

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL PRODUCE AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE iNOS Y ALTERA LA VÍA PARACELULAR DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

María Angélica Rivoira, Lucía Raquel Corball, Valeria Andrea Rodríguez*

Laboratorio "Dr. Fernando Cañas", Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA (CONICET-Universidad Nacional de Córdoba).

Resumen

Previamente hemos demostrado que la diabetes mellitus tipo 1 experimental (D.m.1) inducida por estreptozotocina (STZ) produce estrés oxidativo intestinal en las primeras etapas de la enfermedad, lo que conduce a la inhibición de la absorción intestinal de Ca^{+2} , alterando la vía transcelular del transporte del catión. El objetivo de este trabajo fue estudiar la vía paracelular del transporte del Ca^{+2} y analizar si la D.m.1 induce estrés nitrosativo a nivel duodenal. Se utilizaron ratas Wistar machos a las que se inyectaron 60 mg STZ/kg de peso corporal; se sacrificaron a los 30 días postratamiento. Se determinó la expresión génica y proteica de claudina 2 y 12, proteínas involucradas en el transporte paracelular del Ca^{+2} . En la mucosa duodenal se determinó el contenido de óxido nítrico (NO) y la expresión proteica de óxido nítri-

co sintasa inducible (iNOS). Los resultados revelaron que la expresión génica de claudina 2 en las ratas diabéticas fue más del doble en comparación con la de los controles, mientras que la expresión génica de claudina 12 fue similar en ambos grupos. La expresión proteica de claudina 2 y 12 aumentó en las ratas diabéticas. El contenido de NO fue similar en ambos grupos; sin embargo, la expresión proteica de iNOS fue mayor en las ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles. En conclusión, la D.m.1 experimental se acompaña de estrés oxidativo y de aumento en la expresión proteica de iNOS, alterándose la vía paracelular de absorción de Ca^{+2} como un mecanismo compensatorio.

Palabras clave: diabetes mellitus, vía paracelular, iNOS.

* Pabellón Argentina, 2do. Piso, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina. Correo electrónico: valerod2003@yahoo.com.ar



Abstract

EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS PRODUCES INCREASED iNOS EXPRESSION AND ALTERS THE PARACELLULAR PATHWAY OF INTESTINAL CALCIUM ABSORPTION

We have previously shown that experimental type 1 diabetes mellitus (D.m.1) produced by streptozotocin (STZ) in rats causes intestinal oxidative stress in the early stages of the disease, which leads to the inhibition of intestinal Ca^{2+} absorption, altering the transcellular Ca^{2+} pathway. The aim of this work was to study the paracellular Ca^{2+} pathway and analyze if D.m.1 induces duodenal nitrosative stress. The animals were assigned to two groups: 1) control rats, and 2) STZ-induced diabetic rats (60 mg/kg b.w.). Rats were sacrificed 30 days after induction of diabetes. The gene and protein expression of claudin 2 and 12, proteins involved in paracellular Ca^{2+} pathway, was determined as well as the nitric oxide (NO) content and protein expression of iNOS in rat duodenum mucosa. The results revealed that claudin 2 expression was more than double in diabetic rats compared to control rats at 30 days, while the gene expression of claudin 12 was similar in both groups. The protein expression of claudin 2 and 12 increased in the diabetic rats. NO content was similar in both groups, but the iNOS protein expression was enhanced in diabetic rats. To conclude, the experimental type 1 D.m.1 is accompanied by duodenal oxidative stress, increase iNOS protein expression and alteration of the paracellular Ca^{2+} pathway as a compensatory mechanism.

Key words: diabetes mellitus, paracellular pathway, iNOS.

