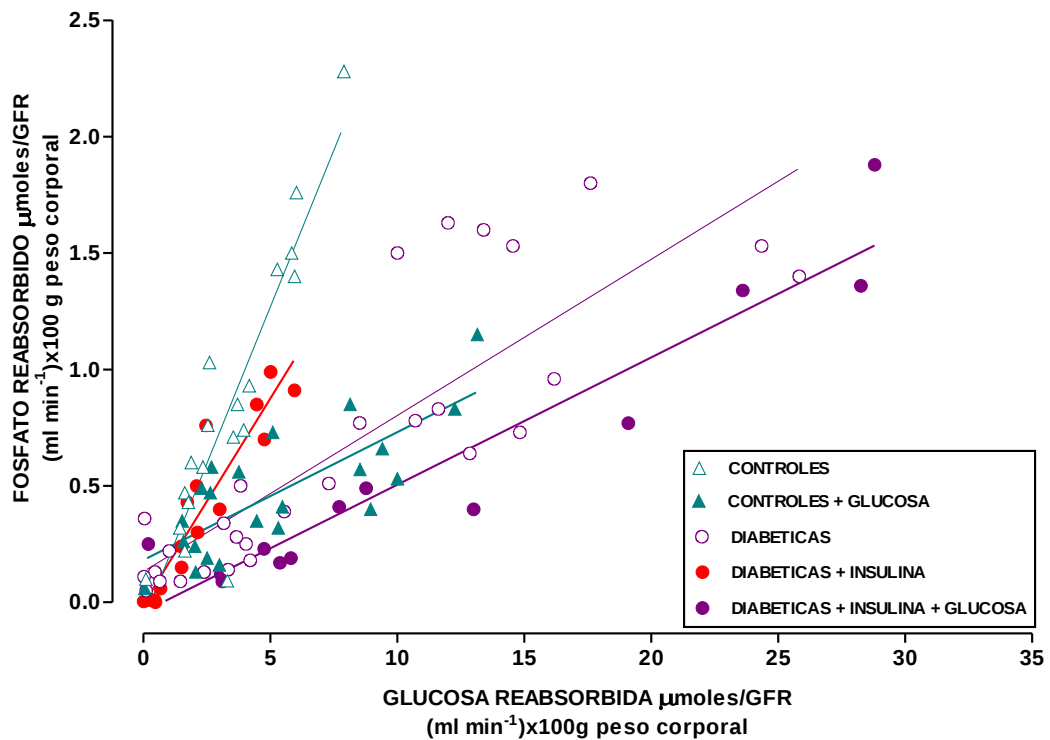


**Figura 4.8. Relación entre la EFP y los niveles de insulina plasmática de ratas controles y diabéticas tratadas con insulina.** El área violeta representa el rango de dichos valores para ratas diabéticas sin tratamiento.

Como puede observarse, la EFP en los animales controles es muy constante ( $0.05 \pm 0.01$ , con una insulinemia de  $49 \pm 3 \mu\text{UI/ml}$ ). En el gráfico, también se muestra el rango de EFP para las ratas diabéticas que no recibieron tratamiento: EFP = 0.29-0.60 con un valor de insulinemia de  $12 \pm 2 \mu\text{UI/ml}$ . Los animales diabéticos perfundidos con solución de inulina isotónica + insulina, muestran una relación inversa entre los valores de EFP y los niveles de insulina plasmática. La administración de insulina exógena a ratas diabéticas reduce la EFP de manera lineal y permite predecir (extrapolando la línea de regresión al promedio de las controles, EFP = 0.05)

que hay que aumentar aproximadamente 25 veces la cantidad de insulina para llevar la EFP a valores normales.

La contribución del déficit de insulina y la hiperglicemia al defecto en la reabsorción tubular de P (TRP) se investigó con experimentos de clearance.



**Figura 4.9. Glucosa reabsorbida vs. Fosfato reabsorbido en todos los grupos experimentales**

La *figura 4.9* muestra la competencia entre fosfato y glucosa reabsorbidos en el túbulo renal para los 5 grupos experimentales. El coeficiente de regresión de estas rectas mide los  $\mu\text{moles}$  de fosfato

reabsorbidos respecto a los de glucosa. Para las ratas controles, la relación P:G reabsorbidos es de 1:4. Para las diabéticas, en cambio, esta relación cambia a 1:20 (la ecuación de regresión para los controles es significativamente diferente de los diabéticos,  $F = 40.1$ ,  $p < 0.001$ ). Cuando a las ratas diabéticas se les administró insulina, la relación se asemejó a la de las controles ( $F = 1.4$ ,  $p > 0.05$ ). La administración de glucosa a las ratas controles produjo una regresión similar a la de los animales diabéticos ( $F = 2.05$ ,  $p > 0.05$ ). Lo mismo ocurrió cuando se administró insulina + glucosa a las ratas diabéticas. Este cambio en la relación de 1:4 a 1:20 es resultado del aumento en la oferta tubular de glucosa y no de la insulinemia concurrente, y representa la modificación en la competencia entre ambos sustratos para la reabsorción tubular. Tres ratas diabéticas, perfundidas con insulina y con un rango de glicemia de 220 a 360 mg% tuvieron una relación P:G con un rango de 1:7 a 1:10.

**Tabla 4.8. Datos analíticos de las regresiones entre las reabsorciones tubulares de glucosa y fosfato mostrados en la figura 4.9.** Excepto para valores de  $r$ , los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar.

$r$	Pendiente	Ordenada al
-----	-----------	-------------

			origen
<b>Controles</b> n = 19	0.9568	0.2675 ± 0.0197	-0.0277 ± 0.0782
<b>Diabéticas</b> n = 29	0.7250	0.0619 ± 0.0113	0.2127 ± 0.1188
<b>Controles + glucosa</b> n = 22	0.7016	0.0393 ± .0098	0.2358 ± 0.0631
<b>Diabéticas + insulina</b> n = 16	0.8463	0.2035 ± 0.0342	-0.0127 ± 0.0849
<b>Diabéticas + glucosa + insulina</b> n = 13	0.9240	0.0465 ± 0.0069	0.0294 ± 0.1095

#### **4.4. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS**

##### **4.4.1. Contenido de fosfato en los tejidos blandos**

El contenido de P tisular se estudió en muestras de hígado, riñón y músculo. Los resultados se expresaron en relación al contenido de nitrógeno tisular.

**Tabla 4.9** Contenido de fósforo en los tejidos blandos seleccionados de ratas controles y diabéticas. Datos expresados como la media  $\pm$  error estandar. Diferencias significativas: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 respecto de los controles.

	P tisular ( $\mu$ .mol/gr N)	
	Controles n = 6	Diabéticas n = 6
<b>Hígado</b>	4.4 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.07*
<b>Riñón</b>	5.7 $\pm$ 0.001	3.5 $\pm$ 0.70**
<b>Músculo</b>	3.6 $\pm$ 0.19	2.8 $\pm$ 0.23*

Como muestra la *tabla 4.9* la diabetes inducida por aloxano produjo una disminución significativa del contenido de P en los tres tejidos estudiados.

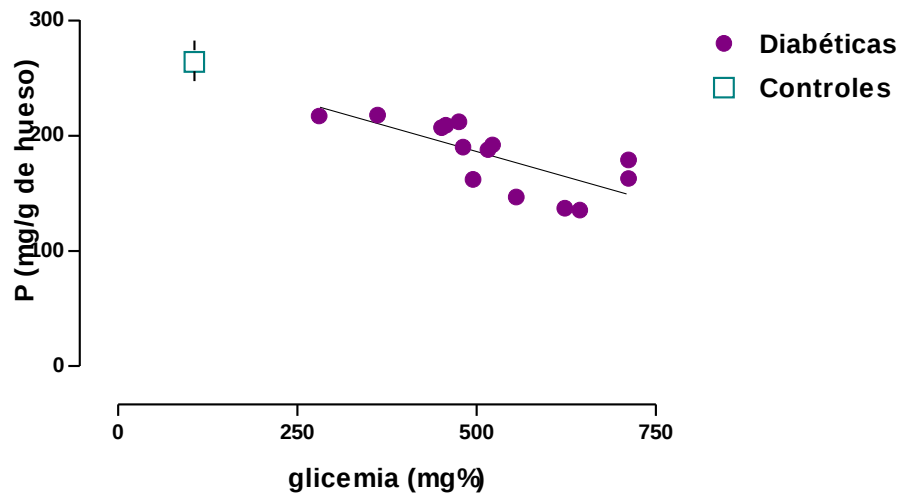
#### 4.4.2. Análisis del mineral y matriz óseos

Al cabo de 17 semanas de la inducción de la diabetes, las ratas presentaron el peso del hueso (fémur) disminuido a la mitad del valor de las controles y perdieron mineral a expensas del contenido de P. Sin embargo, porcentualmente, se enriquecieron en matriz.

