

~~T.00582~~

BID. T 4162

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**"ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA KINASA C Y DEL
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA
NEUROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL"**

Memoria presentada por

CARLOS HERMENEGILDO CADEVILLA

para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Valencia, julio de 1993

R:50659

UMI Number: U607490

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607490

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO FISILOGIA

Autor CARLOS HERMENEGILDO CAUDEVILLA

Título completo de la tesis

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA KINASA C Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO
EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

Calificación APTO "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD

Fecha de lectura 16 - JULIO - 1993

Tribunal (Nombre y apellidos de los componentes)

PRESIDENTE: SANTIAGO GRISOLIA GARCIA

VOCAL: BERNAT SORIA ESCOBS

VOCAL: SALVADOR LLUCH LOPEZ

VOCAL: JOSE CARLOS FERNANDEZ-CHECA TORRES

SECRETARIO: FEDERICO PALLARDO SAKEDO

Director de la tesis

FRANCISCO JAVIER ROMERO GOMEZ

VICENTE FELIPO ORTS

JOAQUIN ROMA AMBROSIO

Dirección particular y teléf. del autor.

Plaza Música IBARS, 7. Escalera central, 10

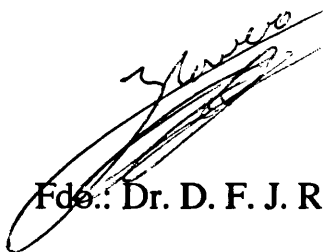
46920 - MISLATA (VALENCIA)

Tel: 3599656

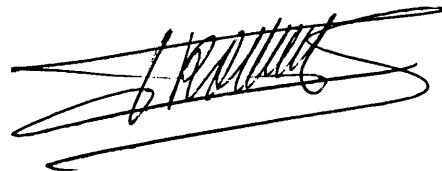
D. Francisco Javier Romero Gómez, Profesor Titular de Fisiología de la Universitat de València, D. Joaquín Romá Ambrosio, Profesor Titular de Fisiología de la Universitat de València y D. Vicente Felipo Orts, Adjunto de Investigación del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Estudios Biomédicos,

CERTIFICAN: Que D. Carlos Hermenegildo Caudevilla ha realizado bajo su dirección el presente trabajo, titulado: **"ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA KINASA C Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL"**, para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Valencia, julio de 1993



Fdo.: Dr. D. F. J. Romero



Fdo.: Dr. D. J. Romá



Fdo.: Dr. D. V. Felipo

Este trabajo ha sido subvencionado por dos Ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (91/0741 y 92/0403) y realizado durante el disfrute de una beca de Formación de Personal Investigador de la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana.

A María José

A mis padres

A mi familia

Quiero expresar mi agradecimiento más sincero:

Al Dr. Francisco Javier Romero Gómez, codirector de esta Tesis y director de mi trayectoria científica desde su comienzo, por su apoyo, ayuda, enseñanza y amistad.

Al Dr. Joaquín Romá Ambrosio, codirector de esta Tesis, por su ayuda científica y humana.

Al Dr. Vicente Felipo Orts, codirector de esta Tesis, por su ayuda, sus enseñanzas y por su acogida en el Instituto.

Al futuro Dr. Ángel Raya Chamorro, por su ayuda y sus críticas en la elaboración de esta Memoria, por su amistad y su apoyo.

Al personal del Departament de Fisiologia que me ha hecho fácil y agradable el trabajo, especialmente a Paco, M^a Carmen, Pascual y Elena, y a todos los que con su ejemplo o sus enseñanzas han contribuido a mi formación.

Al personal del Instituto de Investigaciones Citológicas, por su acogida, ayuda y amistad, especialmente a M^a Dolores, Ruth, Eugenio, Goizane, Hugo, Rosa y Maribel.

A mis compañeros de promoción, por su ayuda en los primeros tiempos, proporcionándonos materiales de origen desconocido, aún a riesgo de su propia reputación.

A mi familia, especialmente a M^a José, por todo.

Y, por supuesto, a los ratones, sin cuya desinteresada colaboración la realización de esta Tesis no hubiera sido posible.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Diabetes: aspectos generales	2
2. Neuropatía diabética.....	4
2.1. Epidemiología	4
2.2. Clasificación clínica	4
2.3. Diagnóstico.....	5
2.4. Tratamiento	5
3. Modelos animales de neuropatía diabética.....	7
3.1. Estreptozotocina	8
3.2. Aloxana	8
4. Fisiopatología de la neuropatía diabética	10
4.1. Alteraciones microvasculares	10
4.2. Alteraciones metabólicas.....	12
4.2.1. Acumulación de sorbitol	12
4.2.2. Disminución de mioinositol	16
4.2.3. Alteraciones del metabolismo de los fosfatidilinositoles	18
4.2.4. Disminución de la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	19
4.2.5. Alteraciones electrofisiológicas	21
4.3. Valoración de la proteína kinasa C en la neuropatía diabética.....	23
4.3.1. Proteína kinasa C.....	23
4.3.2. Inhibidores de la proteína kinasa C	26
4.3.3. Papel de la proteína kinasa C en la fisiopatología de la neuropatía diabética	27
4.4. Estrés oxidativo y neuropatía diabética.....	31
4.4.1. Estrés oxidativo	31
4.4.2. Estrés oxidativo en tejido nervioso periférico	32
4.4.3. Valoración del estrés oxidativo en la neuropatía diabética	34
II. OBJETIVOS	38

III. MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. Materiales	41
1.1. Animales.....	41
1.2. Aparatos	41
1.3. Productos y reactivos químicos	43
1.4. Material habitual de laboratorio	44
1.5. Material informático	45
2. Modelo experimental.....	45
2.1. Inducción de diabetes con estreptozotocina	45
2.2. Inducción de diabetes con aloxana.....	46
3. Obtención de muestras	46
3.1. Sangre	46
3.2. Nervio ciático	46
3.3. Cerebro	47
4. Procedimientos analíticos.....	47
4.1. Determinación de la glucemia	47
4.1.1. Fundamento teórico	47
4.1.2. Soluciones	48
4.1.3. Preparación de las muestras	48
4.1.4. Procedimiento.....	48
4.2. Determinación del contenido en proteínas	49
4.2.1. Fundamento teórico	49
4.2.2. Soluciones	49
4.2.3. Procedimiento.....	50
4.2.4. Método modificado	50
4.3. Determinación de la actividad Na^+/K^+ adenosintrifosfatasa	51
4.3.1. Fundamento teórico	51
4.3.2. Soluciones	51
4.3.3. Preparación de las muestras	52
4.3.4. Procedimiento.....	53
4.4. Determinación de actividad proteína kinasa C	54
4.4.1. Fundamento teórico	54
4.4.2. Soluciones	55
4.4.3. Preparación de las muestras	56
4.4.4. Procedimiento.....	57

4.5. Determinación de la concentración de glutatión	59
4.5.1. Fundamento teórico	59
4.5.2. Soluciones	59
4.5.3. Preparación de las muestras	59
4.5.4. Procedimiento.....	60
4.6. Determinación de la actividad glutatión S-transferasa	61
4.6.1. Fundamento teórico	61
4.6.2. Soluciones	61
4.6.3. Preparación de las muestras	62
4.6.4. Procedimiento.....	62
4.7. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa	63
4.7.1. Fundamento teórico	63
4.7.2. Soluciones	64
4.7.3. Preparación de las muestras	64
4.7.4. Procedimiento.....	64
5. Administración de inhibidores de proteína kinasa C	65
5.1. Administración aguda	65
5.1.1. H7	65
5.1.2. Calfostin C.....	66
5.2. Administración continua	66
5.2.1. H7	66
5.2.2. Calfostin C.....	67
6. Estudios electrofisiológicos.....	68
6.1. Obtención de potenciales de acción musculares	68
6.1.1. Fijación del animal	68
6.1.2. Inserción de los electrodos	70
6.1.3. Técnica electrofisiológica.....	70
6.1.4. Técnica de termostatación	72
6.2. Cálculo de la velocidad de conducción nerviosa motora	74
7. Análisis estadístico	74
7.1. Estadística descriptiva	74
7.2. Test <i>t</i> de Student para contraste de diferencia de medias	75
7.3. Análisis de varianza (ANOVA)	76
7.4. Otros análisis	77

IV. RESULTADOS	79
1. Modelo experimental.....	80
2. Efecto de la diabetes sobre la actividad adenosintrifosfatasa.....	82
3. Efecto de los inhibidores de la proteína kinasa C sobre la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.....	89
3.1. Efecto de la inyección aguda de H7	89
3.2. Efecto de la inyección aguda de calfostin C.....	94
3.3. Efecto de la liberación lenta de inhibidores de la proteína kinasa C.....	102
4. Medida de la actividad proteína kinasa C en nervio ciático de ratones diabéticos y efecto de la administración de sus inhibidores.....	107
5. Efecto de la diabetes sobre la velocidad de conducción nerviosa	109
6. Efecto de la diabetes sobre la defensa antioxidante en el nervio ciático	113
6.1. Efecto sobre la concentración de glutatión.....	115
6.2. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes relacionadas con el glutatión.....	115
6.3. Efecto de la diabetes sobre la actividad glutatión peroxidasa	118
V. DISCUSIÓN	122
1. Modelo experimental.....	123
2. Proteína kinasa C y neuropatía diabética	124
3. Alteraciones electrofisiológicas	128
4. Defensa antioxidante y neuropatía diabética	129
VI. CONCLUSIONES	134
VII. BIBLIOGRAFÍA	138

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de las alteraciones metabólicas propuestas en la fisiopatología de la neuropatía diabética	15
Figura 2: Esquema del sistema glutatión y de algunos aspectos de su metabolismo.....	33
Figura 3: Esquema del montaje experimental utilizado para la obtención de los parámetros electrofisiológicos	69
Figura 4: Esquema de la cola del ratón con detalle de los elementos electrofisiológicos utilizados	71
Figura 5: Potenciales de acción musculares típicos evocados por estimulación supramaximal	73
Figura 6: Efecto de diferentes dosis de estreptozotocina sobre los niveles de glucemia.....	81
Figura 7: Efecto de diferentes dosis de aloxana sobre los niveles de glucemia.....	82
Figura 8: Efecto de la inyección de aloxana sobre el peso de los ratones	84
Figura 9: Evolución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático tras la inyección de aloxana	88
Figura 10: Evolución a lo largo del tiempo del efecto de la inyección de H7 en la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos	92

Figura 11: Efecto de diferentes dosis de H7 en la recuperación de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en nervio ciático de ratones diabéticos	93
Figura 12: Efecto de diferentes dosis de calfostin C en la recuperación de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en nervio ciático de ratones diabéticos	99
Figura 13: Evolución del efecto de dos dosis de calfostin C sobre la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos	101
Figura 14: Efecto de la liberación lenta y continua de H7 durante diferentes periodos de tiempo sobre su capacidad para recuperar la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos	103
Figura 15: Efecto del calentamiento de H7 durante diferentes periodos de tiempo sobre su capacidad para recuperar la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos	105
Figura 16: Efecto de la liberación continua de calfostin C sobre la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos	106
Figura 17: Medida de la actividad PKC del nervio ciático de ratones control y diabéticos.....	108
Figura 18: Efecto de la inyección intraperitoneal de H7 y calfostin C sobre la actividad PKC en nervio ciático de ratón	110
Figura 19: Efecto de la diabetes sobre la velocidad de conducción nerviosa motora máxima	112

Figura 20: Efecto de la diabetes sobre la concentración de glutatión en nervio ciático de ratón	116
Figura 21: Evolución a lo largo de tres semanas de la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de ratones diabéticos y de la glucemia.....	119
Figura 22: Correlación entre la glucemia y la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de ratón	120

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Comparación del efecto de la diabetes inducida por aloxana sobre la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa en nervio ciático y en cerebro de ratón	86
Tabla 2: Efecto de la diabetes inducida por aloxana sobre la actividad adenosintrifosfatasa del nervio ciático de ratón.....	87
Tabla 3: Efecto de la inyección de H7 en la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones control y diabéticos.....	90
Tabla 4: Comparación del efecto de la inyección de H7 y HA1004 en la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón	95
Tabla 5: Efecto de la inyección de calfostin C sobre la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón	97
Tabla 6: Comparación del efecto de la inyección de H7 y calfostin C sobre la actividad Na ⁺ /K ⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón.	98
Tabla 7: Determinación de la velocidad de conducción nerviosa en ratones control, diabéticos y diabéticos tratados con calfostin C de forma continua.....	114
Tabla 8: Actividad glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa en citosol de nervio ciático de ratones control y diabéticos de una semana de evolución.	117

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina.
AMP	Monofosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
ATPasa	Adenosintrifosfatasa.
BSA	Seroalbúmina bovina.
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter) N,N,N',N' tetraacético.
GMP	Monofosfato de guanosina.
GSH	Glutación reducido.
GSHPx	Glutación peroxidasa.
GSSG	Glutación disulfuro.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
H7	1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina.
HA1004	N-(2-guanidinoetil)-5-isoquinolinil sulfonamida.
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina y nicotinamida.
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido.
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida.
NADPH	Fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido.
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Adenosintrifosfatasa activada por Na ⁺ y K ⁺ .
Pi	Fosfato inorgánico.
PKC	Proteína kinasa C.
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro.
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -Butil hidroperóxido.
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
Triton X-100	<i>t</i> -Octilfenoxipolietoxietanol.
VCN	Velocidad de conducción nerviosa.
VCNMM	Velocidad de conducción nerviosa motora máxima.

I. INTRODUCCIÓN

1. Diabetes: Aspectos generales.

La diabetes es la enfermedad endocrina más frecuente. La verdadera prevalencia es difícil de establecer, pero se calcula que se sitúa entre el 1 y el 2% de la población total (Foster, 1991). La incidencia anual se cifra sobre los 270 casos por cada 100.000 habitantes (Sanmartí *et al.*, 1991).

La característica fundamental de esta enfermedad reside en una alteración del metabolismo en su conjunto, no sólo del metabolismo de los glúcidos: también existe una importante alteración del metabolismo de lípidos y de las proteínas. Estas alteraciones metabólicas son fruto de una insuficiente actividad de insulina, secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, que puede ser debida a multitud de factores etiológicos, entre los que se ha señalado la presencia de factores genéticos, inmunológicos, medioambientales, etc. (Skyler, 1989).

El diagnóstico de la enfermedad suele establecerse por un aumento de la glucemia (concentración de glucosa en sangre). La glucemia normal después de un ayuno de 10-12 horas, por la mañana, debe situarse entre 80 y 120 mg de glucosa por 100 ml de sangre (4.4-6.7 mM). Se considera a un individuo diabético cuando sobrepasa los 140 mg de glucosa por 100 ml de sangre (7.8 mM), en estas condiciones.

Existen dos formas fundamentales de diabetes:

a) Diabetes mellitus insulín-dependiente (DMID) o tipo I, caracterizada por aparecer en personas jóvenes y que característicamente van a necesitar insulina para el control de su enfermedad. Representan aproximadamente el 25% de los pacientes con diabetes.

b) Diabetes mellitus no insulín-dependiente (DMNID) o tipo II, que aparece en personas mayores de 40 años y que pueden lograr un buen control de su enfermedad con una dieta adecuada. Constituyen el 75% de los pacientes diabéticos.

La diabetes presenta una serie de complicaciones a corto y largo plazo. Entre las complicaciones agudas de la diabetes cabe destacar la cetoacidosis (fundamentalmente en la diabetes mellitus insulín-dependiente, debida al déficit de insulina), el coma hiperosmolar (que aparece fundamentalmente en la diabetes mellitus no insulín-dependiente, en pacientes ancianos, y sin cetoacidosis previa) y la hipoglucemia (en la diabetes mellitus insulín-dependiente, como consecuencia de una dosis excesiva de insulina, ingesta insuficiente o estrés desencadenante) (Sanmartí *et al.*, 1991).

Las complicaciones a largo plazo de la diabetes o complicaciones crónicas son, fundamentalmente:

a) alteraciones de la circulación sanguínea, divididas clásicamente en micro y macrovasculares, que afectan fundamentalmente a pacientes con diabetes mellitus no insulín-dependiente ya en el momento del diagnóstico y con el tiempo al resto de personas diabéticas. Condicionan una elevada morbilidad y mortalidad dentro de este tipo de enfermos.

b) retinopatía diabética, dividida en lesiones simples y proliferativas, que representa la mayor causa de ceguera en los Estados Unidos y se calcula que la padecen con el tiempo alrededor del 85% de las personas diabéticas.

c) nefropatía diabética, una de las causas más frecuentes de muerte en pacientes diabéticos, que representan alrededor de la mitad de los pacientes con problemas renales en fase terminal en los Estados Unidos.

d) neuropatía diabética, que afecta al sistema nervioso periférico. Es la mayor causa de morbilidad en los pacientes diabéticos y una de las principales causas de mortalidad debido a la afectación del sistema nervioso autónomo.

En cuanto al tratamiento de la diabetes, existen en la actualidad numerosas posibilidades terapéuticas, tanto para el tratamiento de la diabetes propiamente dicha como para el de sus numerosas complicaciones. Los pacientes afectados de diabetes tipo I requieren la inyección de insulina para su tratamiento. Los afectados de diabetes tipo II pueden requerir insulina para el control de su enfermedad, pero suele ser suficiente el tratamiento con antidiabéticos orales y el seguimiento de una dieta adecuada. En ambos tipos de

diabetes, el ejercicio físico constituye un pilar básico del tratamiento. La presencia de complicaciones requerirá la actuación tanto sobre la propia diabetes como sobre la multitud de sistemas afectados (Foster, 1991).

2. Neuropatía diabética.

2.1. Epidemiología.

La neuropatía diabética es la neuropatía periférica más frecuente en el mundo occidental. Los estudios sobre la incidencia o la prevalencia de la neuropatía diabética son escasos, y sus resultados difieren mucho de unos a otros, debido fundamentalmente a la utilización de criterios diagnósticos distintos y al estudio de poblaciones diferentes entre sí. Se ha estimado que el 8% de los individuos diabéticos presentan neuropatía clínica en el momento del diagnóstico y más de un 50% después de 20 años de evolución (Pirart, 1978). La utilización de técnicas de diagnóstico electrofisiológico y morfológico elevan la frecuencia de aparición al 80% de los pacientes diabéticos.

2.2. Clasificación clínica.

La neuropatía diabética puede afectar a cualquier parte del sistema nervioso, con la excepción del cerebro. La clasificación más aceptada es aquella que separa las neuropatías diabéticas en dos grandes grupos: neuropatías focales y difusas. Las neuropatías difusas, entre las que destacan las polineuropatías sensoriales y motoras y las polineuropatías autonómicas, son frecuentes, generalmente crónicas y casi siempre progresivas. Las neuropatías focales, fundamentalmente mononeuropatías, son raras, agudas y normalmente autolimitadas (Greene *et al.*, 1990b).

La afectación sensorial y/o motora en diferentes localizaciones del organismo, así como la posibilidad de que los síntomas sean tan distintos como la aparición de dolor lacerante o la anestesia completa de una extremidad, hacen que el cuadro clínico pueda ser muy diverso y poco específico, pudiendo a su

vez dar lugar a complicaciones secundarias derivadas de la alteración sensoriomotora, tales como el pie diabético y la artropatía de Charcot.

Además, la afectación del sistema nervioso autónomo, cuya incidencia oscila entre un 20% y un 40% en los pacientes diabéticos, hace que estos pacientes presenten alteraciones gastrointestinales (dismotilidad esofágica, aclorhidria, diarrea, incontinencia anal, etc.), alteraciones genitourinarias (disfunción vesical, eyaculación retrógrada, impotencia, etc.), alteraciones cardiovasculares (taquicardias en reposo, anormal respuesta al ejercicio físico, hipotensión postural, etc.) y otras alteraciones (cambios pupilares, alteraciones de la sudoración, alteraciones de la motilidad respiratoria, alteraciones neuroendocrinas, etc.) (Espí, 1989). Todas estas alteraciones derivadas de la afectación del sistema nervioso autónomo van a complicar el cuadro clínico y el pronóstico de los enfermos, así como su calidad de vida.