Introducción

La diabetes mellitus (D.m.) comprende un grupo de patologías metabólicas que cursan

con hiperglucemia crónica derivada de un defecto en la secreción o en la función de la insulina. Se conoce que la D.m. puede agravar la deficiencia ósea en pacientes con osteopenia u osteoporosis e incluso desencadenar osteoporosis secundaria.¹ La D.m. tipo 1 (D.m.1) comienza en la niñez o en la juventud, generalmente por destrucción autoinmunitaria de la célula β pancreática, lo cual ocasiona secreción insuficiente de insulina con hiperglucemia crónica. Tanto los hombres como las mujeres con D.m.1 presentan disminución de la masa ósea en cadera, cuello femoral y columna, que lleva a mayor incidencia de fracturas.²⁻⁴ Los mecanismos por los cuales la D.m. disminuye la masa ósea aún no se han dilucidado completamente. Se ha sugerido que la disminución en la absorción de Ca^{+2} podría desempeñar un rol importante en la desmineralización del paciente diabético.¹

Un mejor conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad ósea en pacientes con D.m. puede tener un notable impacto en su prevención y tratamiento. Para ello es fundamental el conocimiento de la absorción intestinal del Ca^{+2} , ya que la única puerta de entrada del catión al organismo es el intestino. El estudio de la absorción intestinal de Ca^{+2} en un modelo de D.m. tipo 1 experimental es, por esta razón, de sumo interés.

La absorción intestinal de Ca^{+2} depende de muchos factores tales como la biodisponibilidad del catión, y de otros factores nutricionales, la modulación por hormonas calciotrópicas y las condiciones fisiopatológicas del individuo. El 90% del Ca^{+2} se absorbe en el intestino delgado pero la velocidad de absorción es mayor en el duodeno, uno de los sitios en los que la vitamina D ejerce su principal acción favoreciendo la entrada de Ca^{+2} por la vía transcelular. Esta vía comprende 3 etapas: 1) entrada de Ca^{+2} a nivel del borde en cepillo de los enterocitos, mediada a través de los canales de Ca^{+2} , conocidos como TRPV5 y TRPV6 (receptor de potencial transiente de vanilloide 5 y 6), 2) desplazamien-

to del catión desde un polo hacia el otro de la célula, vía unión a calbindina D_{9k} (CB_{9k}) en mamíferos o a calbindina D_{28k} (CB_{28k}) en aves y 3) salida de Ca^{+2} por la membrana basolateral de los enterocitos mediante activación de la Ca^{+2} -ATPasa y del intercambiador Na^{+}/Ca^{+2} . Sin embargo, cuando el contenido de Ca^{+2} en la luz intestinal es elevado y el sistema de transporte activo se satura, una proporción creciente del Ca^{+2} es captada por difusión pasiva (vía paracelular). Esta vía es regulada por el epitelio, especialmente a nivel de las "uniones estrechas" entre los enterocitos. Dichas uniones son dominios especializados de membrana, constituidos por proteínas de la familia de las ocludinas y claudinas (CLDN), que aseguran la permeabilidad selectiva de iones y moléculas a través del epitelio.^{5,6}

Hay evidencias de que la homeostasis del Ca^{+2} se altera en la D.m.⁷ Varios estudios llevados a cabo en pacientes diabéticos mostraron aumento en la excreción urinaria del catión y disminución de los niveles circulantes de $1,25(OH)_2D_3$.^{8,9} A pesar de que los animales diabéticos desarrollan hiperplasia intestinal,¹⁰ presentan disminución de la absorción del catión.¹¹ El balance neto del Ca^{+2} es levemente negativo o normal, debido al incremento de la ingesta del Ca^{+2} ligada a la hiperfagia y a mecanismos compensatorios tales como hiperparatiroidismo secundario y marcada desmineralización ósea.¹² Nyomba y col.¹³ demostraron correlación entre la disminución en la captación duodenal del Ca^{+2} que presentan ratas machos BB (biomodelo espontáneo de ratas diabéticas) y la disminución en la concentración de CB_{9k} y de sus sitios de unión en el duodeno. Los autores hallaron bajos niveles plasmáticos de proteínas que ligan Ca^{+2} y aumento en la fracción libre de $1,25(OH)_2D_3$, lo que indica cierta resistencia a la vitamina D.

Se ha comprobado que la D.m. inducida por estreptozotocina (STZ), antibiótico que produce destrucción selectiva de las células β , desencadena estrés oxidativo en diversos órganos y sistemas,^{14,15} entre ellos el intesti-

no.¹⁶⁻¹⁸ Los estudios de nuestro laboratorio demostraron que el estrés oxidativo puede alterar la expresión de genes y proteínas involucrados en el transporte transcelular y paracelular de Ca^{+2} , disminuyendo la absorción intestinal del catión.^{19,20} Lee y col.²¹ detectaron incremento en los niveles de ARNm de proteínas transportadoras de Ca^{+2} (TRPV5, TRPV6, CB_{28k} y TRPM6 –receptor de potencial transiente de melastatina 6–) en el riñón de ratas diabéticas después de 15 días de la inyección intraperitoneal de STZ. Este incremento en la expresión génica se acompañó de aumento en la expresión proteica de TRPV5 y CB_{28k} renal. La aplicación de insulina logró revertir completamente la hipercalcemia y las alteraciones moleculares concomitantes.