**Tabla 4.10. Análisis de matriz y mineral óseos de ratas controles y diabéticas.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estandar. Diferencias significativas: \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 respecto de los controles. (C/M: relación cenizas/matriz).

	Peso (mg)	Glicemia (mg%)	Cenizas (mg/g)	Matriz (mg/g)	C/M	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Ca/P
<b>Controles (n = 12)</b>	583 $\pm$ 35	106 $\pm$ 5	670 $\pm$ 6	329 $\pm$ 6	2.04 $\pm$ 0.05	256 $\pm$ 5	264 $\pm$ 15	0.98 $\pm$ 0.07
<b>Diabéticas (n = 14)</b>	273 $\pm$ 34***	616 $\pm$ 116***	617 $\pm$ 3.1***	383 $\pm$ 3.1***	1.61 $\pm$ 0.02***	261 $\pm$ 2	208 $\pm$ 3**	1.26 $\pm$ 0.008**

Cuando se relacionaron el contenido de P del hueso y los niveles de glucosa sanguínea, en los animales diabéticos se observó la existencia de una correlación negativa entre dichos parámetros.



**Figura 4.10.** Relación entre el contenido de P en hueso y la glicemia de ratas diabéticas ( $r = -0.74$ ).

## 5. DISCUSIÓN

---

### 5.1. ESTUDIO DE LA HEMODINAMIA RENAL

Entre los factores que influyen la homeostasis del fósforo, el riñón es el órgano más importante y juega un rol clave en la mineralización ósea y el crecimiento. Estudios preliminares en nuestro laboratorio, demostraron que las ratas diabéticas por aloxano excretan una mayor cantidad de fósforo por orina y tienen fosfatos plasmáticos dentro del rango normal. Además, estos animales presentan balances negativos de fósforo y, a pesar de su hiperfagia, tienen pesos asintóticos y coeficientes de eficiencia en el crecimiento menores que los animales controles (37).

Por lo tanto, como la filtración glomerular es un determinante principal en el manejo renal de fósforo al establecer la carga filtrada, resultó esencial el estudio de la hemodinamia renal como posible explicación al incremento en la excreción urinaria de fósforo, más aún cuando existen estudios que indican que la filtración glomerular se encuentra afectada en la Diabetes Mellitus humana y experimental.

Nuestros experimentos demuestran que en ratas diabéticas por aloxano, cuatro semanas posteriores a la inducción de la diabetes, presentan disminución de la velocidad de filtración glomerular y del flujo plasmático

renal que se agudiza luego de una sobrecarga con glucosa. La carga filtrada de glucosa determinaría la disminución en la filtración glomerular asociada a pérdidas urinarias de sodio y disminución del volumen del líquido extracelular.

#### **5.1.1. Efecto de la glucosa**

**Muchos investigadores informan que la filtración glomerular está elevada en pacientes con Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (66, 67, 105). En la diabetes experimental los resultados son contradictorios. Cuando la diabetes es inducida con aloxano los animales desarrollan hiperglicemia severa y disminución de GFR y RPF (79, 80, 81). Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los de estos autores. La disminución es de aproximadamente un 45 % en ambas variables respecto de los animales controles. A pesar de las disminuciones en GFR y RPF, la fracción de filtración**

**se encuentra significativamente aumentada en las ratas diabéticas, lo que podría interpretarse como un intento por compensar la hipofiltración.**

**En la diabetes inducida con estreptozotocina se encuentran tanto resultados de hipofiltración, cuando la hiperglicemia es severa, como de hiperfiltración asociada a hiperglicemias más moderadas (76).**

**Los hallazgos de filtración glomerular disminuida asociados a altos valores de glicemia están en concordancia con observaciones clínicas que muestran que la GFR tiende a estar reducida en pacientes con hiperglicemia severa no controlada (cetoacidosis diabética o coma hiperglicémico no cetótico), mientras que la hiperfiltración se encuentra en pacientes diabéticos cuando la concentración de glucosa sanguínea no está tan elevada (66, 76).**

**Las causas de las alteraciones hemodinámicas son multifactoriales. Entre ellas han sido asociadas modificaciones del tamaño renal (68, 75) y glomerular (70), cambios en el volumen del líquido extracelular (71, 72), pobre control metabólico de la enfermedad (65, 71, 79), modificaciones en el sistema renina-angiotensina (84, 85).**

Los experimentos con sobrecarga de glucosa fueron diseñados para investigar si la GFR estaba influenciada por los cambios agudos de glucosa sanguínea.

Los dos grupos de ratas, controles y diabéticas, responden a la sobrecarga con glucosa y al consecuente aumento en los niveles de glucosa sanguínea, con una disminución de aproximadamente un 50 % en la GFR. La GFR mostró una correlación exponencial negativa significativa con los niveles de glucosa sanguínea en todos los grupos excepto para las ratas controles en el período basal (*figura 4.1*). Esto último refleja el alto grado de conservación de la homeostasis de la glucosa en estos animales. Las pendientes de las curvas de los grupos D, C + G y D + G no se diferenciaron significativamente lo que sugiere que el/los mecanismo/s responsable/s de la

disminución de la GFR por efecto de la glucosa podrían ser los mismos en ratas normales y diabéticas.

La modificación de la GFR debe atribuirse necesariamente a la alteración de alguno de sus factores determinantes. Entre estos factores puede estar implicado el RPF, controlado por la resistencia arteriolar (75). Los resultados muestran una correlación significativa entre GFR y RPF de todos los grupos estudiados (*figura 4.3*). Otros estudios de hemodinamia renal han demostrado una estrecha relación entre ambos parámetros (75). Por lo tanto la disminución de la RPF observada en las ratas diabéticas por aloxano podría ser un determinante en la disminución de la GFR.

Una explicación al efecto de la glucosa sería que incrementos en la osmolaridad en el fluido tubular, semejantes a los provocados por la presencia de este soluto en la orina, lleva a aumentos en la concentración de calcio intracelular en la mácula densa, lo que induce la liberación de factores vasoconstrictores de la arteriola aferente. Entre los factores propuestos se encuentran el ATP, adenosina y distintos eicosanoides (106). La vasoconstricción provocada llevaría a una disminución del RPF que justificaría la menor GFR observada en los animales diabéticos.

Estudios realizados por Brochner-Mortensen (72) en sujetos normales demuestran que una elevación de los niveles de glucosa sanguínea por sobrecarga de glucosa conduce a un incremento en la GFR. Sin embargo,

los niveles de hiperglicemia alcanzados no son comparables a los obtenidos en nuestros experimentos.

Por lo tanto, este análisis demuestra que en las ratas diabéticas por aloxano la hiperglicemia, crónica o aguda, sustenta en parte una reducción de la GFR.

La insulina, la diferencia más obvia entre controles y diabéticos, no estaría involucrada en los cambios hemodinámicos glomerulares observados en las ratas diabéticas. El estímulo en la secreción de insulina fue significativo en los controles donde el valor promedio de insulina luego de la sobrecarga de glucosa triplicó el valor basal. En las diabéticas, la insulinemia post glucosa no se diferenció significativamente del valor basal. Michels y colaboradores (79) muestran que cuando ratas diabéticas por aloxano, que presentan una disminución del 20 y 33 % en GFR y RPF respectivamente, son tratadas con insulina durante un mes luego de tres meses de diabetes, no mejoran significativamente la hemodinamia renal. No obstante, no puede descartarse que la secreción de insulina estimulada por la sobrecarga de glucosa juegue algún rol en las modificaciones hemodinámicas renales de los animales controles a pesar que presentan el mismo porcentaje de reducción en la GFR y RPF que los animales diabéticos.

Tucker y colaboradores (107) tienen hallazgos paradójicos. En ratas normales no diabéticas la infusión de insulina resulta en vasodilatación renal y aumento de la presión hidrostática glomerular mientras que eventos

opuestos ocurren tanto en ratas diabéticas por estreptozotocina tratadas y no tratadas con insulina, indicando que la insulina puede estimular la liberación de múltiples agentes vasoactivos, y que la relación o la acción vascular neta de vasoconstrictores y vasodilatadores está alterada en la rata diabética.

### **5.1.2. Volumen extracelular**

Brochner-Mortensen (72) ha propuesto que los cambios en el volumen extracelular justificarían, al menos en parte, las modificaciones en la filtración observadas en grupos diabéticos con moderada hiperglicemia. Es conocido que la contracción del volumen produce altas resistencias arteriolas en ratas normales (79). Los datos de la *figura 4.5.* junto a los de la *tabla 4.3.* indican que la hipofiltración glomerular observada en las ratas diabéticas por aloxano estaría relacionada a una disminución del VEC. Michels y colaboradores (79) informan que la disminución en la GFR encontrada en sus experimentos es debido a un incremento en la resistencia arteriolar lo cual lleva a una disminución de la RPF y, aunque sostienen que una causa posible para este fenómeno sería la disminución del volumen extracelular, ellos observaron incrementos. La reducción en la GFR acompañada de una caída en la RPF y depleción del VEC se asemeja a las modificaciones observadas en pacientes con cetoacidosis diabética. Contrariamente, con menor grado de hiperglicemia el volumen extracelular

tiende a expandirse, presumiblemente porque la diuresis osmótica asociada a glucosuria es menos profunda que en los casos de severa hiperglicemia (76).