2.3. Diagnóstico.

El diagnóstico de la neuropatía diabética es fundamentalmente clínico, y tiene valor no sólo diagnóstico sino también pronóstico. La neuropatía diabética debe ser sospechada en un paciente con diabetes tipo I con más de 5 años de evolución y en cualquier paciente con diabetes tipo II. La exploración clínica deberá incluir tanto el estudio de la motilidad como el de la función sensorial, y por supuesto un examen detallado de todos los órganos y sistemas, buscando la posible alteración del sistema nervioso autónomo. Los estudios electrofisiológicos y de sensibilidad térmica y vibratoria, así como los estudios de laboratorio, contribuirán a establecer el diagnóstico y grado en el que se encuentra la enfermedad (Espí, 1989).

2.4. Tratamiento.

El tratamiento de la neuropatía diabética es insatisfactorio en muchos aspectos, y es fundamentalmente sintomático, paliativo, de mantenimiento y preventivo (Greene *et al.*, 1990b), tanto de las manifestaciones sensoriomotoras

(analgésicos, tratamientos ortopédicos, cirugía, etc.) como de las vegetativas (en las que el tratamiento es muy diverso y específico para cada tipo de situación). Todavía en fase experimental, y como veremos con más detalle en el siguiente apartado, se encuentra el primer tratamiento etiológico de la neuropatía diabética, basado en la administración de inhibidores de la aldosa reductasa, aunque los primeros ensayos no parecen mejorar de forma significativa ni las anomalías electrofisiológicas ni los síntomas (Espí, 1989).

Sin embargo, la cuestión fundamental en el tratamiento de la neuropatía diabética, y de las complicaciones crónicas de la diabetes en general, es saber si un buen control de la hiperglucemia y de las alteraciones metabólicas que lleva asociadas es suficiente para evitarlas o mejorarlas. A pesar de que la creencia más extendida es que el tratamiento convencional de la diabetes no previene las complicaciones crónicas, hay una serie de evidencias que sugieren que el desarrollo y la severidad de las mismas están relacionadas con el control de la glucemia (Committee on Health Care Issues, 1986). Entre ellas destacan:

a) Los pacientes diabéticos con mal control de glucemia tienden a desarrollar complicaciones a una edad más temprana y de forma más severa que los pacientes bien controlados.

b) En los pacientes recién diagnosticados, la reducción de los valores de glucemia tras el tratamiento con insulina se acompaña de la mejoría de algunos parámetros alterados por la diabetes (aumenta la velocidad de conducción nerviosa motora, aumenta la sensibilidad vibratoria en el pie, etc...).

c) En los pacientes con diabetes tipo II que no reciben insulina, los valores de glucemia y de hemoglobina glicosilada son inversamente proporcionales a los de velocidad de conducción nerviosa motora.

d) En ensayos clínicos controlados, el control de la glucemia durante más de cuatro meses logra mejorar la velocidad de conducción nerviosa y la sensibilidad frente a estímulos vibratorios.

Pero también otros factores, probablemente genéticos, influyen en el desarrollo de complicaciones, ya que pacientes con décadas de diabetes mal controlada no desarrollan neuropatía diabética ni otras complicaciones crónicas,

y por el contrario, hay pacientes que presentan típicas complicaciones diabéticas en el momento del diagnóstico o incluso en ausencia de hiperglucemia (Foster, 1991).

3. Modelos animales de neuropatía diabética.

El estudio de la diabetes, y por consiguiente de la neuropatía diabética, requiere un modelo animal adecuado, ya que el estudio en humanos está limitado, además de por las obvias consideraciones éticas, porque es una enfermedad crónica y por tanto los estudios se prolongarían durante años, a lo largo de los cuales cada persona sufre una serie de acontecimientos difícilmente controlables y que condicionan en gran medida la comparación de los resultados obtenidos. Por todo ello, el estudio con animales se presenta como la mejor posibilidad para el estudio de la diabetes y sus complicaciones, a pesar de que la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos con animales no siempre es acertada y requiere una cuidadosa interpretación.

La existencia de diabetes espontánea en animales fue puesta de manifiesto a mediados del siglo pasado y, desde entonces, se ha descrito en numerosas especies: gatos, perros, delfines, hipopótamos, antílopes y muchos animales de granja. Sin embargo, sólo está bien caracterizada en algunas especies, fundamentalmente en ratones, perros y gatos (Mordes y Rossini, 1981).

Para el estudio de la diabetes existen diferentes modelos animales, que se pueden dividir según éstos sean espontáneamente diabéticos o con diabetes inducida experimentalmente. Entre los animales que son espontáneamente diabéticos destacan los roedores, especialmente ratas y ratones. La rata BB, mutación espontánea de la rata Wistar, es el modelo animal de diabetes más parecido a la diabetes humana, con unas características metabólicas y anatomopatológicas muy similares. El ratón db/db presenta también características muy similares a las de la diabetes en humanos, aunque estos ratones presentan una obesidad muy manifiesta y además la hiperglucemia no es

reversible, reflejando posiblemente una alteración concomitante del glucagón (Mordes y Rossini, 1981). Ambos son los modelos animales de diabetes espontánea más utilizados en la actualidad.

Entre los modelos de diabetes inducida experimentalmente destacan la administración de hormonas con efectos contrarios a los de la insulina (adrenalina, glucagón, glucocorticoides, hormona del crecimiento), la diabetes inducida por virus (coxackie B, virus de la rubeola, reovirus y otros RNA virus) y la diabetes inducida por tóxicos, fundamentalmente estreptozotocina y aloxana (Mordes y Rossini, 1981). Estos dos últimos, los más utilizados sin duda, se describen con mayor detalle.

3.1. Estreptozotocina.

Estreptozotocina es el nombre común de 2-deoxy-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopiranososa. Es una sustancia tóxica relativamente selectiva para las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, encargadas de la producción de insulina. Se ha utilizado además como antibiótico y como citostático antineoplásico, ya que tiene una estructura muy semejante a la de las mostazas nitrogenadas. Se han propuesto dos teorías complementarias para explicar su mecanismo de acción. Por un lado, derivados de su molécula (radical metilo) son capaces de interferir con el DNA. Además, produce depleción de NAD^+ y NADP^+ , necesarios para que la enzima poli(ADP-ribosa) sintetasa repare el DNA dañado (LeDoux *et al.*, 1988). Por otro lado, se sabe que produce una disminución de los niveles intracelulares de glutatión, acompañada de un incremento en la producción de H_2O_2 y otros radicales libres (Oberley, 1988).

3.2. Aloxana.

La aloxana (2,4,5,6-tetraoxihexahidropirimidina) es una molécula inestable y muy reactiva, que rápidamente se transforma en ácido dialúrico, forma tóxica del compuesto. Como la estreptozotocina, es bastante selectiva de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y produce poca o nula

toxicidad en otros tejidos. La transformación de aloxana en ácido dialúrico consume oxígeno y produce H_2O_2 , probablemente debido a la estructura quinónica del compuesto. La autooxidación del ácido dialúrico produce H_2O_2 , O_2 , O_2^{\cdot} y $\cdot OH$. La producción de radicales libres de oxígeno tras la administración de aloxana ha sido puesta de manifiesto tanto *in vivo* como *in vitro*. Parece que la elevada selectividad por las células β , sin haber sido totalmente demostrado, se debe a que son capaces de captar grandes cantidades de aloxana, formar rápidamente radicales libres de oxígeno y a que tienen una pobre defensa antioxidante (Oberley, 1988).

En la actualidad, para el estudio de la neuropatía diabética los modelos más utilizados son las líneas de animales espontáneamente diabéticos (rata BB y ratón db/db, especialmente) y la inducción de diabetes con aloxana o con estreptozotocina en ratones, ratas y conejos.

Para la realización de los experimentos detallados en este trabajo se decidió utilizar ratones debido a que su menor tamaño facilitaba su manejo y el poder disponer de mayor número de muestras sin problemas de estabulación y suponía un ahorro económico debido a la carestía de los productos que les iban a ser administrados.

Por otro lado, los ratones diabéticos db/db no son un buen modelo puesto que se ha descrito que la aparición de la alteración metabólica generalmente admitida como índice de neuropatía diabética, la disminución de la actividad Na^+ , K^+ ATPasa del nervio ciático, no ocurre en estos ratones (Bianchi *et al.*, 1987). Posteriormente, estos mismos autores han descrito una disminución de esta actividad enzimática a los 280 días del nacimiento, pero la atribuyen a la elevada edad de los ratones, ya que también la observan en el grupo control (Bianchi *et al.*, 1990).

Por todo lo anterior, se decidió utilizar ratones en los cuales la diabetes fuera inducida por la administración de estreptozotocina o aloxana.

4. Fisiopatología de la neuropatía diabética.

Aunque son numerosos los estudios que se han realizado sobre el tema, la patogénesis de la neuropatía diabética continúa siendo desconocida. El conjunto de alteraciones que se producen desde la disminución de los niveles de insulina y/o la aparición de hiperglucemia, hasta la disminución de la velocidad de conducción nerviosa y de la amplitud del potencial de acción o las alteraciones anatomopatológicas observadas (degeneración axonal, desmielinización segmentaria, remielinización, anomalías microvasculares), han comenzado a ser descubiertas en los últimos 15 ó 20 años.

Los estudios realizados sobre este tema se agrupan en dos grandes teorías, complementarias entre sí, que tratan de explicar la aparición de lesiones nerviosas en los pacientes diabéticos, una de las cuales otorga un papel fundamental a las alteraciones microvasculares y otra que presta mayor importancia a las alteraciones metabólicas derivadas del exceso de glucosa circulante en sangre (Greene *et al.*, 1990a). Estas dos teorías tratan de explicar tanto las lesiones nerviosas como las otras dos grandes lesiones crónicas de la diabetes, la nefropatía y las lesiones oculares (Winegrad, 1987). Realizaremos una mayor y más detallada exposición de la segunda, dado que es la hipótesis sobre la que se ha realizado este trabajo.

4.1. Alteraciones microvasculares.

El sistema vascular de los nervios periféricos incluye un sistema intrínseco, formado por capilares dispuestos longitudinalmente entre los fascículos de axones rodeados de endoneuro, y un sistema extrínseco, formado por las arterias, arteriolas y vénulas nutricias y por los vasos epineurales. Los nervios periféricos, debido a la existencia de estos dos sistemas vasculares, con numerosas anastomosis entre ellos, y a sus escasos requerimientos metabólicos, se hallan bien defendidos ante posibles lesiones isquémicas (Greene *et al.*, 1992).

Fagerberg, en 1959, fue el primero en proponer una teoría para explicar la patogénesis de la neuropatía diabética basada en las alteraciones vasculares de las paredes de los vasos endoneurales observadas en autopsias.

Entre las alteraciones microvasculares del endoneuro encontradas hasta el momento destacan el adelgazamiento y la duplicación de la membrana basal, la proliferación de las células endoteliales, la formación de trombos plaquetarios, etc. (Dyck *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1987b). Sin embargo, en estudios realizados agrupando a los pacientes según su edad, no se encuentran diferencias entre las alteraciones observadas en las células endoteliales de los grupos control y diabético, pero sí en las alteraciones de la membrana basal (Sima *et al.*, 1991).

También se ha descrito la presencia de alteraciones reológicas en los nervios periféricos. Entre las encontradas en los pacientes diabéticos destacan el incremento de la viscosidad de la sangre (Paisley *et al.*, 1980), agravada por la hipertensión que con frecuencia padecen los pacientes diabéticos (Rampling *et al.*, 1989), y el descenso de la plasticidad de los eritrocitos (Oughton y Barnes, 1981).

La demostración de la disminución del flujo sanguíneo (Low, 1987), incremento de la resistencia vascular y disminución de la presión de oxígeno en los nervios de ratas crónicamente diabéticas (Tuck *et al.*, 1984), junto con los hallazgos anatomopatológicos y reológicos referidos, ha llevado a la formulación de una teoría según la cual la hipoxia generalizada del nervio sería uno de los mecanismos patogénicos de la neuropatía diabética (Low *et al.*, 1989).

La hipoxia provocada por los mecanismos citados puede desencadenar la producción de radical superóxido a través de la reacción xantina-xantina oxidasa (McCord, 1985). La formación de este radical superóxido puede generar otros radicales libres de oxígeno. Como veremos en el apartado 4.4. de esta Introducción, el incremento de estos factores prooxidantes, unido o no a la

disminución de factores antioxidantes, puede desencadenar estrés oxidativo en el nervio ciático de pacientes o animales diabéticos y ser un factor importante en la patogénesis de la neuropatía diabética.

La formación de radical superóxido, por otra parte, puede provocar la aparición de productos de la peroxidación de lípidos, capaces de estimular la actividad ciclooxigenasa y reducir la actividad prostaciclina sintetasa (Moncada, 1980). Como consecuencia de ambas acciones, al incrementarse la relación tromboxano/prostaciclina, se produciría la consiguiente vasoconstricción y agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1979), que agravarían la hipoxia del tejido nervioso diabético.

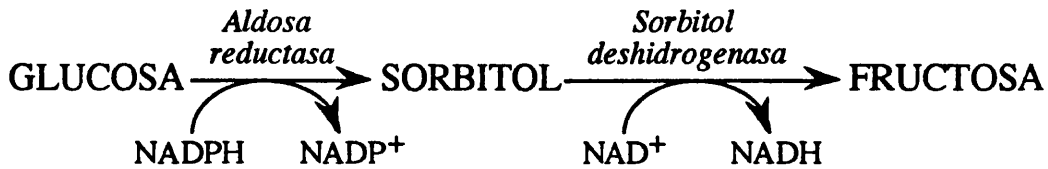
4.2. Alteraciones metabólicas.

Son numerosas las alteraciones metabólicas propuestas para explicar la aparición de diferentes alteraciones bioquímicas en el tejido nervioso periférico de pacientes diabéticos. La mayor parte de los autores las relacionan con la hiperglucemia y no con la falta de insulina, ya que las células del tejido nervioso periférico, que como ocurre con las del tejido nervioso central, obtienen de la glucosa la mayor parte de la energía necesaria para su metabolismo, no requieren insulina para regular el metabolismo de la glucosa en los axones periféricos ni en las células de Schwann (Greene y Winegrad, 1979). Recientemente se ha demostrado que sólo un tipo de transportador de glucosa, el GLUT1, se halla presente en nervio periférico de rata y, en estudios realizados *in vitro*, que está regulado por los niveles de glucosa (Muona *et al.*, 1992). Por otro lado, la capacidad del nervio periférico para utilizar la glucosa como substrato energético no se ve disminuida por la diabetes experimental aguda (Greene y Winegrad, 1981).

4.2.1. Acumulación de sorbitol.

La vía del polirol o del sorbitol es una vía alternativa en el metabolismo de la glucosa, fisiológica en los mamíferos, que consiste en dos reacciones

enzimáticas que reducen la glucosa a sorbitol por la aldosa reductasa y éste es oxidado posteriormente por la sorbitol deshidrogenasa a fructosa.



La primera reacción es altamente dependiente de la concentración de substrato, por lo que la actividad de la aldosa reductasa está regulada fundamentalmente por los niveles intracelulares de glucosa, elevados en las situaciones de hiperglucemia. Por otro lado, el sorbitol difunde mal a través de las membranas celulares, por lo que tiende a acumularse en el interior de las células cuando su síntesis está incrementada (Gabbay, 1973).

La existencia de esta vía metabólica en el nervio periférico y la acumulación en el mismo de sorbitol fue puesta de manifiesto por primera vez en 1966 por Gabbay *et al.* La acumulación de sorbitol en nervio ciático ha sido demostrada tanto en animales de experimentación (Finegold *et al.*, 1983) como en humanos, con buena correlación entre los niveles de sorbitol en nervio y los distintos índices de patología (Dyck *et al.*, 1988).

La acumulación de sorbitol incrementa la presión osmótica en el interior celular y consiguientemente se produce la edematización del tejido. Este fenómeno, estudiado inicialmente en el cristalino de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, provocaba la aparición de cataratas (Gabbay, 1973), y se pensó que en el nervio ciático podría ocurrir un fenómeno similar, de modo que la edematización hiperosmolar del nervio fuera la responsable de las alteraciones morfológicas y funcionales observadas en la neuropatía diabética. La extrapolación de los datos de cristalino a nervio está cuestionada en la actualidad (Greene *et al.*, 1985b), entre otras razones debido a que, mientras que en cristalino el sorbitol está presente en concentraciones milimolares, la concentración que alcanza en nervio es de orden micromolar, lo cual provoca un

incremento poco significativo de la osmolaridad (Greene, 1983).

Descartada la hipótesis hiperosmolar del sorbitol, son dos las hipótesis fundamentales, interrelacionadas entre sí, que tratan de explicar la relación existente entre el acúmulo de sorbitol en el nervio periférico y la aparición de las lesiones propias de la neuropatía diabética:

1) Disminución del contenido de mioinositol en el nervio periférico y alteración del metabolismo de los fosfatidilinositoles (Greene *et al.*, 1987b).

2) Modificación del estado redox celular como consecuencia de la disminución de NADPH, y posible aparición de daño por estrés oxidativo.

Cada una de estas consecuencias del acúmulo de sorbitol será expuesta de forma detallada en los correspondientes apartados de esta Introducción, y se encuentran resumidas en la figura 1.

Cabe resaltar, por último, que gran parte de las investigaciones llevadas a cabo para estudiar la acumulación de sorbitol y sus consecuencias, tanto en nervio periférico como en otros órganos, se han realizado utilizando inhibidores de la aldosa reductasa. Los resultados obtenidos con la administración de estos inhibidores son contradictorios. Dichos inhibidores han demostrado prevenir, en su administración de forma aguda, el acúmulo de sorbitol, la disminución del contenido de mioinositol y de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio periférico de ratas diabéticas (Greene y Lattimer, 1984a) e incrementar su velocidad de conducción nerviosa (Stribling *et al.*, 1985). Así mismo, la administración a largo plazo (28 semanas) de los inhibidores de la aldosa reductasa a ratas diabéticas producen efectos similares (Yagihashi *et al.*, 1990). La administración de inhibidores de la aldosa reductasa a personas diabéticas normaliza los niveles de sorbitol en nervio sural (Pitts *et al.*, 1986) pero no los de mioinositol (Dyck *et al.*, 1988).

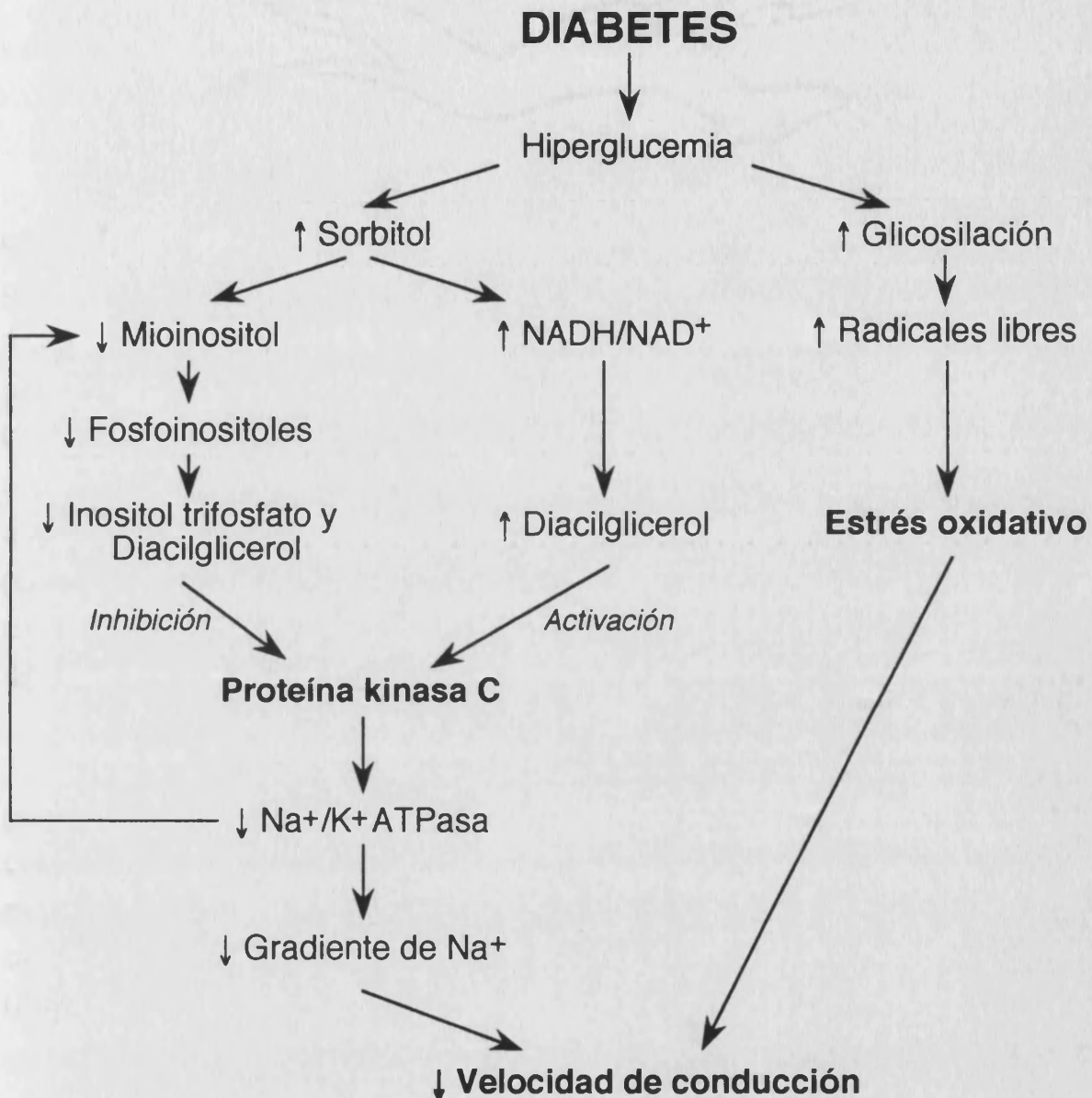


Figura 1: Esquema de las alteraciones metabólicas propuestas en la fisiopatología de la neuropatía diabética. Elaborado a partir de los esquemas propuestos por Greene *et al.* (1988) y Larkins y Dunlop (1992). Se señalan en **negrita** las alteraciones objeto de controversia, estudiadas en el presente trabajo.