El mantenimiento del estado redox en el intestino es esencial para una óptima absorción intestinal de Ca^{+2} . En este laboratorio se ha demostrado que niveles normales de glutatión (GSH) intracelular son importantes para mantener una absorción intestinal de Ca^{+2} apropiada.^{19,20,22,23} Hemos demostrado también que, en ratas diabéticas tratadas con STZ, el estrés oxidativo intestinal se produce a principios de las etapas de desarrollo de la D.m.1, lo que conduce a la inhibición de la absorción intestinal de Ca^{+2} . Ciertos mecanismos adaptativos dependientes del tiempo provocan un incremento de expresión de las proteínas implicadas tanto en la vía transcelular como paracelular de transporte del catión, normalizándose así la absorción intestinal de Ca^{+2} y el estado redox duodenal. La inyección de insulina restaura el estado redox y la absorción intestinal de Ca^{+2} sin mejorar los niveles séricos de metabolitos de la vitamina D.²⁴

A lo largo del intestino, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es más abundante en células del epitelio intestinal que en otros tipos celulares (macrófagos, células del músculo liso y fibroblastos).²⁵ En el duodeno, iNOS es una enzima clave para la producción de óxido nítrico (NO) y desempeña un papel impor-



tante en la integridad de la mucosa intestinal bajo condiciones fisiológicas.²⁶ En pacientes y ratas diabéticas se encuentra afectada la producción de NO, el cual media la respuesta inmune y los procesos inflamatorios.²⁷ Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la vía paracelular del transporte del Ca^{+2} y analizar si la D.m.1 genera estrés nitrosativo duodenal en ratas diabéticas inducidas con STZ después de 30 días de administración.

Materiales y métodos

Animales

Se emplearon ratas Wistar machos de 2 meses de edad, las cuales fueron alimentadas con una dieta comercial normal (Gepsa ratón-rata, Pilar, Buenos Aires, Argentina). Los animales se criaron durante 8 semanas en un bioterio con luz artificial a 25 °C y con un fotoperíodo de luz-oscuridad de 12 horas, respectivamente. Alcanzados los 2 meses de edad, se dividieron aleatoriamente en dos grupos: 1) controles y 2) tratados con una inyección única intraperitoneal de STZ en una dosis de 60 mg/kg de peso corporal, disuelta en *buffer* citrato 100 mM (pH 4,5). Estos grupos se estudiaron 30 días después del tratamiento. Los controles se inyectaron solo con vehículo. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y el duodeno se extrajo inmediatamente, el cual se lavó con solución fisiológica fría y se utilizó para todas las determinaciones. Los protocolos experimentales siguieron la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Reactivos

Todos los reactivos químicos fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EE.UU.), a menos que se indique lo contrario.

Mediciones séricas

Se determinó la glucosa en suero (glicemia enzimática AA). Se consideraron diabéticas aquellas ratas con glucemias superiores a 250 mg/dl.²⁸ Se midió calcemia (Ca-Color AA), fosfatemia (fosfatemia UV-AA) y creatinina usando los kits comerciales del Wiener Lab (Rosario, Argentina), hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) (Glycohemoglobin Reagent®, Teco Diag., CA, USA) e insulina (Rat insulin®, Millipore, MA, EE.UU.).