Una causa potencial para la depleción del volumen extracelular en las ratas diabéticas por aloxano, sería la poliuria osmótica existente en estos animales o el incremento en la excreción de sodio urinario, asociados a la glucosuria. Las ratas diabéticas por aloxano mostraron pérdidas urinarias de sodio significativamente aumentadas. Esto coincide con trabajos realizados en ratas diabéticas por estreptozotocina (71, 78). La evidencia experimental indica que el transporte tubular de sodio y glucosa están interrelacionados (108, 109) lo que explica la relación entre glucosuria y excreción urinaria de sodio. Los experimentos mostraron que la diabetes tiene un efecto adverso sobre la eficiencia del proceso (*figura 4.6.*): a un nivel de reabsorción tubular de glucosa de 15  $\mu\text{moles}/\text{min}$ , los controles reabsorben 10 de sodio por  $\mu\text{mol}$  de glucosa. La relación disminuye a 5:1 en los animales diabéticos. Los datos de la *figura 4.7.* indican que, por día, las ratas diabéticas perdieron 19  $\mu\text{moles}$  de glucosa por  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}^+$ . La relación 19:1 enfatiza la asociación entre hiperglicemia y severas pérdidas de  $\text{Na}^+$ . Esta ineficiencia en la reabsorción de sodio inducida por la poliuria osmótica también contribuye a la caída en la concentración del sodio sérico.

### **5.1.3. Sistema renina-angiotensina**

El mantenimiento del balance de fluidos y electrolitos depende en parte de alteraciones en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Los informes de la literatura indican que el sistema renina-angiotensina (RAS) plasmático está suprimido particularmente en la diabetes experimental (110, 111). En concordancia, nuestros resultados establecen que cuatro semanas después de la inducción del estado diabético hay una reducción significativa en la actividad de la renina plasmática. Esta disminución podría ser causada por una acción directa de la hiperglicemia crónica o por algún mecanismo relacionado (106). Sin embargo, no puede descartarse la intervención de otros factores además de la glucosa: moduladores, concentración de receptores, respuesta de los distintos tejidos, etc. Es decir, posiblemente, los efectos sobre el RAS no ocurran sobre un solo componente del mismo, como podrían ser la renina o la angiotensina II, sino que sea una demostración de un efecto de bloqueo del sistema. Por otra parte, el modelo experimental usado no permite ni confirmar ni refutar la existencia de un RAS intrarrenal (85) y su participación en la determinación de los niveles de renina plasmática.

Aunque no hemos estudiado aldosterona, creemos que los resultados son consistentes con la siguiente hipótesis: la disminución en el RAS produciría una disminución en los niveles plasmáticos de ANG II y en la

secreción de aldosterona (84) la cual a su vez produciría de manera sucesiva: pérdidas de sodio, reducción del VEC, disminución de RPF y, como consecuencia, de la GFR. Por otro lado, la insulina parece ser necesaria para la secreción de aldosterona en la rata diabética (110).

#### **5.1.4. Tamaño renal**

Se ha sugerido (y aún es un tema discutido) un incremento en el tamaño renal como posible mecanismo responsable de la alta GFR en la diabetes humana (66,73). El tamaño renal incrementado probablemente refleja un aumento también en el tamaño de los glomérulos (69). Estudios clínicos demostraron que el tamaño renal aumenta temprano en esta condición, y que el tamaño incrementado está de alguna manera (desconocida) relacionado con el grado de control metabólico y puede ser revertido con una terapia insulínica rigurosa (67,68). Contrariamente, en la diabetes experimental, Michels y colaboradores (79) encuentran que luego de un mes de inducida la diabetes por aloxano, ratas que presentan hipofiltración tienen pesos renales disminuidos. Luego de tres meses de diabetes, en cambio, el peso renal no se diferenció del de las ratas controles de la misma edad.

Según los resultados obtenidos, la variación del tamaño renal, no parece estar relacionado con la hipofiltración en las ratas diabéticas por aloxano ya que el peso de los riñones no se diferenció del de los controles,

si bien las ratas diabéticas mostraron una disminución significativa del peso corporal.

Similarmente a lo observado por Christiansen y colaboradores en humanos (75), existió una correlación significativa entre tamaño renal y GFR de los animales diabéticos aunque, los valores de GFR siempre se encontraron por debajo de los de las ratas controles.

### **CONCLUSIONES:**

**Los hallazgos discutidos permiten concluir que:**

- **Las ratas diabéticas por aloxano presentan:**
  - **disminución de la velocidad de filtración glomerular**
  - **disminución del flujo plasmático renal**
  - **disminución del volumen del líquido extracelular**
- **Estas alteraciones serían ocasionadas por los altos valores de glucosa plasmática que inducen poliuria y modificaciones en el sistema renina-angiotensina aumentando la excreción urinaria de sodio.**

**Los resultados obtenidos, presentados en este capítulo, no justifican las pérdidas de fosfato observadas en las ratas diabéticas por aloxano.**

## **5.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA FUNCION PARATIROIDEA**

Durante muchos años, la PTH ha sido considerada como el principal controlador de la reabsorción de P cumpliendo un papel preponderante en la homeostasis de este compuesto. Este concepto estuvo basado en el hecho de que la PTH tiene la propiedad de actuar directamente sobre el epitelio renal reduciendo el transporte tubular de P. Además, la velocidad de secreción de la PTH, al menos en algunas condiciones clínicas y experimentales, parece estar ajustada de tal manera que la hormona sería capaz de mantener la homeostasis del P a través de su acción renal. De esta manera, existe una relación directa entre el suministro de P y secreción de PTH (112). Por otra parte, el hipo- e hiper-paratiroidismo son condiciones fisiopatológicas acompañadas por cambios en el transporte tubular de P y , como consecuencia, en la concentración plasmática de P. A primera vista, estos hechos indiscutibles parecen sustentar la noción de que la PTH juega un rol clave en la homeostasis del P (4).

Los niveles plasmáticos de PTH en la diabetes experimental son variados (introducción 1.7). El modelo de diabetes de corta duración (5-12 días) está caracterizado por niveles elevados de PTH plasmática (60, 61).

Contrariamente, en la diabetes de larga duración (7 semanas) se encuentran niveles bajos de PTH (55, 56). Sin embargo, estas variaciones no parecen estar relacionadas con la duración de la diabetes ya que Ishida et al. (62) y Glajchen et al. (63) encontraron niveles elevados de la hormona en diabetes

de 5-7 semanas de duración. Más aún, Weber et al. (47) obtuvieron niveles circulantes de PTH elevados en diabetes de 10 meses de duración.

Cualquiera sean las causas implicadas en la alteración de los niveles circulantes de PTH, los resultados mostrados en la *tabla 4.6* indican que los niveles de PTH sérica se encuentran elevados en la diabetes inducida por aloxano. Este hallazgo llevó a pensar que realmente la PTH era un factor importante en las pérdidas urinarias de P ya que, como ha sido referido en la introducción (1.3.2.1), ésta hormona inhibe el transporte renal de P en condiciones fisiológicas. Para comprobar efectivamente su participación, se realizó la ablación de las glándulas paratiroides. La fosfaturia de ratas no diabéticas TPTX fue, como se esperaba, el 66% de la de los controles. Así, la fosfaturia esperada en los animales diabéticos debería haber sido aproximadamente  $28.7 \text{ mg/día} \times 0.66 = 18.94 \text{ mg/día}$ . Sin embargo, paradójicamente en estos animales la excreción renal, aunque no significativa, fue de más del doble de dicho valor. Esto sugiere que la acción fosfatúrica de la PTH está deteriorada en la diabetes.

Existen algunas hipótesis que explicarían este hecho. Una de ellas, plantea que la PTH circulante no es biológicamente activa (88). Los experimentos descritos en esta tesis no permiten responder de manera directa a esta pregunta. Similarmente a lo que se demuestra con estudios sobre insulina (113), la glicosilación de la PTH con subsiguiente pérdida de actividad podría ser una causa de ello. Otra hipótesis propone que la

diabetes insulínopénica induce resistencia a la acción de la PTH en el riñón. Estos efectos son causados por el déficit de insulina y no se deben a la hiperglicemia. La falta de insulina afectaría las acciones de la PTH en el proceso de unión de la hormona a las células tubulares y producción de AMPc (114).

Ya que la ablación de las glándulas paratiroides no corrige las pérdidas urinarias de P, evidentemente, factores diferentes a la PTH estarían jugando un rol principal en el manejo renal de P en la diabetes. En concordancia con observaciones clínicas en pacientes humanos (44, 45), la PTH parece ser un factor menor en las pérdidas de P por las ratas diabéticas.