4.2.2. Disminución de mioinositol.

El mioinositol es un constituyente normal de la dieta. Puede encontrarse en plasma y tejidos y formando parte de una clase de fosfolípidos, los fosfatidilinositoles. Se absorbe por los enterocitos por un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de Na^+ . Las concentraciones plasmáticas de mioinositol son bajas (de orden micromolar), siendo el riñón el principal órgano encargado de su regulación, ya que por una parte es capaz de reabsorber el mioinositol filtrado gracias a un sistema de transporte tubular de alta afinidad dependiente de Na^+ , y por otra es el único órgano que posee la enzima necesaria para hidrolizar el anillo de su estructura, imprescindible para su catabolismo (Greene *et al.*, 1990a). El contenido tisular de mioinositol es generalmente superior al del plasma (1-10 mM), y aunque se ha demostrado la existencia de transporte activo dependiente de Na^+ en muchos tejidos, entre ellos en el nervio (Greene y Lattimer, 1982), parece que su contribución al mantenimiento de los elevados niveles tisulares es poco importante, procediendo fundamentalmente de la síntesis del mismo en cada tejido (Winegrad, 1987).

La disminución de la concentración de mioinositol en nervio ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios, realizados tanto *in vitro*, con células de neuroblastoma (Yorek *et al.*, 1989), como *in vivo* en animales de experimentación (Greene *et al.*, 1982; 1987a). También ha sido relacionada con otras complicaciones crónicas de la diabetes, como la retinopatía diabética (MacGregor *et al.*, 1986) o la nefropatía diabética (Goldfarb *et al.*, 1991).

El mecanismo por el cual la diabetes ocasiona una disminución de la concentración de mioinositol en tejido nervioso sigue siendo controvertido en la actualidad. Por un lado se plantea que la glucosa, al inhibir de forma competitiva la entrada de mioinositol dependiente de Na^+ en los tejidos, sería la responsable de esta alteración. Por otro lado, los estudios realizados con inhibidores de la aldosa reductasa demuestran que la activación de la vía del sorbitol es responsable, al menos en parte, de la disminución del mioinositol en nervio (Greene *et al.*, 1985a). Finalmente, la disminución de la actividad

Na^+/K^+ ATPasa en nervio condiciona un incremento de la concentración intracelular de Na^+ que disminuiría la entrada de mioinositol en las células, al comprometer su transporte activo (Greene *et al.*, 1988).

La disminución del contenido de mioinositol en nervio periférico se produce de forma paralela con la disminución de la velocidad de conducción nerviosa. Ésta puede ser normalizada con el incremento del mioinositol en plasma, gracias a una dieta rica en este metabolito, sin alterar la glucemia ni el contenido en glucosa o sorbitol del nervio (Greene *et al.*, 1982; Tomlinson y Mayer, 1985). De un modo similar, se ha demostrado que la administración de mioinositol con la dieta previene la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático (Greene y Lattimer, 1983; Kim *et al.*, 1991a). Los efectos anteriormente descritos han sido confirmados *in vitro* con cultivos celulares de neuroblastoma enriquecidos con mioinositol (Yorek *et al.*, 1991).

Por otra parte, la disminución del contenido de mioinositol en nervio periférico no se produce (Whitely y Tomlinson, 1985), o al menos no de forma importante (Gillon y Hawthorne, 1983) en el ratón, probablemente debido a características particulares de las enzimas de la vía metabólica del sorbitol (Greene *et al.*, 1988). De manera similar, los estudios realizados en pacientes diabéticos indican, salvo excepciones (Mayhew *et al.*, 1983), que la concentración de mioinositol en nervio no está disminuída (Dyck *et al.*, 1980; 1988). Los estudios realizados en humanos, junto con algunos más recientes realizados en animales de experimentación, apoyan la hipótesis de que la disminución del mioinositol en nervio es una alteración que aparece de forma aguda pero no se mantiene en la diabetes crónica (Greene *et al.*, 1990b). Estos datos, junto con el hecho de que pueda ser una consecuencia de la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, plantean dudas en la actualidad sobre la verdadera importancia de la disminución de la concentración de mioinositol en nervio en la fisiopatología de la neuropatía diabética.

La función más importante del mioinositol en el metabolismo del nervio periférico depende del hecho de que es capaz de incorporarse a una clase de

fosfolípidos que participan de manera crucial en la transducción de señales mediadas por receptores, los fosfatidilinositoles. Las consecuencias de la disminución del mioinositol en nervio diabético parecen mediadas por este mecanismo.

4.2.3. Alteraciones del metabolismo de los fosfatidilinositoles.

El mioinositol libre es necesario para la síntesis de fosfatidilinositol. Los fosfolípidos de las membranas celulares incluyen una pequeña proporción de fosfatidilinositol y cantidades aún menores de fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Esta familia de fosfolípidos, junto con otros, reciben el nombre de fosfatidilinositoles, y derivan del fosfatidilinositol por fosforilaciones secuenciales en su molécula de mioinositol (Michell, 1986).

Como se describirá más adelante, numerosos neurotransmisores y hormonas ejercen su acción en las células uniéndose a receptores de membrana. Estos, a su vez, son capaces de activar la síntesis de proteínas encargadas de transmitir señales intramembrana, las proteínas G, y éstas de regular la actividad de segundos mensajeros en la cara interna de la membrana celular (Linder y Gilman, 1992). Una de las acciones de las proteínas G es la activación de fosfolipasas, entre ellas la fosfolipasa C, que cataliza la degradación del fosfatidilinositol, del fosfatidilinositol 4-fosfato y del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. La hidrólisis de estos compuestos libera diacilglicerol y el mioinositol fosforilado correspondiente, el más importante de los cuales, el inositol 1,4,5-trifosfato es capaz de liberar Ca^{2+} de sus reservorios intracelulares. El diacilglicerol, los fosfatidilinositoles y el Ca^{2+} son los activadores fisiológicos de la proteína kinasa C (PKC).

Basándose en este conjunto de relaciones, se ha propuesto la hipótesis de que la disminución del mioinositol en nervio diabético originaría una disminución en la síntesis de activadores fisiológicos de la PKC, con lo cual ésta permanecería inhibida y su inhibición sería la responsable de la disminución de

la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Greene *et al.*, 1990a). Como se estudiara en el apartado correspondiente de esta Introducción y en la Discusión, esta hipótesis comienza a ser discutida.

4.2.4. Disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

La Na^+/K^+ ATPasa es una enzima unida a membrana que utiliza la energía que libera la hidrólisis del ATP para la translocación de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. Es la enzima más importante dentro del conjunto de ATPasas que participan en el movimiento de iones transmembrana. Se trata de una ATPasa que es selectivamente inhibida por ouabaína, y es por este procedimiento por el que puede ser diferenciada de otras ATPasas resistentes a ouabaína (Mg^{2+} y Ca^{2+} ATPasas, fundamentalmente) (Penefsky y Bruist, 1984).

La enzima consiste en un heterodímero de una unidad α y otra β . Se han descrito tres tipos de subunidades α (α_1 , α_2 y α_3) y dos de subunidades β (β_1 y β_2). Sus combinaciones dan lugar a las diferentes Na^+/K^+ ATPasas presentes en los tejidos humanos y en la mayoría de los seres vivos. La subunidad α es la metabólicamente activa ya que, además de ser la encargada de realizar el transporte iónico, presenta el lugar de unión para el ATP y para la ouabaína capaz de inactivarla. La subunidad β es la encargada de transportar la Na^+/K^+ ATPasa sintetizada y fijarla en la membrana celular. Los estudios realizados demuestran que se requiere la presencia de ambas subunidades para que exista actividad Na^+/K^+ ATPasa (Horisberger *et al.*, 1991).

El mantenimiento de los gradientes transmembrana de Na^+ y de K^+ es la principal función de la Na^+/K^+ ATPasa, y como consecuencia contribuye al mantenimiento del potencial de reposo de la membrana, que depende fundamentalmente del gradiente transmembrana de K^+ . Además, debido a que su actividad conlleva la salida en las células de 3 Na^+ y la entrada de 2 K^+ ,

actúa como bomba electrogénica.

La disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio periférico inducida por la diabetes fue descrita por primera vez en 1976 por Das *et al.*, en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Desde entonces numerosos trabajos han puesto de manifiesto esta disminución, tanto en estudios realizados *in vivo* en ratas genéticamente diabéticas BB-Wistar (Greene *et al.*, 1987a) y en ratas con diabetes inducida por aloxana (Bianchi *et al.*, 1988), como en estudios realizados *in vitro* en membranas de nervio ciático de rata con diabetes inducida por estreptozotocina (Kim *et al.*, 1991) y en células de neuroblastoma (Yorek *et al.*, 1991). También ha sido puesta de manifiesto esta disminución en otras estructuras implicadas en las complicaciones crónicas de la diabetes, como el glomérulo renal de rata diabética por administración de estreptozotocina (Cohen, 1985b), la retina de conejo diabético por inyección de aloxana (MacGregor y Matschinsky, 1986) y las grandes arterias del mismo modelo animal (Simmons *et al.*, 1986), etc. Sin embargo, en algunos modelos experimentales, como los ratones db/db genéticamente diabéticos, no ha podido ser demostrada (Bianchi *et al.*, 1987).

Como promedio, la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa inducida por la diabetes en los nervios ciáticos es de un 40% de los valores control. Greene *et al.* (1990a) han propuesto que se trata del defecto principal e iniciador de la neuropatía diabética, responsable de los primeros cambios estructurales irreversibles. La medida de la actividad Na^+/K^+ ATPasa es uno de los parámetros más utilizados en la actualidad para el estudio de la neuropatía diabética.

La disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa provoca a su vez otras alteraciones metabólicas, como la disminución del consumo de energía por los nervios afectados (Greene y Lattimer, 1984b), alteraciones en el balance de agua y electrolitos y la disminución de la captación de aminoácidos (Greene *et al.*, 1985a), etc.

Entre las alteraciones provocadas por la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa destacan, como se estudia a continuación, las alteraciones de tipo electrofisiológico, como son la acumulación intraaxonal de Na^+ y la disminución de la velocidad de conducción nerviosa.

4.2.5. Alteraciones electrofisiológicas.

La existencia de alteraciones electrofisiológicas inducidas por la diabetes en los nervios, fundamentalmente una disminución de la VCN, fue una de las primeras alteraciones descritas en la neuropatía diabética (Gregersen, 1967). En general, aunque con excepciones, se admite una disminución bastante precoz de la VCN, tanto en pacientes diabéticos como en los modelos experimentales.

Los pacientes con diabetes tipo I recién diagnosticada presentan con frecuencia una ligera disminución de la VCN que suele recuperarse cuando se instaura el tratamiento con insulina (Allen *et al.*, 1992). Los pacientes con diabetes de larga evolución presentan generalmente una disminución más marcada de la VCN (Caccia *et al.*, 1992) y acompañada de manifestaciones clínicas (Muller-Felber *et al.*, 1991).

Las ratas espontáneamente diabéticas o con diabetes inducida experimentalmente presentan de forma precoz (tres semanas de evolución) una disminución de la VCN (Sima y Brismar, 1985; Suzuki *et al.*, 1990) y también una disminución de la amplitud de los potenciales musculares evocados (Sima y Hay, 1981). También en ratones espontáneamente diabéticos (db/db) se ha demostrado una disminución de la VCN (Sharma *et al.*, 1983). Sin embargo, otros autores, en el mismo modelo animal y en los mismos tiempos de evolución, no observan esta disminución de la VCN (Whitely y Tomlinson, 1985). Por último, también se ha demostrado una disminución de la VCN en perros con diabetes inducida por la inyección de aloxana (Engerman *et al.*, 1990).

Entre los numerosos tratamientos que se han utilizado para prevenir la

disminución de la VCN en animales diabéticos, se encuentra el adecuado control de la glucemia (Greene *et al.*, 1975), la administración de inhibidores de la aldosa reductasa (Hirata y Okuda, 1990), la administración de mioinositol (Greene *et al.*, 1982), la administración de gangliósidos (Spüler *et al.*, 1988), etc.

El descubrimiento de que la actividad Na^+/K^+ ATPasa estaba disminuída en nervio periférico de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina llevó pronto al planteamiento de que era la disminución de ésta actividad la responsable de la disminución de la VCN (Das *et al.*, 1976). La actividad electrogénica de la Na^+/K^+ ATPasa mantiene el gradiente de Na^+ y K^+ existente a través de las membranas plasmáticas celulares. El gradiente transmembrana de K^+ es el principal responsable del potencial de reposo de la membrana, mientras que el de Na^+ es necesario para la generación de un potencial de acción. Así, estudios realizados en los nodos de Ranvier de las fibras mielinizadas han demostrado concentraciones anormalmente altas de Na^+ en el interior de los axones (Brismar y Sima, 1981), proponiendo esta alteración como responsable del bloqueo de la conducción nerviosa en las fibras mielinizadas (Brismar *et al.*, 1987).

Esta teoría, según la cual la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa sería la responsable de la disminución de la VCN, ha sido apoyada por numerosos trabajos, realizados en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (Greene y Lattimer, 1983; Hirata y Okuda, 1990; Sonobe *et al.*, 1991), en ratas espontáneamente diabéticas (Greene *et al.*, 1984a) y en ratones (Sima y Brismar, 1985).

Frente a esta teoría, algunos hechos demuestran que la relación entre la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa y la VCN en animales diabéticos no es tan directa. Así, en ratas con diabetes de cuatro semanas de evolución inducida por estreptozotocina se ha demostrado una disminución de la VCN sin disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Carrington *et al.*, 1991). También,

y estudiando la participación de la hipoxia en la neuropatía diabética en ratas, se ha demostrado una disminución de la VCN permaneciendo inalterada la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Smith *et al.*, 1991).

Por otro lado, en ratones diabéticos db/db (Norido *et al.*, 1984) y en ratones con diabetes inducida con aloxana (Gorio *et al.*, 1984), se ha demostrado que la VCN estaba disminuida y se recuperaba con la administración de gangliósidos, mientras que en los mismos animales se ha demostrado que la actividad Na^+/K^+ ATPasa permanece inalterada y no se modifica con el mismo tratamiento (Bianchi *et al.*, 1987). Además, en un modelo alternativo en ratones, en el cual se potencia la vía del poliol administrando galactosa, se ha demostrado que la disminución de la VCN coincide con un incremento de la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Ambos fenómenos se recuperan con la administración de inhibidores de la aldosa reductasa (Calcutt *et al.*, 1990).

4.3. Valoración de la proteína kinasa C en la neuropatía diabética.

4.3.1. Proteína kinasa C

La PKC es una enzima, descubierta en 1977 (Takai *et al.*, 1977; Inoue *et al.*, 1977), que fue caracterizada inicialmente por ser activada de forma reversible por la asociación de fosfolípidos de la membrana celular, en presencia de diacilglicerol y de Ca^{2+} a concentraciones fisiológicas. Está ampliamente distribuida en tejidos y órganos de mamíferos y otros animales inferiores, especialmente en el sistema nervioso, donde presenta su mayor actividad (Kikkawa y Nishizuka, 1986).

Esta enzima pertenece al grupo de las proteína kinasas dependientes de segundos mensajeros, que constituyen, junto a las proteína fosfatasas, uno de los principales sistemas de transducción de señales extracelulares en las células eucariotas (Cohen, 1992).

La PKC es una familia de enzimas, de las que se han identificado hasta la actualidad diez subespecies, diferenciadas atendiendo a su peso molecular, secuencia de aminoácidos, diferente expresión por tejidos, etc., y que son denominadas: α , β_I , β_{II} , γ , δ , ϵ , $\eta(L)$, θ , ζ y λ (Asaoka *et al.*, 1992). Actualmente se sistematizan en tres grupos:

- cPKC (PKC convencional o clásica), que incluye las subespecies α , β_I , β_{II} y γ , las primeras descubiertas, y que pueden ser activadas por Ca^{2+} , diacilglicerol y fosfolípidos.

- nPKC (PKC nueva), que incluye las subespecies δ , ϵ , $\eta(L)$ y θ , insensibles a Ca^{2+} , pero que responden a diacilglicerol y fosfolípidos.

- aPKC (PKC atípica), que incluye las subespecies de más reciente descubrimiento, ζ y λ , que no responden a Ca^{2+} ni a diacilglicerol.

Una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y otras sustancias biológicamente activas ejercen sus acciones sobre las células interactuando con receptores situados en la superficie de las mismas, en su membrana celular. Muchas de estas señales, a través del sistema de proteínas G, provocan la activación de la fosfolipasa C de la membrana, con la consiguiente degradación de una parte de los fosfolípidos que la constituyen, especialmente el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato y 1,2-diacilglicerol. El inositol trifosfato producido de esta manera, actúa sobre los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , provocando su liberación (Kikkawa y Nishizuka, 1986). Se ha establecido que una molécula de PKC inactiva, formando un complejo con cuatro moléculas de fosfolípidos, una molécula de diacilglicerol y al menos una molécula de Ca^{2+} constituyen la enzima activada (Huang, 1989). De este modo, una señal extracelular, a través de segundos mensajeros, es capaz de activar la PKC. Por último, parece que se trata de una enzima que sólo es activa cuando está unida a la membrana (Epanand y Lester, 1990).

La acción conjunta del Ca^{2+} liberado intracelularmente y del diacilglicerol producido activa la enzima de forma rápida, provocando la aparición de respuestas a corto plazo, entre las que se incluyen la activación de funciones celulares del sistema endocrino (liberación de hormonas de la médula y corteza suprarrenales, páncreas, hipófisis, tiroides, paratiroides, etc.), sistema exocrino (secreción de amilasa pancreática, secreción de las glándulas gástricas, etc.), sistema nervioso (liberación de acetilcolina en núcleo caudado y otros neurotransmisores en diferentes centros), contracción y relajación muscular, liberación de sustancias mediadoras de la respuesta inflamatoria, etc. (Nishizuka, 1989).

Por otro lado, también se ha implicado la participación de la PKC en fenómenos de regulación celular a largo plazo. En este caso se activa la fosfolipasa D, que hidroliza una molécula de fosfatidilcolina y la convierte en diacilglicerol, activándose la PKC de manera sostenida (Asaoka *et al.*, 1992). En estos fenómenos la PKC ejerce con frecuencia un papel de retroalimentación negativa, fosforilando los receptores de las hormonas y de los factores de crecimiento en cuya liberación se halla implicada (Nishizuka, 1988).