Expresión génica a través de PCR en tiempo real

El aislamiento de ARN total de mucosa intestinal se realizó con el reactivo TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La concentración de ARN y la pureza se determinaron por espectrofotometría. La amplificación cuantitativa se realizó en un termociclador (Stratagene termociclador PCR cuantitativa Mx 3000P®, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). La mezcla de amplificación (volumen total: 25 μl) contenía: 0,5 μg de ARN, 0,3 $\mu\text{mol/l}$ de cada cebador, 0,4 μl de colorante de referencia, 1 μl de transcriptasa inversa (RT)/RNasa y 12,5 μl de 2X Brilliant IISYBR QRT-PCR® (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Se utilizó el siguiente protocolo: 1 ciclo a 50 °C durante 30 min; 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 30 s. La cantidad de productos de PCR formados en cada ciclo se evaluó sobre la base de la fluorescencia SYBR Green. Las lecturas de emisiones ciclo a ciclo de fluorescencia fueron controladas y cuantificadas por el método de DDCT.²⁹ La cantidad de números de copias de ARNm de cada gen se normalizó con respecto a la de *gadh*. Las secuencias de los cebadores de los genes estudiados se enumeran a continuación: *claudin 2* FW 5' – GCTGCTGAGGGTAGAAT-

GA – 3' y RV 5' – GCTCGCTTGATAAGTGTCC – 3' (107 pb); *claudin 12* FW 5' – CCTTCA-AGTCTTCGGTGCC – 3' y RV 5' – CAGGAG-GATGGGAGTACAG – 3' (100 pb); *gapdh* FW 5' – AGTCTACTGGCGTCTTCAC – 3' y RV 5' – TCATATTTCTCGTGGTTCAC – 3' (133 pb).

Expresión proteica por Western blot

Se determinaron las expresiones proteicas de CLDN 2, CLDN 12 e iNOS. Los homogeneizados de mucosa duodenal de rata se prepararon con *buffer* de lisis RIPA (SDS 1%, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, PMSF 1mM y NaF 1 mM). La suspensión se centrifugó. Después, las proteínas (100 µg) se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C y se separaron mediante electroforesis en minigeles de SDS-poliacrilamida al 12% (P/V).³⁰ Los geles que contienen las proteínas separadas se sumergieron en el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mmol/l, glicina 192 mmol/l, SDS 0,05% P/V y metanol 20% V/V).³¹ Las membranas de nitrocelulosa (0,45 µm) se bloquearon durante 1,5 h con 2% P/V de leche sin grasa en solución Tris-salina 0,5 mol/l y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico en dilución 1:1000 en cada caso. Los anticuerpos fueron: anti-CLDN 2 anticuerpo monoclonal (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE.UU.), anti-CLDN 12 anticuerpo policlonal (H-49® Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-NOS2 anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.). Después de tres lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado a 37 °C durante 1 hora. A continuación, estas se lavaron tres veces y se añadió la estreptavidina peroxidasa-conjugada (Histostain-SP kit®, Invitrogen CA, EE.UU.). La detección se realizó usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. El anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (clon 71.1 GAPDH-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se utilizó para detectar GAPDH como un marcador para normalizar la expresión relativa de las

otras proteínas. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando un sistema de imágenes Capturer EC3®, software LaunchVisionworks con el fin de obtener la expresión relativa de las proteínas.

Cuantificación de los niveles de NO

Se determinaron como el total de nitrato/nitrito utilizando el reactivo de Griess³² con la modificación del reemplazo de ZnSO₄ para la precipitación de las proteínas del sobrenadante del homogeneizado.³³ La absorbancia se midió a 540 nm. Se realizó una curva estándar con nitrato de sodio (1-10 µM). Los datos se expresaron en µmol NO/mg de proteína.

Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza a una vía (ANOVA) seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples *post hoc*. Se utilizó el software SPSS 22.0 como programa de análisis (SPSS Inc. Chicago, ILL, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Características generales del modelo de D.m. por inducción con STZ

En la Tabla 1 pueden observarse las características de los animales con D.m. 1 experimental después de 30 días de la administración de STZ, en comparación con las de las ratas controles. Como era de esperarse, la glucemia aumentó alrededor de 3 veces en las ratas diabéticas con respecto a la de las ratas controles, mientras que la insulina disminuyó notoriamente en las ratas diabéticas. Los valores de HbA_{1c} fueron un 50% mayor en las ratas diabéticas que en las controles. Las ratas diabéticas presentaron glucosuria. Los niveles de calcemia, fosfatemia y creatinina resultaron similares en ambos grupos.



Tabla 1. Valores en suero de ratas controles y diabéticas de 30 días posinducción.