Corman y colaboradores (115) demostraron que la inhibición en el transporte de P por efecto de la glucosa es independiente de la presencia de PTH circulante. Por otra parte, la adaptación renal a una dieta con bajo contenido en P es independiente de dicha hormona (116, 117) y la administración de PTH a perros depletados de P no aumenta su excreción urinaria (118). Esto avala la idea de que el riñón es capaz de ajustar la reabsorción renal de P a las necesidades del organismo independientemente de la PTH.

**CONCLUSIONES:**

a) Las ratas diabéticas por aloxano presentan niveles elevados de PTH

b) La paratiroidectomía no corrige las pérdidas urinarias de P en estas ratas

c) En el estado diabético, la PTH no jugaría un rol principal en el manejo renal de P, descartándose su participación como causa de la hiperfosfaturia de las ratas diabéticas por aloxano.

### **5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERGLICEMIA Y/O EL DEFICIT DE INSULINA SOBRE LA REABSORCIÓN RENAL DE FOSFATO**

En el riñón de mamífero, las células tubulares proximales reabsorben D-glucosa y fosfato inorgánico por mecanismos de cotransporte con sodio y utiliza estos solutos como sustratos para el metabolismo. Los procesos celulares para estos dos solutos parecen estar relacionados interactuando en varios pasos.

Ya en 1944 Pitts y Alexander (28) demostraron que la infusión de glucosa en cantidades suficientes para saturar su mecanismo de reabsorción, redujo el  $TmPO_4$ . Este fenómeno sugirió un sitio común de transporte para ambos compuestos. La administración de floricina (que causa inhibición selectiva de la reabsorción de glucosa por los túbulos renales) aumenta el  $TmPO_4$ . Este hecho señala que los mecanismos involucrados en la reabsorción de glucosa y fosfato no son idénticos.

Posteriormente, en 1972, Ginsburg (31) confirmó estas observaciones y sugirió que ambos solutos compiten por un origen común de energía y no por un sitio de transporte.

Un hecho importante es que la capacidad reabsortiva para la glucosa es marcadamente estable y relativamente insensible a los niveles de hormonas en plasma (119). Contrariamente, la capacidad reabsortiva para el fosfato es variable pudiendo establecerse a diferentes niveles de acuerdo a

las condiciones fisiológicas o patológicas y es influenciada por los niveles de hormonas circulantes, entre ellas PTH e insulina (9).

En el estado diabético hemos descartado el predominio de la PTH como causa de la hiperfosfaturia.

Respecto a la insulina, se conoce que actúa directamente sobre el túbulo renal estimulando la reabsorción de P. Datos obtenidos del análisis del fluido tubular indican que la deficiencia de insulina, independientemente de la PTH, deteriora el transporte tubular de P y sugieren que los niveles basales de insulina endógena son importantes en la homeostasis renal del P (23). Por otro lado, Nizet et al. (120) demostraron en riñón aislado de perro, que la disminución en la reabsorción de P cuando la glucosa plasmática aumenta es, primariamente, un fenómeno renal autónomo y, de esta manera, excluyeron la interferencia de la insulina y otras hormonas.

Surgió entonces la siguiente pregunta **¿es el exceso de glucosa o la carencia de insulina el factor responsable por el incremento en las pérdidas de P en orina en las ratas diabéticas por aloxano?**.

Para resolver esta incógnita, se investigó la interacción tubular "in vivo" entre glucosa y P a niveles variables de insulina. Para eliminar la influencia de las variaciones de P sobre la reabsorción tubular de fosfato se realizaron experimentos con carga de P controlada. Para aumentar el rango de carga tubular de glucosa y los niveles de insulina plasmática, se administró glucosa a ratas controles (C + G), o a ratas diabéticas se les

suministró insulina (D + I) o insulina y glucosa (D + I + G). Con esto se logró un amplio rango de niveles plasmáticos de insulina que van desde la hipoinsulinemia a la hiperinsulinemia.

En un primer experimento, observamos que, probablemente a causa de su deterioro metabólico, las ratas diabéticas necesitan niveles mucho mayores de insulina que los controles para normalizar el manejo renal de fosfato. La *figura 4.6* muestra la insensibilidad de las ratas diabéticas a la insulina. Es necesario aumentar 25 veces la concentración de insulina para llevar los valores de EFP en las ratas diabéticas a valores normales. Es decir que, bajo las condiciones experimentales descritas, los túbulos renales de las ratas diabéticas son aproximadamente 25 veces menos sensibles a la insulina que las controles respecto al manejo de P. Por otra parte, la administración crónica de una dosis adecuada de insulina a ratas diabéticas normaliza sus balances de P e incrementa el peso corporal (*tabla 4.6*). Coincidentemente, en pacientes diabéticos pobremente controlados, la sensibilidad a la insulina está disminuida (121) y existe resistencia a la acción de la insulina aún cuando en pacientes diabéticos tipo I el número de receptores está incrementado respecto a lo normal (122). Este fenómeno es reversible cuando los pacientes son sometidos a un tratamiento riguroso con insulina (123).

La competencia entre glucosa y fosfato por el transporte tubular se muestra en la *figura 4.9*. En ratas controles (C), con insulina normal, y diabéticas tratadas con insulina (D + I), y que muestran glicemias normales, el P y la glucosa son reabsorbidos, manteniendo una relación molar de 1:4. La relación cambia a 1:20 para los diabéticos (con bajos niveles de insulina), controles perfundidas con glucosa (con altos niveles endógenos de insulina), y diabéticos tratados simultáneamente con glucosa y e insulina (D + I + G). Con glicemias por debajo de 200 mg% la relación molar es 1:4. Con glicemias superiores a 450 mg% la relación aumenta a 1:20. El cambio en la relación P:G indica la competencia entre ambos sustratos por la reabsorción tubular. La relación P:G se insinúa como una variable continua: tres ratas, tratadas con insulina, con glicemias entre 220 y 360 mg% presentaron una relación de 1:7 a 1:10.

¿Cuáles pueden ser los mecanismos responsables de esta competencia?

Se han propuesto dos mecanismos generales por los cuales la glucosa y el P podrían interaccionar:

Un primer mecanismo sería que la glucosa tenga un efecto directo sobre el transporte de P. Esto ocurriría si los transportes de ambas sustancias involucraran un componente común en la membrana luminal del túbulo contorneado proximal (por ej. un transportador multifuncional), o si existieran interacciones alostéricas entre los transportadores. Este efecto

directo de la glucosa sobre el transporte de P fue descartado por Barret y colaboradores (124) en estudios en vesículas de membrana del borde en cepillo.

Por otra parte, el cambio en la relación P:G (1:4 a 1:20) podría deberse a un efecto indirecto de la glucosa sobre el transporte de P, pudiendo estar asociado con factores relacionados al transporte de sodio. Conociendo que tanto el fosfato como la glucosa son cotransportados con sodio, el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la reabsorción de P podría ser explicado si se supone que en el túbulo proximal un incremento en el flujo reabsortivo de glucosa disminuye la disponibilidad de sodio en el lumen, lo cual reduce la velocidad de entrada de P (125).

Existen evidencias a favor y en contra de esta última hipótesis.

a) Estudios con vesículas de membranas de borde en cepillo renal mostraron que el efecto inhibitorio de la glucosa sobre el P es debido a la disipación del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  aunque el mecanismo responsable para tal acción en células intactas no está claro (124). En acuerdo parcial, este trabajo nota que la cantidad de P reabsorbido está correlacionada con la masa de glucosa reabsorbida.

b) Por otra parte, Stoll et al. (126), demostraron que la entrada de glucosa a vesículas de membrana del borde en cepillo no está afectada por varios factores que afectan al cotransporte P/Na. Esto sugiere que la competencia entre glucosa y fosfato no involucra al cotransporte P/Na. Una

interferencia similar puede delinearse desde el trabajo de Knight et al (125). Ellos demostraron en la rata que el efecto de la D-glucosa sobre la reabsorción de P requiere de absorción tubular de glucosa y no se debería a una interacción entre glucosa y P en la superficie luminal de las células tubulares renales. El hecho de que la observación de que la interacción entre glucosa y P ocurra en células aisladas (109) y preparaciones de membranas (124) indicarían que las interacciones no involucran hormonas circulantes.

A pesar del efecto antifosfatúrico de la insulina informado por los distintos autores (21, 23, 25) y aún en presencia de niveles extremadamente altos de esta hormona, la hiperfosfaturia de ratas diabéticas está principalmente relacionada con las cantidades de glucosa aportadas al túbulo y es corregida disminuyendo la sobrecarga de glucosa al túbulo. Esto está de acuerdo con De Fronzo et al (21) que, utilizando perros normales, concluyeron que cuando ocurre la hiperinsulinemia asociada a hiperglicemia y a un incremento en la carga filtrada de glucosa, la estimulación del transporte de P por insulina esté enmascarado por la presencia de cantidades incrementadas de glucosa no reabsorbida en el túbulo. Corman et al (115) utilizando técnicas de inyección intraarterial de trazadores radioactivos demostraron que la influencia de la glucosa sobre la reabsorción de P es debido a un mecanismo intrarrenal y no al efecto de cambios en factores humorales secundarios a la administración de glucosa. Más aún, sugieren

que la inhibición en el transporte de P sería independiente de la presencia de PTH o insulina circulantes.