Además de las fosfolipasas C y D, la fosfolipasa A_2 también es capaz de activar la PKC. Esta activación, menos estudiada, la realiza hidrolizando fosfolípidos para liberar ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Asaoka *et al.*, 1992). Los primeros, en presencia de diacilglicerol, incrementan notablemente la afinidad de la PKC por el Ca^{2+} , dando lugar a una activación a corto plazo. Por otro lado, los lisofosfolípidos incrementan la afinidad de la PKC por el diacilglicerol, activándola de manera sostenida.

A partir de numerosos experimentos se ha propuesto para la PKC un papel en la modulación de las funciones de la propia membrana en la que se encuentra, a través de la fosforilación de proteínas de membrana como canales, bombas y proteínas de intercambio iónico (Nishizuka, 1986).

Por último, se ha descrito que numerosos ésteres de forbol, y

especialmente el 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato, son capaces de inducir la aparición de tumores actuando sobre la membrana celular de diferentes tipos celulares. En 1982 se estableció, tanto en experimentos realizados *in vivo* como *in vitro*, que los ésteres de forbol activaban la PKC (Castagna *et al.*, 1982) y que el grado de activación de la misma estaba relacionado con la capacidad de inducir transformación tumoral. Posteriormente se demostró que los ésteres de forbol tienen una parte de su molécula muy similar a la del diacilglicerol, con lo cual son capaces de unirse a la molécula de PKC en lugar de éste, provocando su activación y aumentando la afinidad del Ca^{2+} por la misma. Numerosos estudios apoyan en la actualidad la hipótesis de que la PKC es una proteína receptora para numerosos promotores tumorales, estén o no relacionados estructuralmente con los ésteres de forbol (Nishizuka, 1984; 1989).

Todas las acciones citadas las realiza la PKC a través de la fosforilación de diferentes proteínas, entre las que se encuentran receptores (de insulina, somatomedina C, transferrina, interleukina 2, factor de crecimiento epidérmico, etc.), otras proteínas de membrana (Na^+/K^+ ATPasa, proteínas de intercambio H^+/Na^+ , transportador de glucosa, etc), proteínas del sistema contráctil y del citoesqueleto (cadenas ligeras de miosina, troponina T e I, vinculina, etc.), enzimas (glucógeno sintetasa, fosfofructokinasa, NADPH oxidasa, tirosina hidroxilasa, etc.) y otras proteínas (fibrinógeno, proteínas de estrés, etc.) (Nishizuka, 1986).

4.3.2. Inhibidores de la proteína kinasa C

Los inhibidores de la PKC son usados habitualmente para estudiar las funciones fisiológicas de esta enzima. Ningún inhibidor de los utilizados actualmente es absolutamente específico para la PKC, pudiendo inhibir otras proteína kinasas, fundamentalmente la proteína kinasa A (dependiente de AMP cíclico), la proteína kinasa G (dependiente de GMP cíclico) y la proteína kinasa dependiente de calmodulina.

Los inhibidores de la PKC pueden ser clasificados en dos grupos, según

realicen su acción sobre el dominio regulador o sobre el dominio catalítico de su molécula (Epanand y Lester, 1990). El dominio regulador es una zona rica en cisteína, al cual se unen los fosfolípidos, el Ca^{2+} y el diacilglicerol. El dominio catalítico o centro activo es el lugar destinado para la unión del ATP y la proteína que va a ser fosforilada.

Entre los inhibidores que actúan interfiriendo la interacción del diacilglicerol con la PKC, que actualmente son los inhibidores conocidos más específicos para la PKC, encontramos el calfostin C, cremophor EL y AMG (1-*O*-alkil-2-*O*-metilglicerol). Estos compuestos también antagonizan el efecto *in vitro* de los ésteres de forbol sobre la PKC (Huang, 1989).

Existe un grupo numeroso de fármacos que interfieren en el metabolismo de los fosfolípidos, inhibiendo la PKC de forma competitiva. No son en absoluto específicos, pudiendo inhibir también proteína kinasas dependientes de calmodulina. Este grupo incluye antidepresivos (trifluoperacina, clorpromacina, flufenacina, imipramina, etc.), anestésicos locales (dibucaína, tetracaína, etc.), verapamil, fentolamina, heparina, adriamicina, polimixina B, vitamina E, etc (Kikkawa y Nishizuka, 1986).

Por último, algunos inhibidores de la PKC actúan interfiriendo la interacción del ATP y la proteína sustrato con el centro activo o catalítico de la enzima. Pertenecen a este grupo algunos inhibidores muy utilizados, como el H7 y el compuesto K252 (Huang, 1989). Sin embargo, y debido a que la estructura del centro activo de la enzima destinado a la unión con el ATP es muy similar en todas las proteína kinasas, estos compuestos, aunque exhiben una mayor especificidad sobre la PKC, pueden inhibir otras proteína kinasas, especialmente la proteína kinasa A.

4.3.3. Papel de la proteína kinasa C en la fisiopatología de la neuropatía diabética.

Como se estudió en el apartado 4.2.3. de esta Introducción, las

alteraciones del metabolismo de los fosfatidilinositoles, inducidas por la diabetes en diferentes tejidos, han dado lugar a que se postule que son las alteraciones en la regulación de la actividad PKC las responsables de la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa presente en nervio ciático.

Antes que en la neuropatía diabética, se ha postulado la participación de la PKC en diferentes complicaciones de la diabetes, estando activada en la mayoría de los tejidos y órganos implicados. El mecanismo por el cual la hiperglucemia de los pacientes diabéticos produce la activación de la PKC sería consecuencia del incremento de la utilización de la glucosa por la vía del sorbitol, como se vió en el apartado 4.2.1. de esta Introducción, que produce una disminución en el cociente NADH/NAD^+ . La disminución citosólica de este cociente promueve la síntesis *de novo* de diacilglicerol por dos mecanismos: favorece la reducción de dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato, primer paso para la síntesis de diacilglicerol, e incrementa la disponibilidad de dihidroxiacetona fosfato, disminuyendo la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato (Tilton *et al.*, 1992).

La síntesis *de novo* de diacilglicerol, con incremento de la concentración tisular del mismo y activación de PKC, ha sido demostrada en glomérulo aislado de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina (Craven y DeRubertis, 1989; Craven *et al.*, 1990; Wali *et al.*, 1990), en cultivos celulares con medios ricos en glucosa, tanto de células endoteliales de capilares retinianos de vaca (Lee *et al.*, 1989b) como de adipocitos de rata (Ishizuka *et al.*, 1989) y en corazón de rata diabética (Okamura *et al.*, 1988).

Son numerosos los estudios que demuestran la activación de la PKC en las diferentes complicaciones de la diabetes. Así, estudiando la nefropatía diabética, se ha descrito que la PKC está activada en los glomérulos de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina (Craven y DeRubertis, 1989) y que las células mesangiales de riñón de rata, aisladas y cultivadas en medios con cantidades elevadas de glucosa, sufren transformaciones similares a las observadas en la nefropatía diabética que parecen provocadas por la activación

de la PKC (Ayo *et al.*, 1991; Studer *et al.*, 1993). También se ha demostrado que la activación de la PKC es la responsable de la vasodilatación observada en los glomérulos de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Awazu *et al.*, 1991).

En cuanto a las alteraciones vasculares, se ha observado que las células endoteliales de capilares de retina bovina, cultivadas en medios ricos en glucosa, presentan alteraciones metabólicas idénticas a las que aparecen en las mismas células en los pacientes diabéticos, demostrándose la participación de la activación de la PKC en dichas alteraciones (Lee *et al.*, 1989a). También se ha descrito que la activación de la PKC es la responsable de la anormal relajación de las arterias aorta y mesentérica de rata diabética (Abebe y MacLeod, 1990) y de la relajación dependiente del endotelio de segmentos de aorta de conejo, incubados en medios ricos en glucosa (Tesfamariam *et al.*, 1991). Finalmente, se ha demostrado que la PKC está activada en células de músculo liso vascular cultivadas en medios ricos en glucosa (Williams y Schirier, 1992).

Sin embargo, en otros tejidos, no asociados clásicamente a las complicaciones crónicas de la diabetes, se ha demostrado que la PKC está inhibida. Así, se ha descrito que la actividad de esta enzima está disminuida en hígado (Pugazhenthii *et al.*, 1990) e intestino delgado (Wali *et al.*, 1990) de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina.

En cuanto a su participación en la fisiopatología de la neuropatía diabética, fue implicada ya en 1973 por Goldman y Albers, al establecer una relación entre los fosfolípidos y la actividad Na^+/K^+ ATPasa, y describir que la fosfolipasa C inhibe parcialmente la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

Primero se postuló que la PKC estaba inhibida en el nervio periférico y se propuso que la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en el nervio ciático era consecuencia de la disminución de la actividad PKC en el mismo (Greene *et al.*, 1992). Esta hipótesis se basa en experimentos en los cuales los activadores de la PKC normalizan *in vitro* y de forma aguda el consumo de

oxígeno que puede ser inhibido con ouabaína (debido a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa) en nervio de conejo diabético por inyección de aloxana (Greene y Lattimer, 1986) y también en nervio ciático de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina (Kim *et al.*, 1991b). También se ha demostrado una disminución del contenido de diacilglicerol en nervio ciático de ratas diabéticas, con lo cual la PKC carecería de uno de sus activadores fisiológicos y estaría parcialmente inactivada (Zhu y Eichberg, 1990).

Estudios recientes sostienen que la PKC está activada también en tejido nervioso de animales diabéticos, de modo similar a lo que ocurre en otros tejidos. Así, la utilización de ésteres de forbol para estimular la fosfolipasa D en nervio ciático de ratas control y diabéticas por inyección de estreptozotocina, ha llevado a la conclusión de que la PKC debería estar activada en el nervio ciático de las ratas del grupo diabético (Eggen y Eichberg, 1992).

Por otra parte, comienzan a ser numerosos los estudios que evidencian una regulación de la actividad de la enzima Na^+/K^+ ATPasa por la actividad PKC. Se ha demostrado que la Na^+/K^+ ATPasa se fosforila por la PKC (Lowndes *et al.*, 1990). Sin embargo, el efecto de esta fosforilación sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa no está aclarado, ya que unos autores sugieren que la activación de la PKC la estimula (Gupta *et al.*, 1991) mientras otros defienden el que los activadores de la PKC inhiben la Na^+/K^+ ATPasa (Bertorello y Aperia, 1989). Estudios realizados en oocitos de *Xenopus laevis* también han demostrado que la administración de diacilglicerol exógeno, probablemente a través de la activación de la PKC, es capaz de inhibir la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa (Khan *et al.*, 1991).

Por todo lo anterior, se puede concluir que, hasta el momento son pocos los datos concluyentes sobre el estado de la PKC en el nervio ciático en la neuropatía diabética.

4.4. Estrés oxidativo y neuropatía diabética.

4.4.1. Estrés oxidativo.

Se ha definido "estrés oxidativo" como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1985). Entre los agentes oxidantes destacan los radicales libres, entendiendo por éstos toda molécula en la cual uno de sus átomos presenta un electrón desapareado, y son generados por oxidación de moléculas que inicialmente contienen pares de electrones con *spin* opuesto (Flaherty y Weisfeldt, 1988). Frecuentemente, la partícula es un átomo de oxígeno, por la facilidad de éste para transformarse en radical (Miquel, 1989), dando lugar a la formación de diferentes radicales libres derivados de oxígeno: anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), entre otros.

El efecto más importante de estos radicales libres sobre las células vivas está mediado por su extraordinaria reactividad química como oxidantes, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas DNA (provocando mutaciones) o lípidos de membrana (provocando su peroxidación), por reacción directa con ellas.

La prevención del daño ocasionado por los sistemas oxidantes la realizan los sistemas antioxidantes celulares. Estos sistemas incluyen los agentes antioxidantes, proporcionados o no por la dieta (vitaminas C y E, glutatión, etc.), las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que bien contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies, 1991).

Entre los sistemas de defensa antioxidante celulares destaca el sistema

glutación. Se denomina sistema glutatión (ver figura 2) al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo (Meister y Anderson, 1983), que son además las responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister, 1988).

El glutatión es un tripéptido presente en la mayoría de células animales. Entre las diversas funciones que ejerce destacan las funciones protectoras, metabólicas y su participación en los sistemas de transporte (Viña *et al.*, 1989). Por un lado, es un reductor intracelular que protege a las células frente a radicales libres, peróxidos y otros compuestos tóxicos, y frente a las consecuencias de la irradiación. Por otro, participa en la síntesis de ácidos nucleicos, en la regulación de la síntesis y degradación de proteínas, en la gluconeogénesis, en la desyodación de las hormonas tiroideas, actúa como reservorio de cisteína, como coenzima, participa en la homeostasis del calcio, etc. Por último, se ha descrito su participación en la secreción de hormonas polipeptídicas, en la liberación de neurotransmisores y en la captación de aminoácidos.

Entre las enzimas que forman parte del sistema glutatión destacan las glutatión S-transferasas (conjunto de enzimas que participan en la detoxificación de numerosos compuestos), la glutatión peroxidasa (que reduce el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos lipídicos u orgánicos utilizando el glutatión como dador de electrones), la glutatión disulfuro reductasa y la γ -glutamyl-transpeptidasa. De todas ellas, la actividad glutatión peroxidasa ocupa un puesto clave en el sistema de defensa antioxidante intracelular frente a los radicales libres de oxígeno (Raes *et al.*, 1987).

4.4.2. Estrés oxidativo en tejido nervioso periférico.

El tejido nervioso, por el hecho de ser muy rico en lípidos, es especialmente susceptible de sufrir daño por radicales libres. De hecho, se ha implicado la presencia de estrés oxidativo en la fisiopatología de numerosas enfermedades que afectan al tejido nervioso central y periférico. Entre las

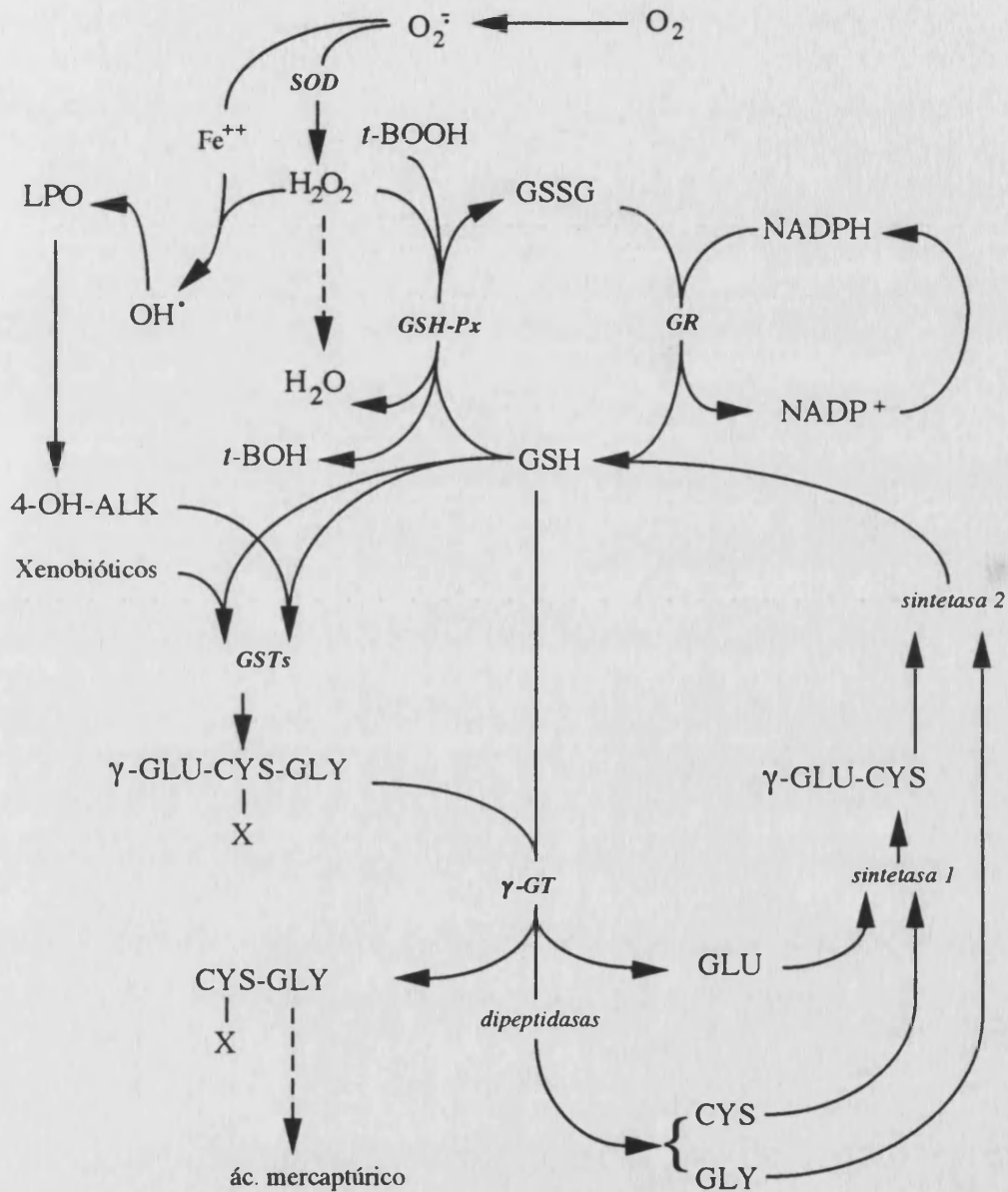


Figura 2: Esquema del sistema glutatión y de algunos aspectos de su metabolismo. GSH: glutatión, GSSG: glutatión disulfuro, LPO: peroxidación lipídica, 4-OH-ALK: 4-hidroxi-alquenes, GSHPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSTs: glutatión S-transferasas, g-GT: g-glutamil transpeptidasa, SOD: superóxido dismutasa, X: xenobiótico.

primeras destacan la enfermedad de Parkinson (Adams y Odunze, 1991), la enfermedad de Alzheimer (Adams *et al.*, 1991), la epilepsia (Mori *et al.*, 1990) y la retinopatía del prematuro (Penn, 1990). Entre las segundas, la neuropatía diabética (Low y Nickander, 1991) y la neuropatía alcohólica (Raya *et al.*, 1993).

La existencia de mecanismos de defensa antioxidante en tejido nervioso permite su defensa frente a las especies activadas de oxígeno que se producen en condiciones normales en las neuronas, y frente a las que se producen en las enfermedades anteriormente citadas, intoxicaciones, etc. Mientras que los sistemas de defensa antioxidante en tejido nervioso central han sido ampliamente estudiados (Cohen, 1985a), los sistemas antioxidantes en tejido nervioso periférico han sido caracterizados recientemente en la rata (Romero *et al.*, 1990) y tienen una importancia comparable a los del sistema nervioso central (Romero *et al.*, 1991).

4.4.3. Valoración del estrés oxidativo en la neuropatía diabética

Oberley, en su revisión de 1988 sobre radicales libres y diabetes, recoge las alteraciones inducidas por la diabetes en los sistemas antioxidantes de numerosos tejidos animales y humanos. Los resultados revisados hasta ese momento resultan contradictorios en numerosas ocasiones. Las alteraciones observadas, dependiendo de los órganos estudiados, incluyen incremento o disminución de actividades enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, etc.), de la concentración de sustancias antioxidantes (glutatión, vitamina E, etc.) y de los productos formados por estrés oxidativo (lipoperóxidos, etc.). El resumen de los resultados presentados sería muy extenso, ya que dependiendo del trabajo estudiado se producen alteraciones de uno u otro signo.

El estudio del efecto de la insulina sobre las alteraciones de los sistemas antioxidantes ofrece igualmente conclusiones contradictorias: el adecuado control de la glucemia con insulina revierte las alteraciones observadas en los

mecanismos de defensa antioxidante en diversos órganos de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina (Wohaieb y Godin, 1987b) y de aloxana (Godin *et al.*, 1988), pero no en ratas espontáneamente diabéticas (Wohaieb y Godin, 1987c).

No existen datos sobre los efectos de la diabetes en el tejido nervioso periférico en los trabajos anteriormente citados, dado que la mayoría de los estudios que hacen referencia al estrés oxidativo y a los sistemas de defensa antioxidante inducidos por la diabetes en tejido nervioso periférico son posteriores a la revisión de Oberley (1988). Sin embargo, es manifiesta la presencia de factores que inducen la formación de radicales libres y de alteraciones de la defensa frente a éstos.