	Control	D.m.1
Glucemia (mg/dl)	145 ± 13	453 ± 12*
Insulina (ng/ml)	1,73 ± 0,21	0,30 ± 0,11*
HbA_{1c} (%)	8,90 ± 0,50	11,85 ± 0,81 [§]
Creatinina (mg/dl)	0,73 ± 0,20	0,72 ± 0,18
Calcemia (mg/dl)	9,50 ± 0,03	9,45 ± 0,02
Fosfatemia (mg/dl)	5,73 ± 0,20	5,80 ± 0,15

Los datos representan las medias±EE. C: control; D.m.1: ratas con diabetes tipo 1. *p<0,001 vs. controles; [§]p<0,01 vs. controles. Glucemia, creatinina, calcemia, fosfatemia y HbA_{1c}: n=12 para cada grupo experimental; insulina: n=4.

Efecto de la D.m.1 sobre la expresión duodenal de claudina 2 y 12

Se analizaron las expresiones génicas de *cldn 2* y *12*, proteínas presumiblemente implicadas en la vía paracelular de la absorción intestinal de Ca⁺², en ambos grupos experimentales. Los resultados revelaron que la expresión génica de *cldn 2* en las ratas diabéticas fue más del doble en comparación con la de los controles, mientras que la expresión génica de *cldn 12* fue similar en ambos grupos. La expresión proteica de CLDN 2 y CLDN 12, aumentó a los 30 días posinducción (Tabla 2).

Estrés nitrosativo en mucosa duodenal de ratas diabéticas

Con el propósito de estudiar si el estrés nitrosativo estaba involucrado en las alteraciones observadas en la D.m.1, se determinó en mucosa duodenal el contenido de NO y la expresión proteica de óxido iNOS. El contenido de NO fue similar en ambos grupos. Sin embargo, la expresión proteica de iNOS fue mayor en las ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles (Figura 1).

Tabla 2. Expresión génica y proteica de claudina 2 y 12 de ratas controles y diabéticas de 30 días posinducción.

	<i>cldn 2</i>	<i>cldn 12</i>	CLDN 2	CLDN 12
Control	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,10	80,3 ± 4,0	74,0 ± 3,9
D.m.1	2,55 ± 0,43*	0,93 ± 0,08	155,0 ± 4,0*	163,0 ± 8,5*

Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de *cldn 2* y *12* normalizados con respecto al gen *gapdh* (unidades arbitrarias) y expresión proteica por Western blots, presentados como porcentaje de la expresión de GAPDH (unidades arbitrarias). Los datos representan las medias±EE. n=6 para cada grupo experimental. *p < 0,001 vs. control. D.m.1: ratas con diabetes tipo 1.

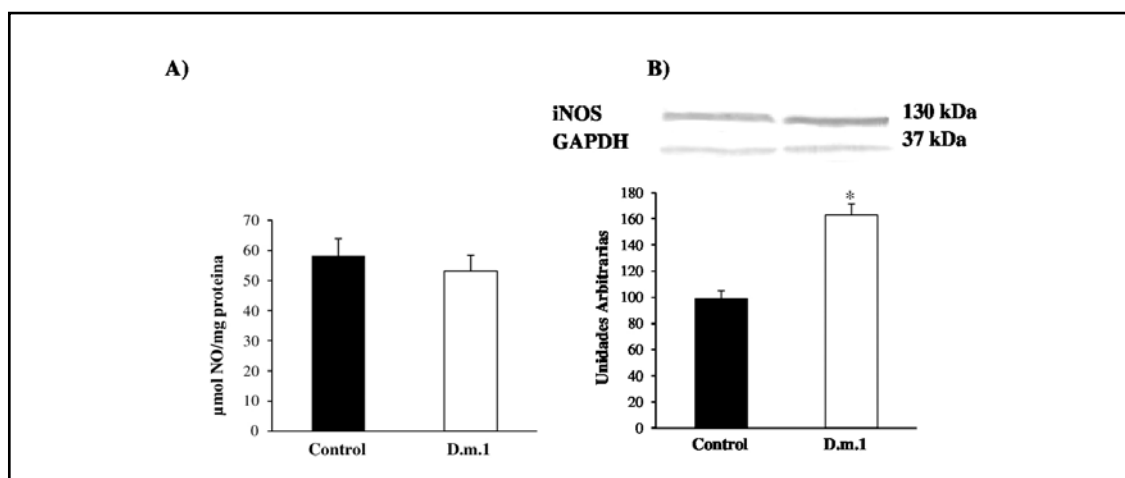


Figura 1. A. Contenido de óxido nítrico (NO) en mucosa duodenal de ratas controles y diabéticas 30 días posinducción. **B.** Análisis densitométrico cuantitativo de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en ratas controles y diabéticas 30 días posinducción. Los datos representan medias \pm EE (n=6). *p<0,001 vs. control.