Por último cabe mencionar que el efecto inhibitorio de la glucosa está relacionada a la reabsorción de glucosa per se y no a un efecto osmótico intraluminal no específico, producido por la presencia de grandes cantidades de glucosa en orina. Si bien esto no se estudió en esta tesis, varios investigadores han mostrado claramente que la presencia de moléculas no reabsorbibles osmóticamente activas en sangre y/o luz tubular, como el manitol, no produce cambios en la reabsorción de P (30, 115).

### **CONCLUSIONES:**

#### **La hiperfosfaturia de ratas diabéticas por aloxano:**

- **puede coexistir con niveles variables, altos o bajos, de insulina**
- **se debe a la gran cantidad de glucosa filtrada por estas ratas que compite con el P por su reabsorción**
- **se corrige disminuyendo la sobrecarga de glucosa al túbulo renal.**

#### **5.4. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFATO DE LOS TEJIDOS**

El hueso es el gran reservorio de minerales del organismo. Durante la privación de P, el contenido de los tejidos blandos se mantiene a costa de la desmineralización ósea (127).

En la diabetes y el ayuno los tejidos exhiben una pérdida de la capacidad fosforilativa, lo que disminuye la utilización de P por la célula. Este fenómeno debería manifestarse en un aumento del P plasmático. En la diabetes inducida por aloxano demostramos disminución del contenido de fosfato en el riñón, hígado, músculo y hueso asociada a concentración plasmática de fosfato dentro del rango normal (*tabla 4.5*). Es lógico concluir que las pérdidas de fosfato de los tejidos contrarresten las pérdidas urinarias del ión para mantener la fosfatemia. Este hecho podría estar relacionado con procesos regulatorios que mantienen dicha fosfatemia a expensas del P del hueso y/o de los tejidos blandos y resultar en una disfunción multiorgánica.

Los ésteres de P juegan roles críticos en el metabolismo celular: los nucleótidos de purina proveen a la célula de energía almacenada. Los intermediarios fosforilados interesan en la conservación y transferencia de energía. Es conocido que el  $P_i$  está involucrado en la glucólisis y la fosforilación oxidativa, las dos principales fuentes de ATP. En la vía glucolítica es un sustrato para la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa y estimula las actividades de la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa. En la

fosforilación oxidativa, el Pi participa como sustrato en la fosforilación del ADP. Los fosfolípidos son el mayor constituyente de las membranas celulares y la fosforilación de proteínas es uno de los medios más importantes de regular su función (32). Si la concentración citosólica y/o mitocondrial disminuye por debajo de cierto valor crítico, las velocidades de glucólisis y el consumo de oxígeno podrían estar disminuidas. Además, estudios hechos en células aisladas de túbulo proximal renales demuestran que la entrada de P por la superficie luminal representa la principal fuente de P intracelular, tanto orgánico como inorgánico, y que el metabolismo de la glucosa y la respiración mitocondrial compiten por el P cuando su disponibilidad es limitada (128). A causa de estos efectos fisiológicos del P, alteraciones crónicas en la homeostasis del P podrían resultar en algún disturbio funcional en cualquier célula somática.

Sobre el tejido óseo, las consecuencias son más complejas. El metabolismo del P afecta tanto la mineralización ósea como la síntesis de la matriz. Sin embargo, los efectos del P sobre ambos componentes óseos parecen ser fenómenos independientes (129).

**In vitro se ha demostrado que la deficiencia de P impediría la síntesis de colágeno (129). Por otra parte, está ampliamente estudiado que la diabetes provoca una disminución de la masa ósea, tanto en**

**humanos (130, 131, 132, 133) como en animales de experimentación (37, 134, 135). Nuestro trabajo muestra disminución del peso del hueso y revela que el impacto de la diabetes es mayor en la composición mineral que en la matriz, y que la deficiencia de P en las cenizas del hueso se relaciona negativamente con la severidad de la diabetes estimada por los niveles promedio de glucosa sérica. El impacto inferior en la matriz posiblemente pueda atribuirse a la resistencia del colágeno glicosilado a las solitaciones enzimáticas en los animales diabéticos (37). Estudios hechos por McNair (136) demuestran en pacientes una disminución del contenido mineral óseo claramente asociado con pobre control metabólico, indicando la influencia de la homeostasis anormal de la glucosa sobre la pérdida de mineral óseo en la diabetes. Concluyó que en la patogénesis de la**

**pérdida ósea en la diabetes estaría involucrado el pobre control metabólico de la enfermedad y que estaría causado probablemente por acción directa sobre el metabolismo del hueso y mediado a través de un aumento en la excreción renal de minerales.**

Una explicación completa de la patogénesis de la enfermedad ósea diabética es difícil de definir y resulta claro que un solo mecanismo no puede explicar todos los fenómenos observados. Sin embargo, en base a la marcada pérdida urinaria de P demostrada en la diabetes por aloxano, a la importancia del metabolismo del P en la proliferación celular y en la mineralización ósea y a la disminución del contenido de P en el mineral óseo podemos inferir que las pérdidas de P por orina podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad ósea diabética.

### **CONCLUSIONES:**

**Se concluye que las pérdidas urinarias de P:**

- 1) se reflejan en la disminución del contenido de P en los tejidos blandos**
- 2) repercuten en el tejido óseo, provocando una disminución del contenido de P afectando la composición del mineral óseo.**
- 3) podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad ósea en la diabetes mellitus.**

## **CONCLUSION GENERAL**

La literatura científica ha establecido que la hiperfosfaturia de la diabetes reconoce múltiples factores. Los trabajos publicados se han ocupado de establecer relaciones unifactoriales. El aporte de esta tesis reside en el análisis y evaluación conjunta de los principales factores que podrían estar involucrados en la excreción de P aumentada y en el estudio de las consecuencias que esto puede traer al organismo.

Los datos presentados en esta tesis, aunque no permiten una definición del mecanismo por el cual la glucosa inhibe la reabsorción renal tubular de P, permiten concluir de manera clara respecto a las causas de la hiperfosfaturia observada en la diabetes mellitus. Los efectos no pueden ser atribuidos a cambios en la hemodinamia renal, efectos de la PTH o al déficit de insulina. Se confirmó que la competencia glucosa-fosfato por la reabsorción tubular observada en especies normales (no diabéticas) funciona en el animal diabético y que es la causa de las pérdidas de fosfato incrementadas en la orina. Por último, se demostró que estas pérdidas interaccionan negativamente, tanto con los tejidos blandos como con el hueso. Al respecto, es interesante notar que deja abierta una puerta para futuras investigaciones tendientes a profundizar las consecuencias clínicas de este fenómeno.

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

- m) Becker MA, Rozengur E. (1982). "Inorganic phosphate is necessary for the stimulation of DNA synthesis in Swiss 3T3 cells by pure mitogenic agents". *Exp Cell Res* 139:431-436.
- n) Farley JR, Tarbaux N, Hall S, Baylink DJ. (1988). "Evidence that fluoride-stimulated <sup>3</sup>(H)-thymidine incorporation in embryonic chick calvarial cell cultures is dependent on the presence of a bone cell mitogen, sensitive to changes in the phosphate concentration, and modulated by systemic skeletal effectors". *Metabolism* 37:988-995.
- o) Berner Y, Shike M. (1988). "Consequences of phosphate imbalance". *Ann Rev Nutr* 8:121-148.
- p) Jean Philippe Bonjour, Joseph Caverzasio and René Rizzoli. (1991). "Homeostasis of inorganic phosphate and the kidney" en *Rickets*, Vol 21:35-46. Editado por Francis H. Glorieux. Nestlé Nutrition Workshop Series. Nestlec Ltd, Vevey/Raven Press Ltd. New York.
- q) Kemp GJ, Blumsohn A, Morris BW (1992). "Circadian changes in plasma phosphate concentration, urinary phosphate excretion, and cellular phosphate shifts". *Clin Chem* 38/3:400-402.