Como se ha revisado a lo largo de esta Introducción, la presencia de alteraciones microvasculares y el acúmulo de sorbitol, inducidos por la diabetes en el tejido nervioso periférico, destacan entre los mecanismos que inducen la formación de radicales libres en este tejido y, por tanto, favorecen la aparición de estrés oxidativo en el mismo.

Entre los pocos datos que apoyan la presencia de acciones debidas a los radicales libres de oxígeno en tejido nervioso diabético se encuentran los presentados en el trabajo de Low y Nickander (1991), destacando el incremento de dienos conjugados (formados por peroxidación de lípidos) y la disminución de la actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, la concentración de malondialdehído, producto de la degradación de lípidos, no está disminuida. Por último, se presenta un resultado difícil de valorar, ya que se describe una reducción de hidroperóxidos que, según los propios autores, puede reflejar el incremento de la actividad glutatión peroxidasa descrita en algunos tejidos de animales diabéticos (Godin *et al.*, 1988).

Respecto del estudio de las alteraciones inducidas por la diabetes en los sistemas de defensa antioxidante en nervio periférico destaca un trabajo realizado en diferentes ratones diabéticos, obtenidos por mutaciones genéticas, y

que revela un incremento de la actividad glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa en algunos de ellos, mientras que en otros permanece inalterada (Cloeze *et al.*, 1989). En otro trabajo, la concentración de glutatión en nervio ciático de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina es la misma que en ratas control (Carroll *et al.*, 1986).

Uno de los mecanismos que se ha propuesto como responsable de las complicaciones de la diabetes es el fenómeno conocido como glicosilación autooxidativa de proteínas. Por un lado, la glucosa puede reaccionar lentamente, sin mediación enzimática, con los grupos amino de las proteínas, formando inicialmente una base de Schiff. Este primer paso se llama glicosilación no enzimática o más propiamente, glicación. La degradación de estos productos puede dar lugar a la formación de deoxiglucosonas, que pueden reaccionar con proteínas formando los productos de Maillard o productos de la glicosilación. Por otro lado, la autooxidación de la glucosa, en presencia de metales de transición, puede producir lentamente radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno, que a su vez pueden provocar alteraciones estructurales de las proteínas (Wolf *et al.*, 1991).

La presencia de glicosilación autooxidativa se ha puesto de manifiesto en numerosas proteínas: lipoproteínas de baja densidad (Hunt *et al.*, 1990), laminina (Charonis *et al.*, 1990), colágeno (Monnier *et al.*, 1988), etc. Por otro lado, la administración de aminoguanidina, sustancia que previene la formación de productos finales de la glicosilación, ha demostrado prevenir los efectos de la diabetes sobre el colágeno de la piel y el riñón de ratas diabéticas (Odetti *et al.*, 1990). En la actualidad, la glicosilación autooxidativa es una de las posibles explicaciones para las complicaciones crónicas de la diabetes, especialmente para aquellas que parecen tener una mayor relación con los niveles de glucemia.

A pesar de que la hipótesis de la existencia de estrés oxidativo en el origen de la neuropatía diabética se postuló hace tiempo (Low *et al.*, 1989), los datos de que se dispone en la actualidad, bien sobre mecanismos de defensa antioxidante, bien sobre la presencia de factores prooxidantes, son escasos y

poco concluyentes, por lo que su estudio resulta de interés, tanto por sí mismos como formando parte de otras hipótesis planteadas sobre la fisiopatología de la neuropatía diabética.

II. OBJETIVOS

Basándonos en lo expuesto en el apartado de Introducción, nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos:

1. Obtención de un modelo experimental adecuado a nuestras necesidades, en el que poder estudiar de forma sencilla parámetros bioquímicos y electrofisiológicos de las lesiones inducidas por la diabetes en el tejido nervioso periférico.

2. Estudio de la posible implicación de la proteína kinasa C en la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de ratones diabéticos, y por tanto en la fisiopatología de la neuropatía diabética, bien mediante la determinación directa de la actividad de esta enzima, bien utilizando inhibidores de la misma.

3. Valoración del posible efecto beneficioso de los inhibidores de la proteína kinasa C, previniendo y/o recuperando las lesiones bioquímicas y/o electrofisiológicas inducidas por la diabetes en nuestro modelo experimental.

4. Estudio de la defensa antioxidante en el nervio ciático del ratón como aproximación válida para el estudio de la fisiopatología de la neuropatía diabética.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Animales.

En la realización de este trabajo se han utilizado ratones albinos de raza Swiss, machos, con un peso en el inicio de los experimentos comprendido entre 20 y 25 gramos.

Antes y durante la realización de los experimentos, los ratones tuvieron libre acceso a comida y agua. La comida, una dieta comercializada por Leticia (Hospitalet, Barcelona), es una fórmula de mantenimiento para rata y ratón, IPM-R20, cuya composición es del 63% de glúcidos, 3% de grasas, 17% de proteínas y 5% de fibra, y su energía metabolizable de 2950 Kcal/Kg. Las condiciones de estabulación son de ciclos día-noche de 12 horas (8:00-20:00), con temperatura controlada entre 19 y 21 °C y una humedad relativa del 45-55%.

1.2. Aparatos.

Espectrofotómetros

- Espectrofotómetro ZEISS, modelo PM6, termostatizado y con intercambiador automático de cubetas y registrador BBC GOERZ, modelo Servogor 210.

- Espectrofotómetro KONTRON, modelo UVIKON 810, termostatizado, con registrador UVIKON Recorder 21 e impresora UVIKON LS Printer 48.

- Espectrofotómetro SHIMADZU, modelo UV-120-02, termostatizado, con registrador LKB, modelo REC 101.

Centrífugas

- Centrífuga de mesa EPPENDORF, modelo 5415C.
- Centrífuga refrigerada HERAEUS Sepatech, modelo Biofuge 17RS.
- Centrífuga SORVALL, refrigerada, modelo RC-5B.
- Ultracentrífuga BECKMAN, refrigerada, modelo L8-70M.

Congeladores y refrigeradores

- Congelador vertical KOXKA, que mantiene una temperatura constante de -80°C.
- Congelador vertical ZANUSSI, modelo Z-1270/V, que mantiene una temperatura constante de -25°C.
- Arcón congelador LIEBHERR, modelo GT 1401, que mantiene una temperatura constante de -25°C.
- Refrigerador PHILCO, modelo PH 109F, que mantiene una temperatura constante de 4°C.

Contador de viales de centelleo LKB, modelo 1219 Rackbeta, controlado por un ordenador personal OLIVETTI, modelo M280.

Balanzas

- Báscula LETICA, modelo LE 2066, que integra el peso a lo largo del tiempo, para pesar los ratones.
- Balanza electrónica AND, modelo FY-3000, para pesar hasta 3100 g, con una sensibilidad de 0.1 g.
- Balanza electrónica AND, modelo EK-1200, para pesar hasta 1200 g, con una sensibilidad de 0.1 g.
- Balanza electrónica METTLER, modelo H54AR, para pesar hasta 160 g, con una sensibilidad de 0.01 mg.
- Balanza electrónica METTLER, modelo H43, para pesar hasta 160 g, con una sensibilidad de 0.1 mg.

Osciloscopio de doble haz TEKTRONIX, modelo 5110, con cámara de vídeo TEKTRONIX, modelo C-1001, acoplada y conectada a una tarjeta digitalizadora TEKTRONIX, modelo DCS01.

Monitor de vídeo TEKTRONIX, modelo DX05.

Copiadora de vídeo TEKTRONIX, modelo HC01.

Estimulador eléctrico CIBERTEC, modelo CS-220.

Baño refrigerado HETO INTERMED, modelo Hetofrig, con termostato calefactor HETO INTERMED, modelo 03DBI623.

Termómetro electrónico de precisión ELLAB, modelo Du3S, con sonda termopar de aguja ELLAB, modelo MKA-A.

Varios

- Vórtex HEIDOLPH, modelo Reax 2000 y KARTELL, modelo TK3S.
- Agitadores magnéticos con (ALC, modelo Mivariel) y sin calefactor (SBS, modelo A-01).
- Máquina de hielo picado SCOTSMAN, modelo AF-10.
- pHmetro CRISON, modelo 2002.
- Contador Geiger LUDLUM, modelo 2A.
- Baño termostatzado con agitación HAAKE, modelo SWB 20.

1.3. Productos y reactivos químicos.

- de la firma Sigma Chemical Co. (San Luis, MO, EEUU): Trizma base, estreptozotocina, aloxana, H7, HA1004, ouabaína, GSH S-transferasa, peróxido de hidrógeno, protein assay kit, Tritón X-100, DMSO, *t*-BOOH, BSA, sacarosa, EGTA, DMSO, β -mercaptoetanol, leupeptina, L- α -fosfatidil-L-serina, forbol 12-miristato 13-acetato, ditioneitol.

- de la firma Merck (Darmstadt, Alemania): reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu, ácido tricloroacético, etanol, CDNB, azida sódica, sulfato de magnesio, sulfato de cobre, acetato cálcico, ácido ortofosfórico, acetato de magnesio, parafina líquida fluida.

- de la firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania): Test-Combination glucosa, fosfoenolpiruvato, NADH, NADPH, ATP, piruvato

kinasa, lactato deshidrogenasa, GSH, EDTA, GSSG reductasa, PMSF:

- de la firma Fluka (Buchs, Suiza): Ácido cítrico, tartrato sódico potásico, carbonato mono y disódico, carbonato monopotásico, fosfato mono y dipotásico, hidróxido sódico, fosfato mono y disódico.

- de la firma Amersham (Amersham, Gran Bretaña): péptido sustrato para determinación de actividad PKC, [γ - ^{32}P]ATP.

- de la firma Kamiya Biomedical Co. (Thousand Oaks, CA, EEUU): Calfostin C.

- de la firma Seikagaku América Inc. (Rockville, MD, EEUU): HA-1004.

- El agua bidestilada utilizada se obtuvo mediante un destilador MILLIPORE, modelo Milli-RO 30 Plus.

- Bombas implantables de liberación lenta Alzet[®] miniosmóticas modelo 2002 y microosmóticas modelo 1003D de la casa Alza (Palo Alto, CA, EEUU).

1.4. Material habitual de laboratorio.

- Microcubetas de metacrilato de 1.5 ml de capacidad y 1 cm de camino óptico.

- Material quirúrgico: tijeras, bisturí de hojas intercambiables, pinzas de disección, separadores, agujas e hilo de sutura, etc.

- Pipetas automáticas EPPENDORF, GILSON, KARTELL y SEALPETTE, fijas y regulables, que abarcan de 0.5 μl a 5 ml.

- Dispensador automático EPPENDORF, modelo Multipette 4780, con Combitips para volúmenes de 50 μl a 5 ml.

- Material de vidrio: probetas, vasos de precipitado, matraces Erlenmeyer, matraces aforados, termómetros, embudos, botellas de almacenamiento, etc.

- Material desechable como puntas de pipeta, pipetas Pasteur, jeringuillas

de insulina, tubos de ensayo de vidrio y de plástico, capilares heparinizados, guantes, etc.

- Homogenizadores Potter de teflón de 1 y 2 ml.

1.5. Material informático.

Hardware:

- Ordenador personal APPLE, modelo Macintosh Plus, con disco duro de 40 Mb y memoria RAM de 4 Mb.
- Ordenador personal APPLE, modelo Macintosh Classic, con disco duro de 40 Mb y memoria RAM de 2 Mb.
- Ordenador personal NORGATE, modelo XT-12MHz.
- Impresora APPLE, modelo Personal Laser Writer.
- Trazador TEKTRONIX, modelo HC100 Color Plotter.

Software:

- ChemDraw™, versión 2.1.3
- Cricket Graph, versión 1.3.2
- End Note Plus
- MacDraw II, versión 1.1
- MacWrite II, versión 1.1
- Microsoft Excel, versión 3.0
- Microsoft Word, versión 4.0
- MYSTAT, versión 1.1
- Pharm/PCS, versión 4
- StatWorks™, versión 1.1

2. Modelo experimental.

2.1. Inducción de diabetes con estreptozotocina.

Para la inducción de diabetes con estreptozotocina, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con una dosis única de una disolución de

estreptozotocina en tampón citrato fosfato 10 mM, pH 4.5. Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones, 17.5, 26.25 y 35 mg/ml, para que inyectando siempre 4 μ l/g, obtuviéramos las dosis deseadas: 70, 105 y 140 mg de estreptozotocina por kilogramo de peso.

2.2. Inducción de diabetes con aloxana.

Para la inducción de diabetes con aloxana, los ratones se inyectaron subcutáneamente con una dosis única de una solución de aloxana disuelta en tampón citrato fosfato 10 mM, pH 4.5. Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones, 33.33 y 66.67 mg/ml para obtener unas dosis de 100 y 200 mg de aloxana por kilogramo de peso respectivamente, de tal manera que siempre se inyectaron 3 μ l de la solución preparada por gramo de peso.

3. Obtención de muestras.

3.1. Sangre.

Para obtener una muestra de sangre de los ratones se realizó una pequeña incisión con un bisturí en el extremo de la cola y se recogió la sangre con ayuda de un tubo capilar heparinizado.

3.2. Nervio ciático.

Tras el sacrificio de los ratones por dislocación cervical, se practicó una incisión en la cara anterointerna de las extremidades posteriores con ayuda de un bisturí. Se disecó y seccionó la musculatura abductora con ayuda de pinzas y tijeras finas, dejando en primer término los nervios ciáticos. Fueron disecados cuidadosamente y se cortó la máxima longitud posible de cada uno de ellos, unos 2 centímetros. Tras pesarlos, (10 o 12 mg entre los dos) se procedió a su procesamiento según el tipo de análisis que se fuera a efectuar.

3.3. Cerebro.

Tras el sacrificio del animal por dislocación cervical, se decapitó el ratón con ayuda de unas tijeras. Se introdujo una de las hojas de las tijeras por el agujero occipital, seccionando el hueso del mismo nombre y continuando el corte por la línea interparietal, hasta llegar a la articulación con el hueso frontal. Se realizaron dos cortes más, paralelos al primero partiendo del mismo agujero occipital y situados a nivel de la articulación tèmproparietal, extendiéndolos hasta el hueso frontal. Con ayuda de unas pinzas se levantaron los dos fragmentos de hueso con lo cual quedó expuesto el cerebro. Fue levantado cuidadosamente, seccionando los pares craneales y se extrajo el cerebro con el cerebelo y tronco encefálico. Se procesó el cerebro inmediatamente, según el tipo de análisis que se fuera a realizar.

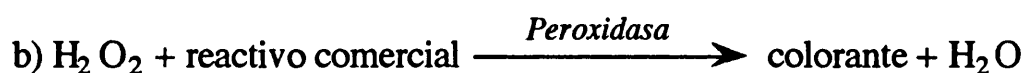
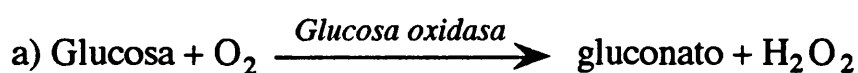
4. Procedimientos analíticos.

4.1. Determinación de la glucemia.

4.1.1. Fundamento teórico.

Para la determinación de la glucemia se utilizó un test, disponible comercialmente, de Boehringer Mannheim, basado en el procedimiento descrito por Kunst *et al.* (1984).

Se trata de un método enzimático de reacciones acopladas cuyo fundamento es el siguiente:



El colorante producido es proporcional a la cantidad de glucosa contenida

en la muestra y puede ser detectado espectrofotométricamente con una longitud de onda de 610 nm.

4.1.2. Soluciones.

Solución 1: Estándar de glucosa.

Concentración: 0.505 mM (9.1 mg/dl).

Solución 2:

Tampón fosfato: 100 mM, pH 7.0.

Peroxidasa: ≥ 0.8 U/l.

Glucosa oxidasa: ≥ 10 U/l.

Cromógeno ABTS®: 1.0 mg/ml.

4.1.3. Preparación de las muestras.

Para la determinación de la glucemia se tomaron 50 μ l de sangre de la cola del ratón, por el procedimiento descrito en el apartado 3.1. de este mismo capítulo de Materiales y Métodos, y se mezclaron inmediatamente con 50 μ l de ácido tricloroacético al 10%. La muestra acidificada se mantuvo a 4°C durante al menos 15 minutos con el fin de que la precipitación de las proteínas fuera completa y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación se neutralizó con la cantidad adecuada de una solución de KHCO₃ 2M. Para la realización del ensayo se utilizó este sobrenadante diluido cinco veces, por exceder los niveles de glucemia de los ratones diabéticos el límite máximo que puede detectar este análisis.

4.1.4. Procedimiento.

Se pipetearon en tubos de ensayo dos cantidades distintas de cada muestra neutralizada y diluida. Se prepararon dos tubos con una cantidad conocida de solución 1 (estándar) y un tubo con agua bidestilada (blanco). Se añadió la cantidad adecuada de agua bidestilada con el fin de que todos los tubos

contuvieran el mismo volumen y se añadió 1 ml de solución 2.

Se mezclaron bien y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Al cabo de este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras y del estándar frente al valor del blanco, a una longitud de onda de 610 nm y con una microcubeta de 1 cm de paso de luz.

Los cálculos se realizaron dividiendo la absorbancia de la muestra entre la del estándar y multiplicando esta razón por la concentración de glucosa en el estándar. Los valores de glucemia se expresan en unidades internacionales, es decir, en mM. Para calcular la glucemia en las unidades más frecuentemente utilizadas (mg/dl) basta con multiplicarlos por un factor de 18.

4.2. Determinación del contenido en proteínas.

4.2.1. Fundamento teórico.

La determinación del contenido de proteínas de las muestras se realizó por el procedimiento de Lowry *et al.* (1951), modificado del modo que se presenta a continuación.

4.2.2. Soluciones.

Solución A: disolver en 1 litro de agua bidestilada:

40 g de carbonato sódico (Na_2CO_3)

8 g de hidróxido sódico (NaOH)

Solución B: disolver en 1 litro de agua bidestilada:

200 mg de sulfato de cobre (CuSO_4)

400 mg de tartrato sódico potásico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$)

Para la utilización en el ensayo se mezclaron, inmediatamente antes, en partes iguales (solución A+B)

Reactivo de Folin-Ciocalteu: diluido 1/2 con agua bidestilada.

Estándar de proteína: BSA 1 mg/ml, disuelta en agua bidestilada.

4.2.3. Procedimiento.

Se prepararon tubos de ensayo con cantidades diferentes de estándar (10, 25, 50, 75 y 100 μ l) y con dos cantidades diferentes de cada muestra (10 y 25 μ l, por ejemplo). Se preparó un tubo como blanco, que no contenía proteína.

Se añadió agua bidestilada hasta 500 μ l.

Se añadieron 2.5 ml de solución A+B.

Tras mezclar bien, se esperaron 10 minutos, a temperatura ambiente.

Se añadieron 250 μ l de solución de Folin.

Se agitó bien y se esperó durante 25 ó 30 minutos.

Se traspasó el contenido de cada tubo en una cubeta de 3 ml y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 696 nm.

Los cálculos se realizaron con ayuda de la absorbancia que presentaban los tubos que contenían concentraciones conocidas de proteína (estándares).

4.2.4. Método modificado.

La presencia en algunas muestras (fracción que contiene las membranas para la determinación en ellas de la actividad PKC; apartado 4.4.3. de este capítulo de Materiales y Métodos) de sustancias que interfieren con el método directo de Lowry motivó que utilizáramos una modificación del mismo propuesta por Peterson (1977) y comercializada por Sigma.

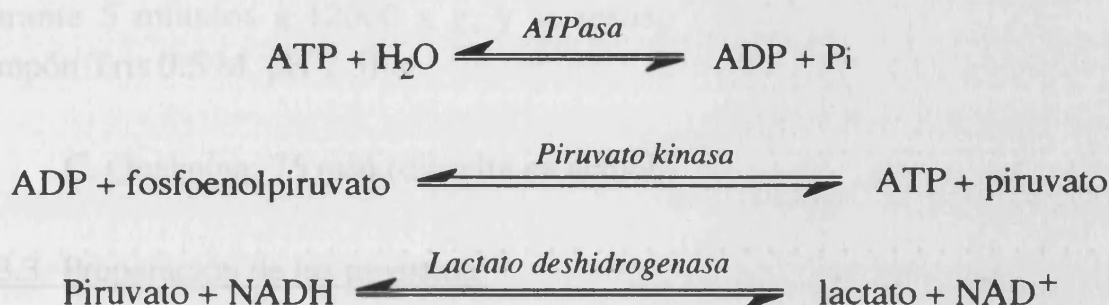
El fundamento del procedimiento es el mismo que el anterior, pero las muestras, antes de añadir el reactivo de Lowry, se trataron primero con deoxicolato, para conseguir una solución homogénea, y después se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético. El precipitado se resuspendió en el reactivo de Lowry, continuándose el proceso como el método habitual.