Discusión

Varios estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la D.m.1 provocada por STZ se acompaña de inhibición de la absorción intestinal de Ca^{+2} debido, al menos en parte, a la generación de estrés oxidativo, como lo revela la disminución del contenido de glutatión intestinal, el aumento de anión superóxido y la mayor actividad de catalasa. Esta inhibición es transitoria, afecta la vía transcelular y desencadena una adaptación fisiológica tendiente a normalizar el proceso de absorción del Ca^{+2} y el estado redox del enterocito.²⁴

El mecanismo molecular de la vía paracelular de la absorción intestinal de Ca^{+2} no está totalmente dilucidado.³⁴ Aparentemente CLDN 2 y 12 participarían en la formación de poros para el paso del catión.³⁵ Nuestros resultados demuestran que las expresiones proteicas de estas proteínas aumentan en las ratas diabéticas en comparación con las de las ratas controles. También la expresión génica de *cldn 2* en las ratas diabéticas aumenta. Dado que hemos demostrado previamente que las proteínas involucradas en la vía transcelular de la absorción intestinal de Ca^{+2}

aumentan su expresión como un mecanismo compensatorio ante la disminución de la absorción del catión²⁴, es probable que el aumento de las proteínas de la vía transcelular no sea suficiente para restaurar la absorción intestinal de Ca^{+2} y, por lo tanto, la vía paracelular es inducida.

La hiperglucemia produce incremento de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS), y es una de las posibles causas de las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes.^{36,37} Los cambios redox inducidos por la hiperglucemia, el daño del ADN, la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos alteran las funciones celulares por medio de la activación de vías clave de traducción de señales.^{38,39} En la diabetes también se produce una acentuada expresión de citoquinas proinflamatorias como consecuencia del aumento de los niveles de ROS/RNS, lo cual se acompaña con incremento de las actividades de Akt, ERK1/2 y un aumento de la acumulación de 8-OHdG en el ADN.³⁸

Kuloglu y col.⁴⁰ demostraron un aumento en la expresión de iNOS en riñón de ratas diabéticas en relación directa con la severidad de la enfermedad. Otros autores encontraron



resultados similares en músculo liso vascular, aunque la posible causa y consecuencia de la inducción de iNOS permanece aún en discusión.⁴¹ Nosotros observamos un incremento en la expresión proteica de iNOS en mucosa duodenal, aunque sin modificaciones en la producción de NO en ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles. La cantidad de NO producido por acción de iNOS depende de muchos factores, entre ellos la disponibilidad de sustrato y de cofactores. La arginina se puede transformar en sustrato limitante en situaciones de enfermedad; además la arginasa puede competir con la iNOS por la arginina⁴²; esto podría ser tal vez una de las causas de falta de cambios en

los niveles de NO observados a los 30 días después de la inducción con STZ.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó, en parte, con fondos del Subsidio AAOMM-Convocatoria 2014 para Investigadores Jóvenes (Directora: Dra. María Angélica Rivoira).

Conflicto de interés

Los autores manifiestan no tener conflicto de interés.

Recibido: julio 2016.

Aceptado: agosto 2016.

Referencias

1. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011; 2:41-8.
2. Soto N, Pruzzo R, Eyzaguirre F, et al. Bone mass and sex steroids in postmenarcheal adolescents and adult women with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2011; 25:19-24.
3. Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. *Int J Endocrinol* 2014; 2014:820615.
4. Loureiro MB, Ururahy MA, Freire-Neto FP, et al. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103:452-7.
5. Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 2008; 77: 22-34.
6. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19:1912-21.
7. Wood RJ, Allen LH, Bronner F. Regulation of calcium metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol* 1984; 247:120-3.
8. Raskin P, Stevenson MR, Barilla DE, Pak CY. The hypercalciuria of diabetes mellitus: its amelioration with insulin. *Clin Endocrinol* 1978; 9:329-35.
9. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM. Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2009; 154:132-4.
10. Zhao J, Nakaguchi T, Gregersen H. Biomechanical and histomorphometric colon remodelling in STZ-induced diabetic rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54:1636-42.