- r) Livingston RB. (1993). "Mecanismos de control visceral" en Best y Taylor: Bases fisiológicas de la práctica médica, cap. 69:1262-1279, 12<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- s) Laurence G. Wesson. (1997). "Homeostasis of phosphate revisited". Nephron 77:249-266.
- t) Takeda E, Taketani Y, Morita K, Tatsumi S, Katai K, Nii T, Yamamoto H, Miyamoto K. (2000). "Molecular mechanisms of mammalian inorganic phosphate homeostasis". Advan Enzyme Regul 40:285-302.
- u) Berndt TJ, Knox FG. (1995). "Renal handling of phosphate" en Textbook of Nephrology, vol 1, cap 22:388-398. Editado por Shaul G, Massry MD, Richard J Glassock MD, Baltimore, Williams and Wilkins.
- v) Bijvoet OLM. (1976). "The importance of the kidney in phosphate homeostasis" en Phosphate metabolism kidney and bone, cap2:421-474. Paris, Armour Montagu.
- w) Amiel C. (1980). "Sites of renal tubular reabsorption of phosphate in renal handling of phosphate". Cap2:39-57. S.G. Massry and H. Fleisch editores, Plenum Medical Book Company, New York and London.
- x) Murer H, Werner A, Reshkin S, Wuarin F, Biber J. (1991). "Cellular mechanism in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate". Am J Physiol 260 (Cell Physiol 29):C885-C899.
- y) Biber J, Murer H, Forster I. (1998). "The renal type Na/phosphate cotransporter". J Bioenerg Biomembr 30/2:187-194.

z) Murer H, Forster I, Hernando N, Lambert G, Traebert M, Biber J. (1999). "Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary Pi". *Am J Physiol* 277 (Renal Physiol 46):F676-F684.

aa) Kempson S. (1996). "Peptide hormone action on renal phosphate handling". *Kid Int* 49:1005-1009.

bb) Hammerman MR, Karl IE, Hruska KA. (1980). "Regulation of canine renal vesicle Pi transport by growth hormone and parathyroid hormone". *Biochim Biophys Acta* 603:322-335.

cc) Malmstrom K, Murer H. (1987). "Parathyroid hormone regulates phosphate transport in OK cells via an irreversible inactivation of a membrane protein". *FEBS Lett* 216:257-260.

dd) Kempson SA, Lotscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. (1995). "Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat proximal tubules". *Am J Physiol* 268 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 37):F784-F791.

ee) Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lotscher M, Quabius ES, Biber J, Murer H. (1997). "Parathyroid hormone dependent degradation of type II Na/Pi cotransporters". *J Biol Chem* 272:20125-20130.

- ff) Hammerman MR, Rogers S, Hansen VA, Gavin JR 3<sup>rd</sup>. (1984). "Insulin stimulates Pi transport in brush border vesicles from proximal tubular segments". Am J Physiol 247 (Endocrinol Metab 10):E616-E624.
- gg) De Fronzo RA, Goldberg M, Agus ZS. (1976). "The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport". J Clin Invest 58:83-90.
- hh) Roy DR, Seely JF. (1981). "Effect of glucose on renal excretion of electrolytes in the rat". Am J Physiol 240 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 9)F17-F24.
- ii) Lau K, Guntupalli J, Eby B. (1983). "Effects of somatostatin on phosphate transport: evidence for the role of basal insulin". Kidney Int 24:10-15.
- jj) De Fronzo RA, Cooke CR, Andres R, Fallona R, Davis PJ. (1975). "The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man". J Clin Invest 55(4):845-855.
- kk) Hammerman MR. (1985). "Interaction of insulin with the renal proximal tubular cell". Am J Physiol 249 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 18):F1-F11.
- ll) Møllerup ET. (1974). "Insulin effects on calcium, magnesium and phosphate metabolism in rats". Acta Endocrinol 75:748-755.
- mm) Taylor DJ, Coppack SW, Cadoux-Hudson TA, Kemp GJ, Radda GK, Frayn KN, Ng LL. (1991). "Effect of insulin on intracellular pH

and phosphate metabolism in human skeletal muscle in vivo". Clin Sci (Lond) 81:123-128.

nn) Pitts RF, Alexander RS. (1944). "The renal reabsorptive mechanism for inorganic phosphate in normal and acidotic dog". Am J Physiol 142:648-662.

oo) Cohen J, Berglund F, Lotspeich W. (1956). "Renal tubular reabsorption of acetoacetate, inorganic sulfate and inorganic phosphate in the dog as affected by glucose and phlorizin". Am J Physiol 184:91-96.

pp) Fox M, Their S, Rosenberg L, Segal S. (1964). "Impaired renal tubular function induced by sugar infusion in man". J Clin Endocr 24:1318-1324.

qq) Ginsburg J. (1972). "Effect of glucose and free fatty acid on phosphate transport in dog kidney". Am J Physiol 222:1153-1160.

rr) Blanco A. Química Biológica (2000). Cap 21:385-446., 7ª edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.

ss) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. (1979). Diabetes 28:1039-1057.

tt) Shafrir E. (1990). "Diabetes in animals" in Diabetes Mellitus, theory and practice. Capitulo 20, pp 299-340. 4ª edición. Editado por Harold Rifkin y Daniel Porte Jr. Elsevier. New York.

uu) Boquist L. (1992). "Aspects of the diabetogenicity of alloxan and streptozotosin, with special regard to a mitochondrial hypothesis" in

Lessons from animal diabetes IV. Capitulo 1,pp 1-16. Ed. E. Shafrir. Biennial Review Volume. Jerusalem.

wv) Lazarow A, Palay S. (1946). "The production and course of alloxan diabetes in the rat". J Lab Clin Med 31(9):1004-1015.

ww) Locatto ME, Abranzon H, Caferra D, Fernández MC, Alloatti R, Puche RC. (1993). "Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosilation and parathyroid activity on bone turnover". Bone Mineral 23:129-144.

xx) Prah J, Steenrod W Jr. (1965). "Production of alloxan diabetes and ketoacidosis in the laboratory rat". Diabetes 14(5):289-294.

yy) Steiner D, Rauda V, Williams R. (1961). "Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rat". Endocrinology 68(5):809-817.

zz) Malaisse W. (1982). "Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell". Biochemical Pharmacology 31(22):3527-3534.

aaa) Astrug AK. (1966). "Studies on the clearance and tubular reabsorption of phosphates in diabetes mellitus and some of its complication". Diabetologia 2:198-201.

bbb) Levitan B. (1951). "Effects in normal man of hyperglycemia and glycosuria on excretion and reabsorption of phosphate". J Appl Physiol 4:224-226.

ccc) Ditzel J, Brochner-Mortensen J, Rodro P. (1981). "Elevated glomerular filtration rate in early diabetes may be explained by increased

sodium reabsorption secondary to an impairment in renal tubular handling of phosphate". *Horm Metab Res Suppl* 11:87-89.

ddd) Ditzel J, Brochner-Mortensen J, Kawahara R. (1982). "Dysfunction of tubular phosphate reabsorption related to glomerular filtration and blood glucose control in diabetic children". *Diabetologia* 23(5):406-410.

eee) Raskin P, Pak CYC. (1981). "The effect of chronic insulin therapy on phosphate metabolism in Diabetes Mellitus". *Diabetologia* 21:50-53.

fff) Simeckova A, Stolba P, Hatle K, Zamrazil V, Neradilova M. (1990). "The effect of streptozotocin-induced diabetes treated with insulin on the metabolism of calcium, magnesium and phosphorus". *Vnitr Lek* 36(6):526-530.

ggg) Weber CJ, Hardi MA, Williams GA, Lerner RL, Reemtsma K. (1976). "Pancreatic islets transplantation and hyperparathyroidism in diabetic rats". *Surg Forum* 27:317-320.

hhh) Greenspan F, Baxter J. "Endocrinología básica y clínica". (1995). i¥Á1059

105105đ;105105105105105105105105105105105105P^105105

iii) 106bjbjýíŕ10

6106







ooo) Hough S, Avioli L, Bergfeld M, Fallon M, Slatopolsky E, Teitelbaum L. (1981). "Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy": *Endocrinology* 108:2228-2234.

ppp) Hough S, Russell JE, Teitelbaum SL, Avioli L. (1982). "Calcium homeostasis in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat". *Am J Physiol* 242:E451-E456.

qqq) Thalassinou NC, Hadjiyanni P, Alevizaki C, Philokiprou D. (1993). "Calcium metabolism in diabetes mellitus: effect of improved blood glucose control". *Diabet Med* 10(4):341-344.

rrr) McNair P, Christensen MS, Madsbad S, Christiansen C, Transbol I. (1981). "Hypoparathyroidism in diabetes mellitus". *Acta Endocrinol (Copenh)* 96(1):81-86.

sss) Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijs J. (1988). "Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus". *Diabetes* 37(1):8-12.

ttt) Schneider LE, Hargis GK, Schedl HP, Williams GA. (1974). "Parathyroid function in the alloxan diabetic rat". *Endocrinology* 95:749-752.

uuu) Schedl HP, Heath H, Wenger J. (1978). "Serum calcitonin and parathyroid hormone in experimental diabetes. Effects of insulin treatment". *Endocrinology* 103:1368-1373.

vvv) Ishida H, Seino Y, Nishi S, Kitano N, Seno M, Taminato T, Matsukura S, Ishizuka S, Imura H. (1985). "Effects of insulin on altered mineral and vitamin D metabolism in streptozotocin-induced diabetes". *Acta Endocrinologica* 108:231-236.

www) Glajchen N, Epstein S, Ismail F, Thomas S, Fallon M, Chakrabarti I. (1988). "Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus. Osteocalcin as a measure of bone remodelling". *Endocrinology* 123:290-295.

xxx) Zubkova ST, Epshtein EV, Bulat OV. (1991). "Secretion of calcium-regulating hormones in diabetes mellitus". *Probl Endokrinol* 37(1):20-22.

yyy) Mogensen CE. (1971). "Kidney function and glomerular permeability to macromolecules in early juvenile diabetes". *Scand J Clin Lab Invest* 28:79-90.

zzz) Mogensen CE. (1971). "Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes". *Scand J Clin Lab Invest* 28:91-100.

aaaa) Ditzel J, Junker K. (1972). "Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetes". *British Medical Journal* 2:13-19.