4.3. Determinación de la actividad Na⁺/K⁺ adenosintrifosfatasa.

4.3.1. Fundamento teórico.

La determinación de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa se realizó por el procedimiento descrito por Penefsky y Bruist (1984).

Se trata de un procedimiento enzimático de reacciones acopladas, cuyo esquema es el siguiente:



El método se basa en la formación de ADP por la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa a partir de ATP. El ADP formado es fosforilado de nuevo por una piruvato kinasa con el fosfato cedido por el fosfoenolpiruvato, que pasa a piruvato. Por último, éste es reducido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa, consumiendo una molécula de NADH. La desaparición del NADH del sistema se monitorizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm.

4.3.2. Soluciones.

A. Medio de homogenización: Tomado de Bianchi *et al.* (1988).

Tampón Tris 10 mM, pH 7.5, conteniendo:

0.25 M sacarosa

1.25 mM EGTA

B. Reactivos:

1. Tampón Tris, 1 M, pH 7.5
2. Sulfato de magnesio (MgSO₄), 0.1 M
3. Fosfoenolpiruvato, 0.1 M
4. NADH, 2 mM
5. ATP, 0.2 M
6. Piruvato kinasa, 160 kU/l (se toman 150 μ l, se centrifugan durante 5 minutos a 12000 x g, y se resuspende el precipitado en 3 ml de tampón Tris 1 M, pH 7.5)
7. Lactato deshidrogenasa, 62 kU/l (se toman 100 μ l, se centrifugan durante 5 minutos a 12000 x g, y se resuspende el precipitado en 3 ml de tampón Tris 0.5 M, pH 7.5)

C. Quabaína: 75 mM (disuelta en etanol)

4.3.3. Preparación de las muestras.

4.3.3.1. Preparación de nervios ciáticos.

Tras la extracción de ambos nervios ciáticos, como se indica en el apartado 3.2. de este capítulo de Materiales y Métodos, se mezclaron con el medio de homogenización descrito en el apartado anterior, previamente enfriado, en una proporción de 20 μ l de medio por cada mg de peso de nervio ciático y se homogenizaron con un homogenizador Potter de teflón de 1 ml de volumen, a 800 r.p.m., ocho veces.

Las muestras ya homogenizadas se conservaron un máximo de tres días a una temperatura de -80°C, tiempo en el cual la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa no presenta disminución apreciable en las muestras ya homogenizadas.

4.3.3.2. Preparación de cerebros.

Siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.* (1986), tras la extracción del

cerebro por el procedimiento descrito en el apartado 3.3. de este capítulo de Materiales y Métodos, se pesaron y homogenizaron en una proporción 1:10 (peso/volumen) a 800 r.p.m., ocho veces, en un medio previamente enfriado a 4°C que contiene:

Tampón Tris 40 mM, pH 7.5
MgCl₂ 10 mM
EDTA 10 mM.

Se centrifugaron durante 30 minutos a 100.000 x g, 4°C. El precipitado se resuspendió en el medio de homogenización descrito en el apartado anterior.

4.3.4. Procedimiento.

Se preparó un cocktail que contenía:

9.0 ml Tampón Tris
7.2 ml Sulfato de magnesio
3.6 ml Fosfoenolpiruvato
4.3 ml NADH
1.8 ml ATP
2.9 ml Piruvato kinasa
2.9 ml Lactato deshidrogenasa.

Tras mezclarlo bien, se separaron 15 ml y se les añadieron 3 ml de ouabaína y a otros 15 ml se les añadieron 3 ml de etanol.

En una microcubeta de 1.5 ml se añadieron 220 µl del cocktail con ouabaína y en otra 220 µl del cocktail sin ouabaína. Se completaron ambas con agua destilada para que, con la adición de la muestra, contuvieran 1000 µl cada una.

Las concentraciones finales en la microcubeta fueron:

50 mM Tampón Tris
5 mM Sulfato de magnesio

2.5 mM Fosfoenolpiruvato
50 μ M NADH
2.5 mM ATP
0.2 U Piruvato kinasa
0.2 U Lactato deshidrogenasa
3 mM Ouabaína (en las microcubetas que la contuvieran)

Tras alcanzar el equilibrio térmico (30°C) se añadió la muestra, siempre 10 μ g de proteína, que contenía la enzima.

Después de 1 minuto se midió la absorbancia durante 10 ó 15 minutos a una longitud de onda de 340 nm, a una temperatura de 30°C y en una microcubeta con un paso de luz de 1 cm. Se midieron ambas microcubetas a la vez en un espectrofotómetro con intercambiador automático de cuatro cubetas para poder calcular posteriormente la diferencia entre la actividad ATPasa total (medida con la microcubeta que contiene el cocktail con etanol) y la actividad ATPasa no inhibida con ouabaína (medida con la microcubeta que contiene el cocktail con ouabaína). Esta diferencia corresponde a la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa.

El coeficiente de extinción molar para el NADH en estas condiciones es $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Debido a la escasa diferencia entre la ATPasa total y la que no es inhibida con ouabaína, cada muestra se midió 5 veces. La actividad enzimática se expresa en nmol de ATP transformados a ADP por mg de proteína y por hora (nmol/mg prot x h).

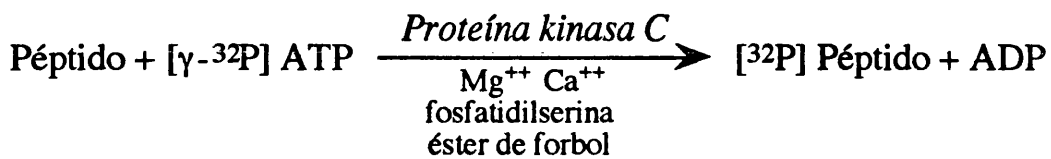
4.4. Determinación de actividad proteína kinasa C.

4.4.1. Fundamento teórico.

La determinación de la actividad PKC en nervio ciático se realizó

siguiendo el método descrito por Hannun *et al.* (1985).

Se trata de un procedimiento en el cual la actividad PKC se mide a partir de la cantidad de ^{32}P que, procedente de ATP marcado con este isótopo y por acción de la proteína kinasa C, se fija a un péptido sustrato específico, según el esquema siguiente:



4.4.2. Soluciones.

A. Medio de homogenización:

Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, que contenía:

- EGTA 0.5 mM
- EDTA 0.5 mM
- β -mercaptoetanol 10 mM
- PMSF 2 mM
- leupeptina 0.4 mM

B. Medio para resuspender la fracción de membranas celulares: Medio de composición idéntica al anterior pero que contenía un 1% de Tritón X-100.

C. Reactivos:

1. Solución de acetato cálcico 12 mM en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, que contenía azida sódica 0.05%.

2. Solución de L- α -fosfatidil-L-serina 900 $\mu\text{g/ml}$ y forbol 12-miristato 13-acetato 24 $\mu\text{g/ml}$, en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 que contenía azida sódica 0.05%.

3. Solución 300 μM de péptido específico en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 que contenía azida sódica 0.05%.

4. Solución de 30 mM de ditiotreitól en tampón Tris-HCl 50 mM,

pH 7.5 que contenía azida sódica 0.05%.

5. Solución 150 μM de ATP y 45 mM de acetato de magnesio en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 que contenía azida sódica 0.05%.

6. Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 que contenía EGTA 6 mM.

El péptido utilizado, comercializado por Amersham, se caracteriza por ser específico para la PKC y ser desfosforilado por fosfatasas.

D. Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 150 mM.

4.4.3. Preparación de las muestras.

Tras la extracción de ambos nervios ciáticos por el procedimiento descrito en el apartado 3.2. de este capítulo de Materiales y Métodos, se procedió a su homogenización en 60 μl del medio de homogenización por cada mg de peso de ambos nervios ciáticos. Una parte alícuota de este homogenado (150 μl) se conservó en hielo para la determinación de la actividad PKC en homogenado fresco y para la determinación de proteínas en el mismo.

El resto del homogenado se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 100.000 x g. Se recogió el sobrenadante de esta centrifugación (fracción citosólica) y se conservó en hielo para la determinación de la actividad PKC en citosol y para la determinación de la concentración de proteínas en el mismo.

El precipitado se resuspendió, con la ayuda de un émbolo de homogenización, en 200 μl del medio, para resuspender la fracción de membranas celulares. Para obtener una completa resuspensión se procedió a su agitación con ayuda de un imán magnético durante 20 minutos a 4°C. Una vez resuspendidos completamente, se añadieron 1800 μl del medio de homogenización, con el fin de que la concentración de Tritón X-100 fuera del 0.1%.

Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 100.000 x g. El

sobrenadante de esta segunda centrifugación, que contiene la enzima PKC unida a membrana, se recogió y guardó en hielo hasta la determinación de la actividad PKC de la membrana del nervio ciático y también para la determinación de su contenido en proteínas. Esta determinación, debido a la presencia de Tritón X-100, se realizó por el procedimiento de Lowry modificado (apartado 4.2.4. de Materiales y Métodos).

4.4.4. Procedimiento.

Una vez preparadas las muestras, y antes de comenzar el ensayo, se prepararon dos mezclas con los reactivos, de tal manera que la mezcla 1 contuviera los activadores de la PKC y la mezcla 2 no:

- Mezcla 1: partes iguales de los reactivos 1, 2, 3 y 4.
- Mezcla 2: partes iguales de los reactivos 3 y 4 y el doble del 6.

Al reactivo 5 se añadieron, inmediatamente antes de comenzar el experimento, 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

El experimento se inició pipeteando 13 μl de la mezcla 1. A continuación se añadieron 13 μl de muestra. La reacción se desencadenó añadiendo 13 μl del reactivo 5 marcado radiactivamente.

La mezcla de incubación contenía, en un volúmen final de 69 μl :

- 50 mM Tampón Tris-HCl, pH 7.5.
- 1 mM acetato de calcio
- 75 $\mu\text{g/ml}$ fosfatidilserina
- 2 $\mu\text{g/ml}$ forbol 12-miristato 13-acetato
- 25 μM péptido substrato
- 2.5 mM ditiotreitól
- 15 mM acetato de magnesio
- 50 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0.25 $\mu\text{Ci/tubo}$)

Los blancos de cada muestra se realizaron por el mismo procedimiento

pero sin añadir calcio ni fosfatidilserina (mezcla 2).

Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de ácido ortofosfórico 150 mM a cada uno de los tubos.

A continuación se tomaron 125 μ l de la mezcla y se pipetearon en cuadrados de 2 cm de lado de papel P81 Whatman. El papel se sumergió en una solución de ácido ortofosfórico 75 mM con el fin de lavar la radiactividad no retenida en el papel.

Después de lavar, se colocaron los papeles de filtro en viales con líquido de centelleo y se procedió al recuento de la radiactividad retenida en el filtro (radiactividad incorporada en el péptido).

Los cálculos se realizaron por la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{nmol ATP estándar}}{\text{cpm estándar}} \times \frac{\text{cpm muestra}}{\text{volumen muestra}} \times \frac{1}{\text{tiempo}} \times \frac{1}{\text{proteína}}$$

en la que:

- nmol ATP estándar representa los nmol de ATP en cada uno de los tubos estándar

- cpm estándar representa las cuentas por minuto obtenidas al contar la radiactividad del estándar

- cpm muestra representa la diferencia entre las cuentas por minuto obtenidas en cada una de las muestras menos las cuentas por minuto de sus respectivos blancos

- volumen muestra representa el volumen de muestra (ml) utilizado en el ensayo

- tiempo representa el tiempo en minutos (15) que se mantuvo la incubación

- proteína representa la concentración de proteína (mg/ml) en cada una de las muestras.

La actividad enzimática de la PKC se expresa como nmol de ^{32}P incorporados en el péptido por mg de proteína y por minuto.

4.5. Determinación de la concentración de glutatión.

4.5.1. Fundamento teórico.

La determinación de la concentración de GSH se realizó por el procedimiento descrito por Brigelius *et al.* (1983), en el cual se monitoriza la formación, catalizada por la actividad GSH S-transferasa, de GS-DNP (S-2,4-dinitrofenil-glutatión) a partir de CDNB y de la cantidad de GSH presente en la muestra, según el esquema siguiente:



4.5.2. Soluciones.

- A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0
- B. CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenceno) 10 mM, disuelto en etanol
- C. GSH S-transferasa 500 UI/ml.

La enzima GSH S-transferasa se preparó disolviendo 5 mg de la solución comercial proporcionada por la compañía Sigma (≈ 80 unidades/mg) en 800 μl de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, dializándose después durante 6 horas con cambios de tampón cada 2 horas.

4.5.3. Preparación de las muestras.

Tras la extracción de los nervios ciáticos de dos ratones, como se indica

en el apartado 3.2. de este capítulo de Materiales y Métodos, se homogenizaron de forma agrupada en 650 μl de tampón fosfato potásico 0.2 M, pH 7.0, previamente enfriado, con un homogenizador Potter de teflón de 1 ml de volumen, a 800 r.p.m., ocho veces.

Inmediatamente después, se acidificaron 360 μl del homogenado con 40 μl de ácido perclórico al 20%. Se centrifugó a 12000 x g, se recogió el sobrenadante, que contiene el GSH, y se conservaron a -20°C hasta la determinación de la concentración de GSH. El resto del homogenado se conservó para la determinación de proteínas.

4.5.4. Procedimiento.

Para la determinación de la concentración de GSH se pipetearon de forma sucesiva en una microcubeta:

- 600 μl del tampón fosfato potásico
- 10 μl de la solución de CDNB
- 350 μl de muestra neutralizada.

El sobrenadante acidificado se neutralizó inmediatamente antes de ser añadido a la microcubeta del ensayo con una solución de K_2HPO_4 al 40%. La cantidad necesaria para la neutralización, comprobada en cada muestra con papel indicador de pH, fue aproximadamente un 25% del volumen de sobrenadante ácido. Se centrifugó durante unos segundos con el fin de que precipitase la sal formada y se tomó la cantidad señalada del sobrenadante.

Tras el registro de la absorbancia en la microcubeta de 1 cm de paso de luz, termostatizada a 30°C con el fin de acelerar la reacción y a una longitud de onda de 340 nm, la reacción se desencadenó con la adición de 10 μl de la solución dializada de GSH S-transferasa.

Se registró la reacción en las mismas condiciones señaladas en el párrafo anterior hasta que todo el GSH había reaccionado con el CDNB.

La concentración de GSH presente en la microcubeta se calculó por la diferencia entre la absorbancia antes y después de añadir la enzima. El coeficiente de extinción molar para el compuesto formado (GS-DNP) en estas condiciones es de $\epsilon_{340\text{nm}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

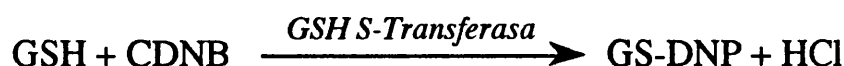
Los valores de la concentración de GSH se expresan en nmol de GSH por mg de proteína, realizándose al menos dos determinaciones de cada muestra.

4.6. Determinación de la actividad glutatión S-transferasa.

4.6.1. Fundamento teórico.

La determinación de la actividad glutatión S-transferasa (GST; E.C. 2.5.1.18) se realizó por el método descrito por Habig *et al.* (1974) frente a 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) como sustrato.

La glutatión S-transferasa cataliza la formación de GS-DNP (S-2,4-dinitrofenil-glutatión) a partir de GSH y CDNB, de acuerdo con el esquema siguiente:



El compuesto aromático formado (GS-DNP) se monitorizó espectrofotométricamente.

4.6.2. Soluciones.

- A. Tampón fosfato sódico 0.2 M, pH 6.5.
- B. GSH 20 mM.
- C. CDNB 20 mM, disuelto en etanol.

4.6.3. Preparación de las muestras.

Los nervios ciáticos de tres ratones, extraídos como se indica en el apartado 3.2. de este capítulo de Materiales y Métodos, se agruparon según su glucemia y se homogenizaron de forma conjunta en 1 ml de tampón fosfato potásico 0.2 M, pH 7.0, previamente enfriado, con un homogenizador Potter de teflón de 1 ml de volúmen, a 800 r.p.m., ocho veces.

La determinación de la actividad glutatión S-transferasa se realizó en la fracción citosólica de los nervios ciáticos. Para prepararla, el homogenado obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta primera centrifugación fue de nuevo centrifugado a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante de esta segunda centrifugación constituye la fracción citosólica del nervio ciático.

4.6.4. Procedimiento.

Para la determinación de la actividad glutatión S-transferasa se pipetearon de forma sucesiva en la microcubeta:

- 500 μ l de tampón fosfato sódico 0.2 M, pH 6.5
- 50 μ l de la solución de GSH
- 50 μ l de la solución de CDNB
- 375 μ l de agua bidestilada
- 25 μ l de la fracción citosólica de la muestra.

La reacción se produjo en una microcubeta de 1 cm de paso de luz y a una temperatura de 30°C. La formación del compuesto GS-DNP se monitorizó espectrofotométricamente durante 3 minutos a la longitud de onda a la que absorbe este compuesto, 340 nm.

El coeficiente de extinción molar para el GS-DNP en estas condiciones es de $\epsilon_{340\text{nm}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Los valores se expresan como nmol de GSH combinados con CDNB por minuto y por mg de proteína.

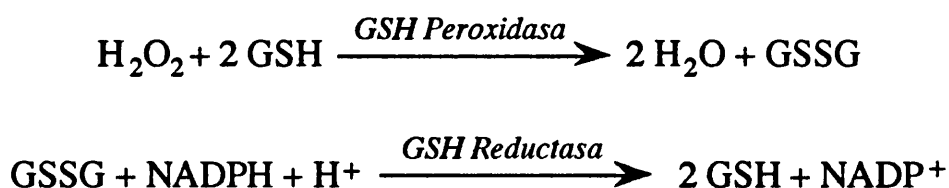
4.7. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa.

4.7.1. Fundamento teórico.

La determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GSHPx; E.C. 1.1.1.1.9.) se realizó por el método descrito por Lawrence *et al.* (1978) frente a dos peróxidos diferentes: peróxido de hidrógeno y *tert*-butil hidroperóxido.

4.7.1.1. Frente a peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

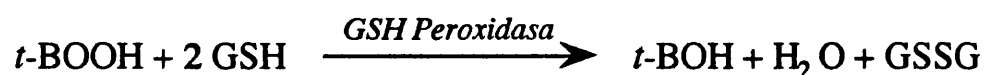
Se trata de un procedimiento de reacciones acopladas cuyo esquema es el siguiente:



El método descrito se basa en la formación de GSSG a partir de GSH y H₂O₂, reacción catalizada por la actividad GSHPx. El GSSG es reducido de forma continua por un exceso de actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio, proporcionando un nivel constante de GSH. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición es monitorizada espectrofotométricamente.

4.7.1.1. Frente a *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH).

Se trata del mismo procedimiento que para el ensayo con H₂O₂, pero en este caso el esquema de reacciones acopladas es el siguiente:



4.7.2. Soluciones.

A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contenía:

- EDTA 1 mM

- Azida sódica 1 mM

B. Glutación reductasa 2.4 U/ml

C. GSH 10 mM

C. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ al 0.1%

D. *t*-BOOH 12 mM

E. H₂O₂ 1.5 mM

4.7.3. Preparación de las muestras.

La preparación de las muestras para la determinación de la actividad glutación peroxidasa fue la misma que la necesaria para la determinación de la actividad glutación S-transferasa (apartado 4.6.3. de este capítulo de Materiales y Métodos).

4.7.4. Procedimiento.

Para la determinación de la actividad glutación peroxidasa se pipetearon de forma sucesiva en una microcubeta:

- 500 μ l de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0

- 25 μ l del citosol preparado

- 75 μ l de agua bidestilada

- 100 μ l de la solución de glutación reductasa

- 100 μ l de la solución de GSH

Esta mezcla se preincubó durante 5 minutos a 37°C.