11. Schneider LE, Schedl HP. Diabetes and intestinal calcium absorption in the rat. *Am J Physiol* 1972; 223:1319-23.
12. Schneider LE, Hargis GK, Schedl HP, Williams GA. Parathyroid function in the alloxan diabetic rat. *Endocrinology* 1974; 95:749-52.
13. Nyomba BL, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* 1989; 124:565-72.
14. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107:1058-70.
15. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50:567-75.
16. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:89-97.
17. Shirpoor A, Ansari MH, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4340-4.
18. Rajani Kanth V, Uma Maheswara Reddy P, Raju TN. Attenuation of streptozotocin-induced oxidative stress in hepatic and intestinal tissues of Wistar rat by methanolic-garlic extract. *Acta Diabetol* 2008; 45:243-51.
19. Marchionatti AM, Perez AV, Diaz de Barboza GE, Pereira BM, Tolosa de Talamoni NG. Mitochondrial dysfunction is responsible for the intestinal calcium absorption inhibition induced by menadione. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:101-7.
20. Rodríguez V, Rivoira M, Marchionatti A, Pérez A, Tolosa de Talamoni N. Ursodeoxycholic and deoxycholic acids: A good and a bad bile acid for intestinal calcium absorption. *Arch Biochem Biophys* 2013; 540:19-25.
21. Lee CT, Lien YH, Lai LW, Chen JB, Lin CR, Chen HC. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int* 2006; 69:1786-91.
22. Tolosa de Talamoni N, Marchionatti A, Baudino V, Alisio A. Glutathione plays a role in the chick intestinal calcium absorption. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1996; 115:127-32.
23. Rivoira MA, Marchionatti AM, Centeno VA, Diaz de Barboza GE, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG. Sodium deoxycholate inhibits chick duodenal calcium absorption through oxidative stress and apoptosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2012; 162:397-405.
24. Rivoira M, Rodríguez V, López MP, Tolosa de Talamoni NG. Time dependent changes in the intestinal Ca²⁺ absorption in rats with type I diabetes mellitus are associated with alterations in the intestinal redox state. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:386-94.
25. Feng A, Zhou G, Yuan X, Huang X, Zhang Z, Zhang T. Inhibitory effect of baicalin on iNOS and NO expression in intestinal mucosa of rats with acute endotoxemia. *PLoS One* 2013; 8:e80997.
26. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996; 270:G225-37.
27. Maciel FR, Punaro GR, Rodrigues AM, et al. Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. *Clin Nutr* 2015; doi: 10.1016/j.clnu.2015.07.018.
28. Amaral S, Mota P, Lacerda B, Alves M, Pereira M, Oliveira P, Ramalho-Santos J. Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rat. *Mitochondrion* 2009; 9:41-50.
29. Kenneth JL, Schmittgen TP. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 2001; 25:402-8.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide



- gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad. Sci U. S. A.* 1979; 76:4350-4.
32. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5:62-71.
 33. Arab HH, Salama SA, Eid AH, Omar HA, Arafa SA, Maghrabi IA. Camel's milk ameliorates TNBS induced colitis in rats via down regulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2014; 69:294-302.
 34. Fleet JC, Schoch RD. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010; 47:181-95.
 35. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19:1912-21.
 36. Kumar P, Swain MM, Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 73:82-98.
 37. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009; 45:35-8.
 38. Kumar P, Rao GN, Pal BB, Pal A. Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/Akt and ERK1/2 MAPK mediated signaling pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53:302-19.
 39. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107:1058-70.
 40. Kuloglu T, Aydin S. Immunohistochemical expressions of adropin and inducible nitric oxide synthase in renal tissues of rats with streptozotocin-induced experimental diabetes. *Biotech Histochem* 2014; 89:104-10.
 41. Douglas DT. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief over view of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biology* 2015; 5:225-33.