- bbbb) Mogensen CE, Andersen MJF. (1973). "Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes". *Diabetes* 22:706-12.
- cccc) Seyer Hansen K. "Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats". (1976). *Clin Sci Mol Med* 51:551-555.
- dddd) Osterby R, Gundersen HJG. (1975). "Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I Early abnormalities". *Diabetologia* 11(3):225-229.
- eeee) Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blantz RC.(1991). "Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats". *Kidney Int* 39:1176-1183.
- ffff) Brochner-Mortensen J. (1973). "Glomerular filtration rate and extracellular fluid volumes during normoglycemia and moderate hyperglycemia in diabetes". *Scand J Clin Lab Invest* 32:311-316.
- gggg) Anderson S, Vora JP. (1995). "Current concepts of renal hemodynamics in diabetes". *J Diabetes Complications* 9/4:304-307.
- hhhh) Mogensen CE. (1976). "Renal function changes in diabetes". *Diabetes* 25:872-879.
- iiii) Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving HH. (1981). "Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics". *Diabetologia* 20(4):451-456.

- jjjj) Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. (1981). "Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus". *Kidney Int* 19:410-415.
- kkkk) Bank N, Lahorra MA, Aynedjian HJ. (1987). "Acute effect of calcium and insulin on hyperfiltration of early diabetes". *Am J Physiol* 252(15):E13-E20.
- llll) Bank N, Lahorra MAG, Aynedjian HS, Wilkes BM. (1988). "Sodium restriction corrects hyperfiltration of diabetes". *Am J Physiol* 254:F668-F676.
- mmmm) Michels LD, Davidman M, Keane WF. (1981). "Determinants of glomerular filtration and plasma flow in experimental diabetic rats". *J Lab Clin Med* 98:869-885.
- nnnn) Ilstrup KM, Keane W, Michels LD. (1981). "Intravascular and extracellular volumes in the diabetic rat". *Life Sci* 29:717-724.
- oooo) Garcia VM, Girardi G, Ochoa JE, Torres AM, Elias MM. (1998). "Early manifestation of nephropathy in alloxan treated rats". *Renal Failure* 20(4):551-564.
- pppp) Mogensen CE, Christensen NJ, Gundersen HJG. (1978). "The acute effect of insulin on renal hemodynamics and protein excretion in diabetes". *Diabetologia* 15:153-157.
- qqqq) Kurokawa K, Silverblatt FJ, Klein KL, Wang MS, Lerner RL. (1979). "Binding of <sup>125</sup>I-insulin to the isolated glomeruli of rat kidney". *J Clin Invest* 64(5):1357-1364.

rrrr) Christlieb AR (1976). "Renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes mellitus". *Diabetes* 25:820-825.

ssss) Burns KD. (2000). "Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney". *Am J Kidney Diseases* 36/3:449-467.

tttt) Myers BD, Deen WM, Brenner BM. (1975). "Effects of norepinephrine and angiotensin on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat". *Circ Res* 37:101-110.

uuuu) Calderari S, Font MT, Garroq O, Martínez SM, Puche RC, Tarrés MC. (1991). "The imbread IIM/Fm stock". *Rat Newsletter*, 25:28-29.

vvvv) Locatto ME, Fernández M del C, Abranzon H, Caferra D, Puche RC. (1990). "Calcium metabolism of rats of varying degrees of insulinopenia". *Bone Miner*, 8:119-130.

www) "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" National Institute of Health. Publication N° 86-23, revised 1985.

xxxx) Remic R, van Dongen JJ, Rensema JW, van Wunnik GHJ (1990). "General techniques" en *Manual of microsurgery on the laboratory rat*". Cap. 7:81-156. Elsevier, Amsterdam.

yyyy) Remic R, van Dongen JJ, Rensema JW, van Wunnik GHJ, Bertens A (1990). "Anesthesia of the laboratory rat" en *Manual of microsurgery on the laboratory rat*". Cap. 6:61-69. Elsevier, Amsterdam.

zzzz) Gaudino M, Schwartz IL, Levit M. (1948). "Inulin volume of distribution as measure of extracellular fluid in dog and man". Proc Soc Exper Biol Med 68:507.

aaaaa) Pomeau-Delille, G. (1953). "Généralités" en Techniques biologiques en endocrinologie experimentale chez la rat. Cap 1:3-30. Masson et Cie Editeurs. Paris.

bbbbb) Ingle DJ, Griffith JQ. (1962). "Surgery of the rat" en The rat in the laboratory investigation. Cap 16:434-452. 2ª edición. Edmund Farris PHD, JohnGriffith Jr MD Editors. New York.

ccccc) Archibald RM. (1960). "Determinación de nitrógeno por el Método de Kjeldahl" en Métodos seleccionados de análisis clínicos. Vol II:126-138. Editorial Aguilar, Madrid.

ddddd) Washco ME, Rice N. (1961). "Determination of glucose by an improved enzymatic". Method Clinic Chem 7:542-546.

eeeee) Chen PS, Toribara TY, Warner H. (1956). "Microdetermination of phosphorus". Anal Chem 28:1756-1759.

fffff) Searcy RL, Gough GS, Korotzer JC, Berquist NN. (1961). "Evaluation of a new technique for estimation of urea in serum". Am J Med Technol 26:255-261.

ggggg) Walser M, Davison DJ, Orloff J. (1955). "Renal clearence of alkali-stable inulin". J Clin Invest 34:1520-1523.

- 100) Waugh WH, Beall PT. (1974). "A simplified measurement of PAH and other arylamines in plasma and urine". *Kidney Int* 5:429-436.
- 101) Yallow RS, Bergson SA. (1960). "Immunoassay of endogenous insulin in man". *J Clin Invest* 39:1157-1175.
- 102) Mallette LE, Tuma SN, Berger RE, Kirkland JL. (1982). "Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone using an homologous antiserum with a carboxy-terminal fragment of bovine parathyroid hormone as radioligand". *J Clin Endocrinol Metab* 54:1017-1025.
- 103) Haber E, Koemer T. (1969). "Application of radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity and aldosterone". *J Clin Endocrinol* 29:1349.
- 104) Snedecor GW, Cochran WG. (1965). "Statistical Methods". Ames, Iowa State University Press.
- 105) Blankestijn OJ, Derkx FHM, Birkenhager JC, Lambers SWJ, Mulder P, Verschoor L, Schalekamp MA, Weber RFA. (1993). "Glomerular hyperfiltration in insulin dependent diabetes mellitus correlated with enhanced growth hormone secretion". *J Clin Endocrinology and Metabol* 77:498-502.
- 106) Navar LG. (1998). "Regulation of renal hemodynamics". *Am J Physiol* 275 (Adv Physiol Educ 20):S221-S235.

- 107) Tucker BJ, Anderson C, Thies RS, Collins RC, Blantz RC. (1991). "Glomerular hemodynamic alterations during acute hyperinsulinemia in normal and diabetic rats". *Kidney Int* 42:1160-1168.
- 108) Dennis VW, Brazy PC. (1978). "Sodium, phosphate, glucose, bicarbonate and alanine interactions in the isolated proximal convoluted tubule of the rabbit kidney". *J Clin Invest* 62:387-397.
- 109) Thierry J, Poujeol P, Ripoche P. (1978). "Interactions between Na dependent uptake of D-glucose, P and L-alanine in rat renal brush border membrane vesicles". *Biochem Biophys Acta* 647:203-210.
- 110) Anderson S. (1997). "Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease". *Kidney International* 52(63):S107-S110.
- 111) Pratt JH, Parkinson CA, Weinberger MH, Duckworth WC. (1985). "Decreased in renin and aldosterone secretion in alloxan diabetes: effect of insulin deficiency". *Endocrinology* 116:1712-1716).
- 112) Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald P, Brown A. (1996). "Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth". *J Clin Invest* 97(11): 2534-2540.
- 113) Dolhofer R, Wieland OH. (1979). "Preparation and biological properties of glycosilated insulin". *FEBS Lett* 100:133-136.
- 114) Mokuda O, Sakamoto Y. (1999). "Impaired parathyroid hormone on urinary phosphorus excretion in isolated perfused kidney of streptozotocin-induced diabetic rats". *Horm Metab Res* 31:543-545.