Se añadieron 100 μl de la solución de NADPH y se monitorizó durante 3 minutos el consumo de NADPH que no depende de los hidroperóxidos.

La reacción total se desencadenó con la adición de 100 μl de la solución de hidroperóxido precalentada. Se registró la disminución de la absorbancia, debida al consumo del NADPH, a 340 nm en la microcubeta durante 5 minutos a 37°C.

El cálculo se realizó por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición del hidroperóxido.

El coeficiente de extinción molar para el NADPH en estas condiciones es de $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

5. Administración de inhibidores de proteína kinasa C.

En la realización del presente trabajo se utilizaron dos inhibidores de proteína kinasa C: el H7 (1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina) y el calfostin C. Ambos se administraron de forma aguda y de forma continua o crónica.

5.1. Administración aguda.

5.1.1. H7.

Para su administración de forma aguda, el H7 se disolvió inicialmente a razón de 100 mg/ml de DMSO. Tras su perfecta disolución con ayuda de agitación magnética, se realizó una segunda dilución en 9 volúmenes de agua

bidestilada, de manera que la concentración final de H7 en la solución fue de 10 mg/ml.

La administración de H7 se realizó intraperitonealmente a partir de la solución antes citada de 10 mg/ml.

5.1.2. Calfostin C.

El calfofostin C se disolvió, a razón de 1 mg/ml, en DMSO. Tras su disolución, se realizó una segunda dilución con agua bidestilada a una concentración de 10 μ g/ml. A partir de esta solución, a través de diluciones sucesivas con agua bidestilada, se prepararon las soluciones necesarias, teniendo en cuenta que el volumen inyectado a cada ratón fuera de 1-3 μ l/g.

La administración de calfofostin C de forma aguda se realizó, como la del H7, intraperitonealmente.

5.2. Administración continua.

5.2.1. H7.

La administración continua de H7 se realizó mediante las bombas microsmóticas Alzet[®], modelo 1003D. Se trata de unas bombas que se pueden implantar en animales de experimentación para la administración de sustancias de forma lenta, mantenida y continua.

Las bombas implantables constan de dos piezas ajustables entre sí. La primera de ellas es el reservorio del material a liberar y la segunda es el moderador de flujo, que está formado por la tapa del reservorio y un tubo a través del cual sale el contenido de la bomba.

El modelo 1003D, utilizado para la administración de H7, se caracteriza por liberar durante 72 horas un volumen de 1.00 ± 0.07 μ l/hora. El volumen que

pueden contener es de $90 \pm 4 \mu\text{l}$. Sus medidas externas son 1.7 cm de largo y 0.6 cm de diámetro.

Las bombas microosmóticas se rellenaron con una solución de 25 mg de H7 por 100 μl de DMSO al 50%. Esta solución es la más concentrada posible que se puede obtener a partir de los preparados comerciales, teniendo en cuenta que el interior de la bomba permite un máximo de un 50% de DMSO.

Una vez completamente llenas de la solución adecuada, se procedió a su implantación en los ratones. Para ello, los ratones fueron ligeramente anestesiados por vía inhalatoria con eter etílico. Se realizó a continuación una pequeña incisión en la piel de la espalda, por debajo de las escápulas, y con ayuda de unas pinzas se practicó un bolsillo subcutáneo. Se introdujo longitudinalmente la bomba, con el extremo de salida de líquido de la misma alejado de la incisión, y se procedió a la sutura de la incisión. De este modo, la bomba quedó situada a nivel interescapular y subcutáneamente, de modo que no era accesible al propio animal. La liberación del producto comienza unas 4 horas después del implante de la bomba.

5.2.2. Calfostin C.

La administración de calfostin C de forma lenta, mantenida y continua se realizó de un modo similar a la del H7. Sin embargo, debido al hecho de que podíamos conseguir soluciones muy concentradas de calfostin C, decidimos utilizar bombas algo mayores y que pudieran liberar producto durante más tiempo.

Las bombas utilizadas para la administración de calfostin C fueron las bombas miniosmóticas Alzet[®], modelo 2002. Estas bombas permiten liberar de forma continua, durante 14 días, un volumen de $0.50 \pm 0.02 \mu\text{l/hora}$. El volumen máximo que pueden contener es de 200 μl . Sus dimensiones externas son 3 cm de largo y 0.7 cm de diámetro.

Las bombas miniosmóticas se rellenaron de una solución de calfostin C de 50 ng/ μ l, en la que la proporción de DMSO era menor del 0.001%. Las bombas miniosmóticas se implantaron del mismo modo que las microosmóticas de H7.

6. Estudios electrofisiológicos.

Los estudios electrofisiológicos se realizaron por una modificación del método propuesto por Romá y Soria (1984). Éste fue adaptado para la determinación de la velocidad de conducción nerviosa en la cola del ratón, y se basa en el registro de potenciales de acción compuestos de la musculatura dorsal de la cola del ratón obtenidos por estimulación eléctrica del nervio caudal que la inerva.

6.1. Obtención de potenciales de acción musculares.

6.1.1. Fijación del animal.

Los ratones fueron inmovilizados mediante la inhalación de una dosis subhipnótica de dietil éter, lo cual facilita la manipulación del animal para la técnica de fijación y evita el estrés que podría generarse por la misma.

Una vez conseguida la hipotonía en el animal, se fijó a una plataforma diseñada para tal fin que consta de dos cuerpos que forman un ángulo de 110°. Las patas del animal se fijaron mediante cinta elástica a los laterales del cuerpo vertical, quedando el cuerpo del animal extendido sobre éste. La cola del ratón se fijó a lo largo del cuerpo horizontal de la plataforma mediante cintas, permitiendo el acceso a la misma para las determinaciones electrofisiológicas (figura 3).

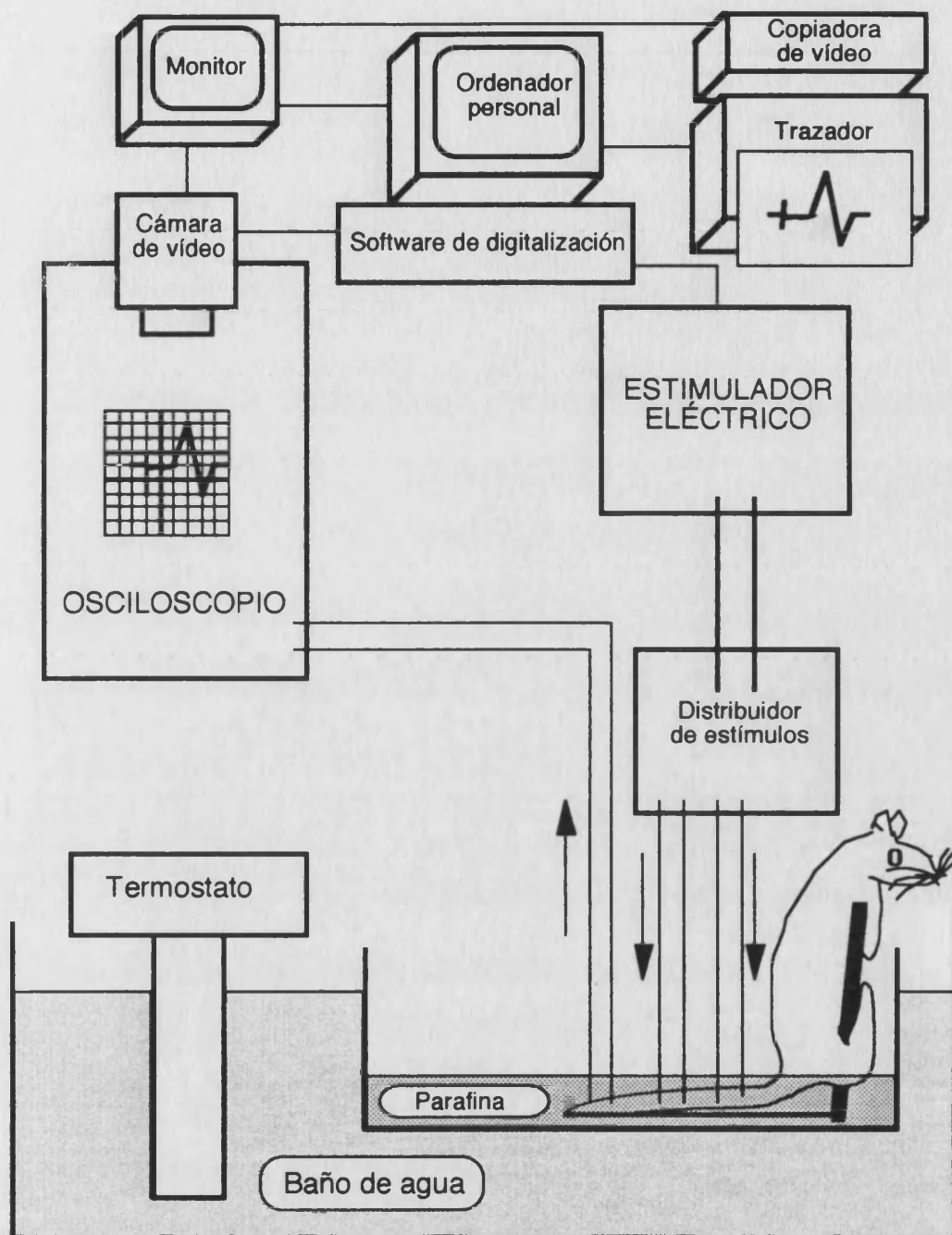


Figura 3. Esquema del montaje experimental utilizado para la obtención de los parámetros electrofisiológicos.

6.1.2. Inserción de los electrodos.

Los troncos dorsales del nervio caudal del ratón se estimularon mediante pulsos eléctricos adecuados, a través de dos pares de electrodos de aguja de acero puro, insertados en dos posiciones, proximal y distal, respecto de la base de la cola (ver figura 4). La posición extendida de la cola permitió utilizar siempre una misma distancia entre la aguja catódica de estos dos pares de electrodos (30 mm), por lo que el trayecto nervioso utilizado para el cálculo de la velocidad de conducción fue siempre de la misma longitud.

En una posición distal a los electrodos de estimulación (ver figura 4) se insertó el electrodo de registro (de las mismas características que los anteriores). Tras la observación de los potenciales de acción musculares obtenidos, si estos no resultaban adecuados, se desplazaba el punto de inserción del electrodo de registro en sentido proximal hasta la obtención de registros representativos.

6.1.3. Técnica electrofisiológica.

Mediante los electrodos de estimulación anteriormente descritos se aplicaron pulsos eléctricos rectangulares generados por un estimulador eléctrico de características apropiadas (ver figura 3). Los pulsos utilizados en este estudio fueron de una duración fija de 0.1 ms y de un voltaje un 20% superior al mínimo requerido para conseguir la máxima respuesta del potencial muscular compuesto (voltaje supramaximal). Este voltaje se calculó en cada experimento.

La despolarización inducida por la estimulación eléctrica en las fibras nerviosas (potencial de acción nervioso) se conduce a través de éstas hasta las sinapsis neuromusculares, determinando la liberación de acetilcolina y la generación de un potencial de acción muscular en cada una de las fibras musculares inervadas por las fibras nerviosas despolarizadas. La suma de estos potenciales de acción musculares es registrada por el electrodo de registro y, debidamente amplificada, se visualiza en la pantalla de un osciloscopio de rayos catódicos, originando la señal que definimos como potencial de acción muscular

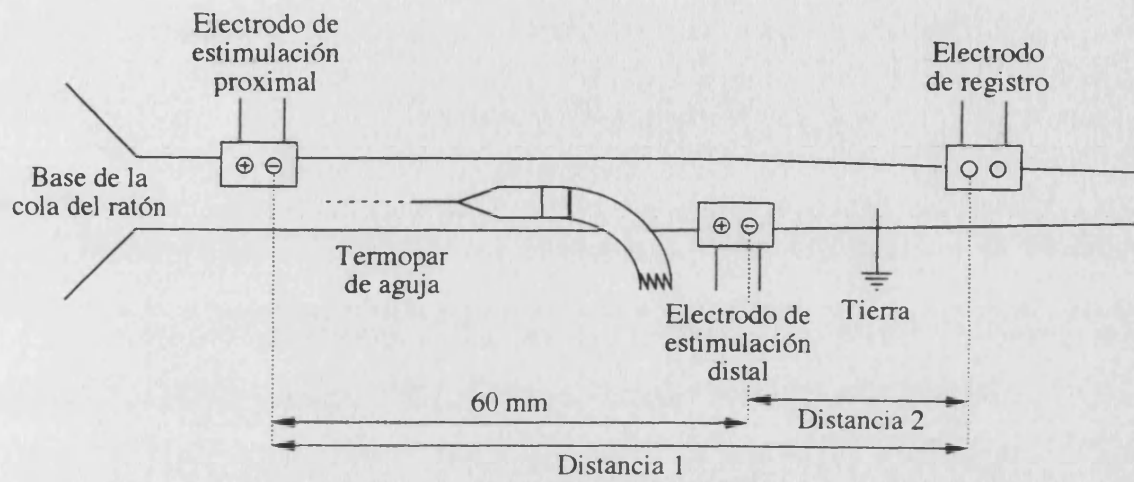


Figura 4: Esquema de la cola del ratón con detalle de los elementos electrofisiológicos utilizados.

compuesto.

Las señales visualizadas en la pantalla del osciloscopio fueron captadas por una cámara de vídeo, digitalizadas en un ordenador dotado de la tarjeta adecuada y almacenadas en soporte magnético para su posterior análisis. En la figura 5 se presenta un registro típico, en el que se miden los siguientes parámetros:

- latencia de aparición del potencial de acción, considerada como el intervalo de tiempo en milisegundos entre el artefacto de estímulo (momento en que se aplica éste) y el inicio de la deflexión negativa (despolarización de las fibras musculares inervadas por las fibras nerviosas más rápidas).

- amplitud del potencial de acción, que se mide como la altura máxima de la deflexión negativa respecto de la línea de base, en milivoltios.

- duración del potencial de acción, que es el intervalo de tiempo en milisegundos entre el inicio de la deflexión negativa y cuando ésta vuelve a cruzar la línea de base.

6.1.4. Técnica de termostatación.

Los parámetros electrofisiológicos objeto de estudio se modifican de manera importante por las variaciones de temperatura. Resulta pues obligado realizar este tipo de determinaciones manteniendo la preparación a una temperatura constante y conocida. Con este fin, se introdujo la cola del animal en una bañera de parafina líquida termostatación (ver figura 3). La parafina es el material idóneo, debido a su elevada termoestabilidad y a presentar una gran capacidad como aislante eléctrico.

Para conocer en todo momento la temperatura de la preparación, se insertó un termopar de aguja en el territorio contralateral al utilizado para las determinaciones electrofisiológicas, entre los dos electrodos de estimulación (ver figura 4). Este termopar se conectó a un termómetro electrónico de precisión.

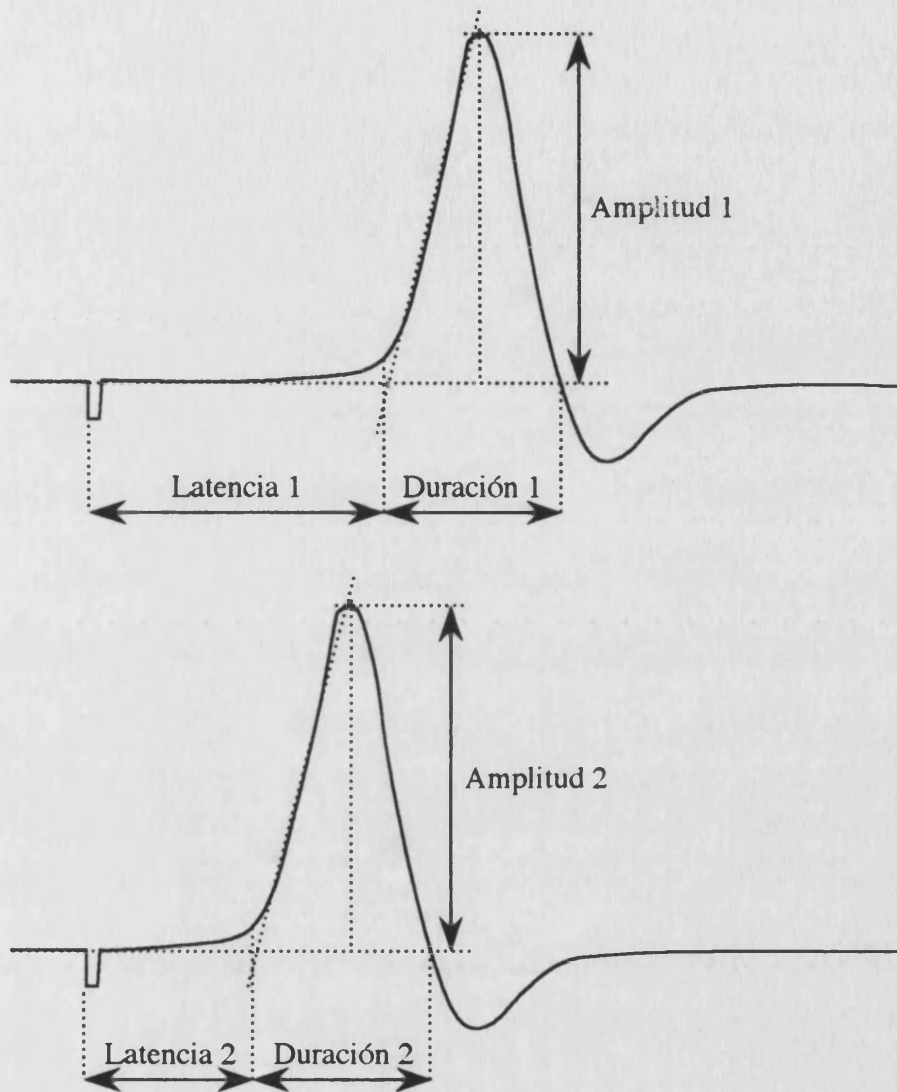


Figura 5: Potenciales de acción musculares típicos evocados por estimulación supramaximal. Ver detalles en el texto.

6.2. Cálculo de la velocidad de conducción nerviosa motora.

La velocidad de conducción nerviosa motora se calculó mediante el método indirecto de la diferencia de latencias. En la figura 5 se presenta un esquema de los elementos implicados en el cálculo de la velocidad de conducción nerviosa por dicho método. Puede observarse que la diferencia de latencias corresponde al tiempo que invierte el potencial de acción nervioso en recorrer el trayecto comprendido entre los cátodos de los dos electrodos de estimulación. Como ya se comentó, este trayecto es fácilmente determinable en superficie, y fue de 30 mm en todos los experimentos.

La velocidad de conducción de las fibras nerviosas más rápidas (velocidad de conducción nerviosa motora máxima) se calculó como el cociente entre el espacio entre los electrodos de estimulación y la diferencia de latencias.

7. Análisis estadístico.

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos se utilizaron los análisis que se presentan a continuación (Downie y Heath, 1977).

7.1. Estadística descriptiva.

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética. Esta se define como la suma de los datos dividida por el número de casos, según:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N} \quad \text{siendo: } \bar{X} = \text{media}$$

X = valor obtenido
N = número de casos

La medida de dispersión de los datos utilizada en el presente trabajo fue la desviación estándar, el estadístico de dispersión más fiable y que con más frecuencia se emplea. Se define como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

siendo: s = desviación estándar

X = valor obtenido

\bar{X} = media

N = número de casos

Los datos de este trabajo se expresan en forma de intervalo centrado en la media y con una desviación estándar (media \pm desviación estándar).

7.2. Test t de Student para contraste de diferencia de medias.

Para establecer la diferencia entre los valores de medias poblacionales, obtenidas en los diferentes grupos ensayados para la variable respuesta estudiada, se recurrió a un contraste de diferencia de medias, en el que se establece una hipótesis nula. Esta hipótesis consiste en la ausencia de diferencias entre las medias de las dos poblaciones para la variable respuesta estudiada. El contraste estadístico más adecuado para un número de datos menor de 30 es el test t de Student.