- 115) Corman B, Touvay C, Poujeol P, de Rouffignac C. (1978). "Glucose-mediated inhibition of phosphate reabsorption in rat kidney". *Am J Physiol* 235(5):F430-F439.
- 116) Harter H, Mercado A, Rutherford E, Rodriguez H, Slatopolsky E, Klahr S. (1974). "Effects of phosphate depletion and parathyroid hormone on renal glucose reabsorption". *Am J Physiol* 227(6):1422-1427.
- 117) Trohler U, Bounjour JP, Fleish H. (1976). "Inorganic phosphate homeostasis. Renal adaptation to the dietary intake in intact and thyroparathyroidectomized rats". *J Clin Invest* 57(2):264-273.
- 118) Steele TH, DeLuca HF. (1976). "Influence of dietary phosphorus on renal phosphate reabsorption in the parathyroidectomized rat". *J Clin Invest* 57(4):867-874.
- 119) Pitts RF (1964). "Tubular reabsorption" en *Physiology of the kidney and body fluids*. Cap 6:69-90. Year Book Medical Publisher, Chicago.
- 120) Nizet A, Lefebvre P, Luckx A, Crabbe J. (1976). "Hormones and non specific humoral factors in the interferences between sodium, glucose and phosphate handling by dog kidney". *Curr Probl Clin Biochem* 6:262-271.
- 121) Greenbaum C. (2002). "Insulin resistance in type 1 diabetes". *Diabetes Metab Res Rev* 18:192-200.
- 122) He R, Cui Y, Zhu X. (1997). "Insulin receptors in diabetes mellitus". *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 36(9):607-609.

123) Olefky JM, Revers RR, Prince M, Henry RR, Garvey WT, Scarlett JA, Kolterman OG. (1985). "Insulin resistance in non-insulin dependent (type II) and insulin dependent (type I) diabetes mellitus". *Adv Exp Med Biol* 189:176-205.

124) Barret PQ, Aronson PS. (1982). "Glucosa and alanine inhibition of phosphate transport in renal microvillus membrane vesicles". *Am J Physiol* 242:F126-F131.

125) Knight TF, Senekjian HO, Weinman EJ. (1980). "The influence of D-glucose on phosphate absorption in the rat proximal tubule". *Adv Exp Med Biol* 128:83-88.

126) Stoll R, Kinne R, Murer H, Fleisch H, Bonjour JP. (1979). "Phosphate transport by rat renal brush border membrane vesicles: influence of dietary phosphate, tyroparathyroidectomy, and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>". *Pflugers Arch* 380:47-52.

127) Cuisinier-Gleizes P, Thomasset M, Mathieu H. (1975). "Homeostasis of P and Ca in phosphorus deprivation" en "Phosphate Metabolism Kidney and Bone", International Workshop, Paris. Pág. 381-386. Nouvelle Imprimerie Fournié, Toulouse, France.

128) Dennis VW. (1996). "Phosphate metabolism: contribution of different cellular compartments". *Kid Int* 49:938-942.

129) Raisz L, Dietrich J, Maina D. (1975). "Effects of phosphate on bone formation and resorption in tissue culture" en "Phosphate Metabolism

Kidney and Bone”, International Workshop, Paris. Pág. 213-221. Nouvelle Imprimerie Fournié, Toulouse, France.

130) McNair P. (1988). “Bone mineral metabolism in human type I (insulin dependent) diabetes mellitus”. *Dan Med Bull* 35(2):109-121.

131) Leon M, Larrodera L, Lledo G, Hawkins F. (1989). “Study of bone loss in diabetes mellitus type 1”. *Diabetes Res Clin Pract* 6(3):237-242.

132) Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Federico G, Calisti L, Fusaro C. (1989). “Bone demineralization and impaired mineral metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. A possible role of magnesium deficiency”. *Helv Paediatr Acta* 43(5-6):405-414.

133) Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. (2000). “Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology”. *J Endocrinol Invest* 23(5):295-303.

134) Einhorn TA, Boskey AL, Gunberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. (1988). “The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes”. *J Orthop Res* 6(3):317-323.

135) Goodman WG, Hori MT. (1984). “Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization”. *Diabetes* 33(9):825-831.

136) McNair P, Madsbad S, Christensen MS, Christiansen C, Faber OK, Binder C, transbol I. (1979). “Bone mineral loss in insulin-treated diabetes

mellitus: studies on pathogenesis". Acta Endocrinol (Copenh) 90(3):463-472.

## ABREVIATURAS

**ANG:** angiotensina

**C:** controles

**CF<sub>PO4</sub>:** carga filtrada de fosfato

**CI In:** clearance de inulina

**CI P:** clearance de fosfato

**D:** diabéticas

**EFP:** excreción fraccional de fosfato

**G:** glucosa

**GFR:** velocidad de filtración glomerular

**I:** insulina

**Na:** sodio

**PAH:** para-aminohipurato

**[PO<sub>4</sub>]p:** concentración plasmática de fosfato

**[PO<sub>4</sub>]u:** concentración urinaria de fosfato

**PRA:** actividad de renina plasmática

**PTH:** hormona paratiroidea

**RAS:** sistema renina-angiotensina

**RPF:** flujo plasmático renal

**T<sub>PO4</sub>:** velocidad de reabsorción neta de fosfato

**TGR:** reabsorción tubular de glucosa

**TmPO<sub>4</sub>:** velocidad máxima de reabsorción de fosfato

**TmPO<sub>4</sub>/GFR:** concentración umbral de fosfato

**TPTX:** tiroparatiroidectomía

**TRP:** reabsorción fraccional de fosfato

**VEC:** volumen de líquido extracelular

**Vo':** volumen minuto de orina

## INDICE DE FIGURAS

1.1.	Distribución del fósforo en el humano	4
1.2.	Metabolismo del fosfato en humanos	7
1.3.	Modelo esquemático del transporte de P a través del túbulo proximal	15
1.4.	Estructura química del aloxano	24
3.1.	Cateterización de arteria y vena femorales. Sondaje de vejiga	39
3.2.	Paratiroidectomía	44
	- Relación entre el logaritmo de GFR y glicemia en todos los grupos experimentales	55
	- Relación entre el logaritmo de RPF y glicemia en todos los grupos experimentales	55
4.3.	Relación entre GFR y RPF en todos los grupos experimentales	56
4.4.	Relación entre la GFR y el peso renal para ratas diabéticas	57
	(112) Relación entre el VEC y los valores de glicemia de ratas diabéticas, controles y controles con glucosa	59
	(113) Relación entre cantidad de Na y glucosa reabsorbidos para ratas	

controles y diabéticas	60
4.7. Relación entre la excreción urinaria diaria de Na y glucosa	60
d. Relación entre la EFP y los niveles de insulina plasmática de ratas	
controles y diabéticas tratadas con insulina	66
e. Glucosa reabsorbida vs. fosfato reabsorbido en todos los grupos	
experimentales	67
f. Relación entre el contenido de P en hueso y la glicemia de ratas	
diabéticas	72

## INDICE DE TABLAS

g.	Efecto de la sobrecarga de glucosa sobre los parámetros hemodinámicos renales, insulinemia y glicemia en ratas controles y diabéticas	53
4.2.	Peso corporal y renal de ratas controles y diabéticas	56
4.3.	Datos analíticos del efecto de la diuresis osmótica y pérdidas de Na sobre el volumen del líquido extracelular de ratas controles y diabéticas por aloxano	58
4.4.	Actividad de renina plasmática	61
1.5.	Metabolismo del P y función paratiroidea en ratas controles y ratas diabéticas	62
1.6.	Efecto del estado diabético y de la administración de insulina sobre la ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y balance de fósforo	64
1.7.	Niveles de insulinemia, fosfatemia, glicemia y glucosa urinaria en los cinco grupos experimentales	65
1.8.	Datos analíticos de las regresiones entre las reabsorciones tubulares de glucosa y fosfato mostrados en la figura 4.9.	69
1.9.	Contenido de fósforo en los tejidos blandos seleccionados de ratas controles y diabéticas	70
4.11.	Análisis de matriz y mineral óseos de ratas controles y diabéticas	71

Al Dr. Rodolfo Puche por invitarme a realizar esta tesis en la Cátedra y brindarme siempre su ayuda y su confianza.

A Hilda, Mely, Marieca y Alfredo por haber colaborado de manera generosa, con valiosos aportes, en el desarrollo de esta tesis.

A las “Diosas y Dioses” de Biofísica por la buena onda, afecto y apoyo permanentes.

Y **muy especialmente** a Martha por dirigirme con criterio en el desarrollo de esta tesis y por transmitirme su confianza y tranquilidad para ver las cosas. Por su afecto, calidez e incondicional apoyo.

A Laboratorios Wiener por la donación de diversos reactivos utilizados en el desarrollo de estos experimentos.