En el caso de que las dos poblaciones tengan la misma media para la variable estudiada, el cociente entre la diferencia de medias muestrales de las dos muestras extraídas de cada población y la desviación típica de esa diferencia se distribuye según una distribución t de Student, según la ecuación:

$$t_{gl} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{D\bar{X}}}$$

siendo: t = distribución t de Student

\bar{X}_1 y \bar{X}_2 = medias de los grupos

$s_{D\bar{X}}$ = error típico de la diferencia de medias

gl = grados de libertad = $N_1 + N_2 - 2$

N_1 = n° casos de la muestra 1

N_2 = n° casos de la muestra 2

Debido a que las comparaciones realizadas en este trabajo se refieren a poblaciones distintas, el tipo de test t de Student utilizado es el de datos no apareados. Se ha utilizado el contraste de dos colas o bilateral, ya que se pretendía establecer la diferencia entre las medias de las diferentes poblaciones, sin presuponer la dirección de esta diferencia. El intervalo de confianza para dicha diferencia de medias poblacionales se calculó mediante la aplicación estadística StatWorks™, versión 1.1.

7.3. Análisis de varianza (ANOVA).

El test de la t de Student, comentado anteriormente, es una herramienta potente para establecer la diferencia entre las medias de dos poblaciones. Sin embargo, en el presente trabajo surgió en la mayor parte de las ocasiones la necesidad de comparar más de dos poblaciones y por tanto, el inconveniente del elevado número de comparaciones a realizar.

Para obviar esto, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA con un sólo factor), que contrasta simultáneamente todos los casos y contrasta una hipótesis nula general que consiste en afirmar que no existe diferencia alguna entre las medias de la variable respuesta estudiada en las diferentes poblaciones a estudiar. En el caso de que la hipótesis nula fuera cierta, la varianza inter e intragrupos sería la misma. Es posible contrastar la diferencia de las dos varianzas mediante el contraste de la F de Snedecor, calculado como:

$$F = \frac{S_E^2}{S_D^2} \quad \text{donde: } S_E^2 = \text{variación entre grupos}$$

$$S_D^2 = \text{variación intragrupos}$$

$$S_E^2 = \frac{\sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{I - 1} \quad x_{ij} = \text{valor obtenido}$$

$$S_D^2 = \frac{\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2}{I(J - 1)} \quad \bar{x}_i = \text{media de los valores obtenidos en el grupo } i$$

$$I = \text{número de grupos}$$

$$J = \text{número de repeticiones de un grupo}$$

$$\bar{x} = \text{media de todos los valores}$$

$$i = 1 - I$$

$$j = 1 - J$$

Para realizar este análisis se utilizó la aplicación estadística StatWorks™, versión 1.1.

En los casos en los que se descartó la hipótesis nula mediante este contraste, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó por el test *t* de Student.

7.4. Otros análisis.

Cuando se pretende valorar la posible la dependencia lineal de dos variables entre sí, pueden utilizarse diversas técnicas de inferencia estadística, como la regresión lineal simple, el coeficiente de correlación *r* de Pearson, el test de paralelismo y el análisis de covarianza (ANCOVA).

La regresión lineal simple permite establecer la relación que existe entre los valores de la variable dependiente en función de los obtenidos para la variable independiente, según la ecuación de una recta: $y = a + bx$. El cálculo de los coeficientes *a* y *b* se realiza según las fórmulas siguientes:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} \quad \text{donde: } x, y = \text{valores obtenidos}$$

$\bar{x}, \bar{y} = \text{media de los valores obtenidos}$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

El coeficiente *r* de Pearson mide el grado de relación lineal entre dos variables. Su valor oscila entre -1 y +1 y expresa tanto la cuantía de la relación como el sentido de ésta. Este coeficiente se calcula según:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad \text{siendo: } r = \text{coeficiente de correlación de Pearson}$$

$x, y = \text{valor obtenido}$
 $\bar{x}, \bar{y} = \text{media de los valores obtenidos}$

La comparación entre ecuaciones de regresión lineal puede realizarse mediante diversos métodos estadísticos, entre los que hemos elegido la aplicación secuencial de un test de paralelismo y un ANCOVA.

El test de paralelismo utilizado contrasta la hipótesis nula de no paralelismo de las rectas comparadas (diferencia de pendientes), mediante un estadístico que sigue una distribución F de Snedecor. Este análisis se realizó mediante la aplicación estadística Pharm/PCS, versión 4.

La comparación de la posición de dos o más rectas (valor de la ordenada en el origen), sean o no paralelas, se realizó mediante un ANCOVA, que contrasta la hipótesis nula de que este valor no sea diferente para las rectas comparadas. El estadístico obtenido sigue una distribución F de Snedecor. Este análisis se realizó mediante la aplicación estadística MYSTAT, versión 1.1.

IV. RESULTADOS

1. Modelo experimental.

El modelo animal elegido para la realización de este trabajo, tal y como se adelantaba en el apartado 3 de la Introducción, es la diabetes inducida por la administración de aloxana o de estreptozotocina en el ratón.

En la figura 6 se presenta el efecto de 3 dosis diferentes de estreptozotocina sobre los valores de glucemia. Se inyectaron intraperitonealmente grupos de 4 a 6 ratones con dosis únicas de 70, 105 y 140 mg/Kg de estreptozotocina y se determinó el valor de la glucemia en diferentes días. El grupo control fue inyectado intraperitonealmente con volúmenes equivalentes del solvente de la estreptozotocina, tampón citrato fosfato 10 mM, pH 4.5.

Las dosis menores de estreptozotocina (70 y 105 mg/Kg) no produjeron ningún efecto sobre la glucemia cuando se compara con la que presentaba el grupo control. La inyección de 140 mg/Kg de estreptozotocina, que produjo un aumento sostenido de la glucemia desde el momento de la inyección, mató a los ratones a los 7 días.

En la figura 7 se presenta el efecto de la inyección de aloxana sobre los valores de glucemia. Se inyectaron subcutáneamente dos grupos de ratones con una dosis única de aloxana de 100 y 200 mg/Kg. El grupo control fue inyectado subcutáneamente con volúmenes equivalentes del solvente de la aloxana, tampón citrato fosfato 10 mM, pH 4.5. Esta figura pone de manifiesto que la inyección de aloxana a una dosis de 100 mg/Kg no produjo ningún efecto sobre la glucemia cuando se comparan los resultados con los obtenidos para el grupo control. Por el contrario, la administración de una dosis de aloxana de 200 mg/Kg provocó un gran aumento de los valores de glucemia, que fue significativo desde el primer día, comparado con el grupo control. La glucemia del grupo tratado con 200 mg/Kg de aloxana presentó una fase de meseta o

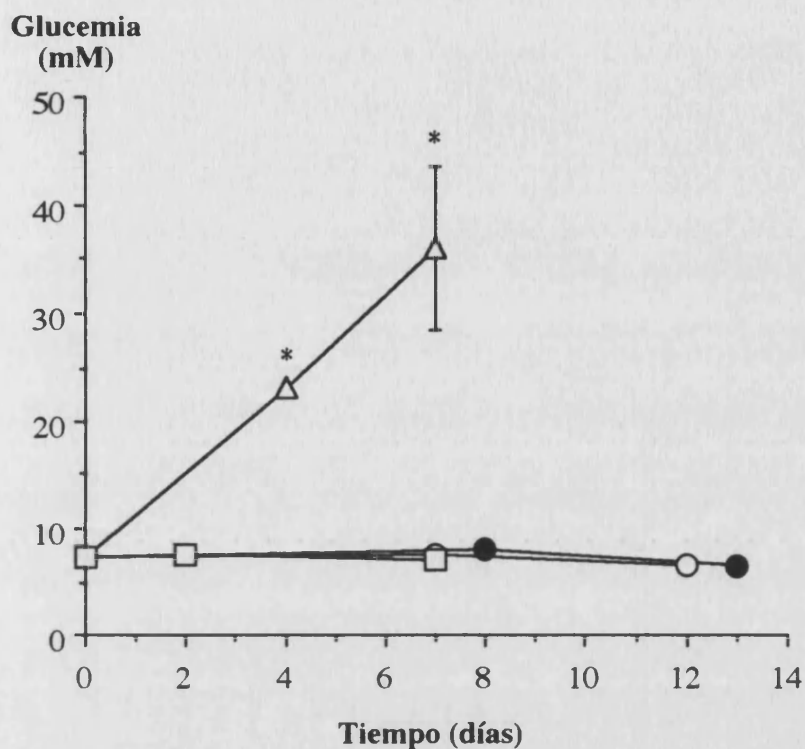


Figura 6: Efecto de diferentes dosis de estreptozotocina sobre los niveles de glucemia. Grupos de 4 a 6 ratones fueron inyectados intraperitonealmente con estreptozotocina a las dosis de 70 mg/Kg (○), 105 mg/Kg (□) y 140 mg/Kg (Δ) y con el solvente de la estreptozotocina el grupo control (●). La glucemia fue medida como se indica en Material y Métodos en los tiempos indicados. Los resultados son media \pm desviación estándar (barras).

* $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

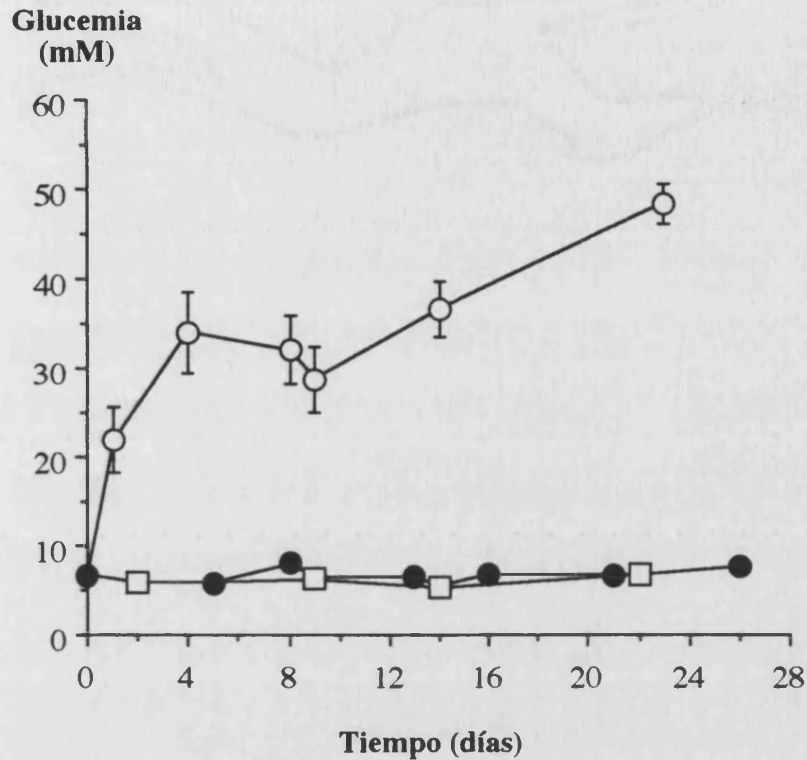


Figura 7: Efecto del tratamiento con diferentes dosis de aloxana sobre los niveles de glucemia. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con 100 mg/Kg (□) y 200 mg/Kg (○) de aloxana. El grupo control (●) fue inyectado el solvente de la aloxana. Los valores son media \pm desviación estándar (barras) de determinaciones por duplicado de 3 a 7 ratones por punto. Para el grupo tratado con 200 mg/Kg, el incremento de la glucemia fue estadísticamente significativo ($p < 0.001$) para todos los puntos comparado con el grupo control. $F(2, 98) = 359.37$, $p < 0.001$.

estabilización entre los días 4 y 16 aproximadamente, en la cual los valores de glucemia fueron unas 5 veces mayores que los del control, y que posteriormente aumentó de manera progresiva hasta provocar la muerte de los ratones.

En la figura 8 se muestra el efecto de la inyección única subcutánea de 200 mg/Kg de aloxana sobre el peso de los ratones. Se puede comprobar como, mientras el peso de los ratones del grupo control experimentó un aumento sostenido, el grupo de ratones diabéticos detuvo e incluso disminuyó su crecimiento ponderal, y sólo al cabo de 13 días se invirtió la tendencia a la pérdida de peso e iniciaron una lenta recuperación.

A partir de los resultados anteriores, se decidió utilizar la inyección única subcutánea de 200 mg/Kg de aloxana para la obtención de ratones diabéticos.

Los ratones se consideraron diabéticos cuando su glucemia era superior a 16 mM (≈ 300 mg/dl), siguiendo el criterio habitual que aparece en la bibliografía que se cita (Greene y Mackway, 1986; Kim *et al.*, 1991a).

Por lo tanto, todos los ratones diabéticos utilizados en el presente trabajo presentaban una glucemia superior a 16 mM en el momento de realizar el experimento. En la figura 22, como se indica adecuadamente, se incluyeron ratones que, habiendo sido inyectados con aloxana, no alcanzaron unos valores de glucemia superiores a dicho valor. A lo largo de todos los experimentos, el porcentaje de ratones inyectados con 200 mg/Kg de aloxana que desarrollaron diabetes, según los criterios establecidos, fue del 73%.

2. Efecto de la diabetes sobre la actividad adenosintrifosfatasa.

La actividad Na^+/K^+ ATPasa, como se expuso en el apartado 4.2.4. de la Introducción, es un buen parámetro para el estudio de la neuropatía diabética.

Con el fin de comprobar si la afectación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa

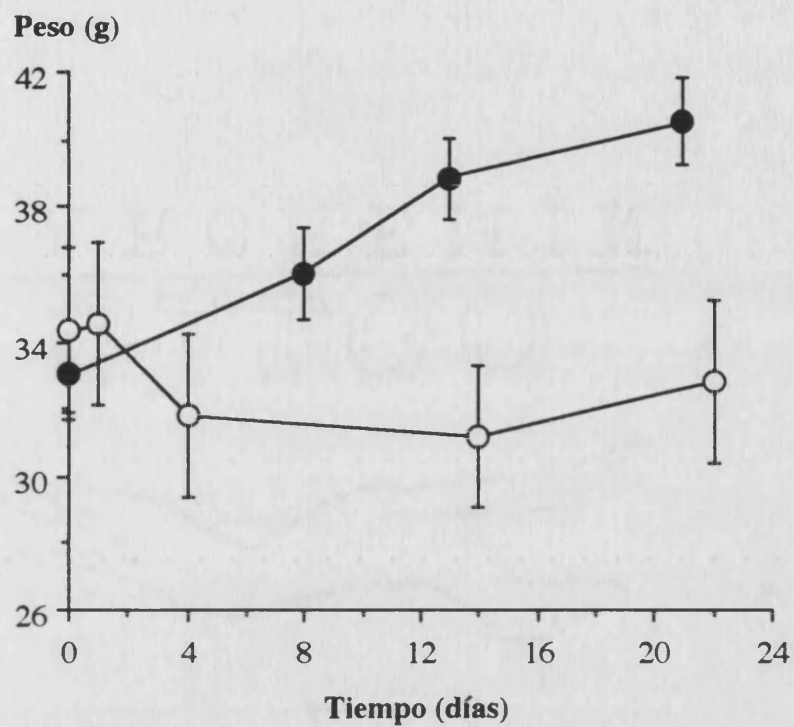


Figura 8: Efecto de la inyección de aloxana sobre el peso de los ratones. Dos grupos de seis ratones se inyectaron subcutáneamente con 200 mg/Kg de aloxana (○) y con el solvente de la aloxana (●) el grupo control. Se pesaron en los días señalados. Los valores están expresados como media \pm desviación estándar (barras) de los pesos individuales.

es un fenómeno propio del sistema nervioso periférico y no del sistema nervioso central, se determinó la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático y en cerebro de ratones control y diabéticos de una semana de evolución. En la tabla 1 se muestra que la actividad Na^+/K^+ ATPasa permaneció inalterada en cerebro mientras que disminuyó hasta un 33% de la actividad del grupo control en los ratones diabéticos.

En la tabla 2 se presenta la actividad ATPasa total, la ATPasa insensible a ouabaína y la Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de dos grupos de ratones, uno control y otro diabético. Como se desprende de los resultados, la Na^+/K^+ ATPasa representó alrededor de un 10% de la actividad ATPasa total y es la única que se afectó por la diabetes, demostrándose que su disminución es un fenómeno específico de esta adenosintrifosfatasa y no de otras, dado que no hubo diferencias en la actividad ATPasa total ni en la actividad ATPasa no inhibida por ouabaína una semana después de haber inducido la diabetes.

La disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático es un fenómeno que, en nuestro modelo experimental, se produce precozmente, de manera que a los tres días de haber inyectado la aloxana, la actividad del grupo diabético representaba un 56% de la actividad del grupo control, disminuyéndose progresivamente hasta alcanzar el mínimo a los diez días y mantenerse estabilizada en torno al 40% de la actividad del grupo control. Estos resultados, recogidos en la figura 9, permitieron realizar los experimentos a partir del cuarto o quinto día de evolución de la diabetes, ya que la actividad Na^+/K^+ ATPasa disminuye en tan breve plazo a la mitad de la actividad del grupo control.

Por último, es importante señalar que, el 100% de los ratones considerados diabéticos en la realización de este trabajo, presentaban disminuida su actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático a los 4 ó 5 días de evolución al menos al 70% de la actividad del grupo control.

TABLA 1

Comparación del efecto de la diabetes inducida por aloxana sobre la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en nervio ciático y en cerebro de ratón.

Grupo	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (nmol/mg prot x h)		Glucemia (mM)
	Ciáticos	Cerebro	
Control	456 ± 8	1183 ± 140	7.2 ± 0.2
Diabético	307 ± 15*	1344 ± 116	44.6 ± 2.2*

Se utilizaron dos grupos de 3 ratones. El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana. 7 días después fueron sacrificados y se midió la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en nervio ciático y en membranas de cerebro. Los datos son media ± desviación estándar.

* p < 0.001, comparado con los valores del grupo control.

TABLA 2

Efecto de la diabetes inducida por aloxana sobre la actividad adenosintrifosfatasa del nervio ciático de ratón.

Grupo	Actividad ATPasa (nmol/mg prot x h)			Glucemia (mM)
	ATPasa Total	ATPasa insensible a ouabaína	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	
Control	6089 ± 655	5444 ± 702	645 ± 80	7.6 ± 1.4
Diabético	5247 ± 561	4945 ± 550	302 ± 56*	24.5 ± 6.4*

Se utilizaron dos grupos de 5 ratones. El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana. 7 días después fueron sacrificados y se midió la glucemia y la actividad ATPasa total, la ATPasa insensible a ouabaína y la Na⁺/K⁺ ATPasa en nervio ciático. Los datos son media ± desviación estándar.

* p < 0.001, comparado con los valores del grupo control.

**Actividad $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$
(% del control)**

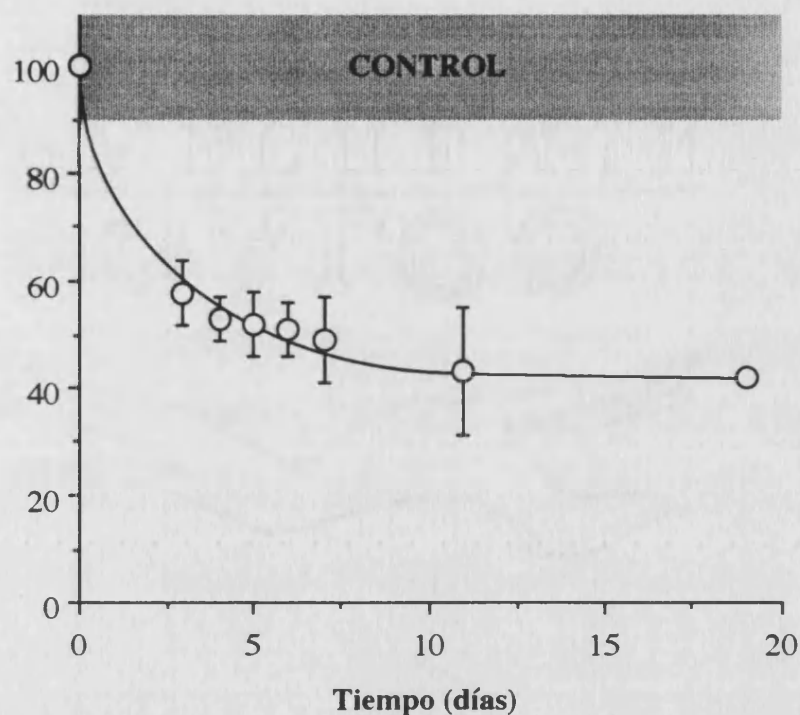


Figura 9: Evolución de la actividad $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ en nervio ciático tras la inyección de aloxana. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con 200 mg/Kg de aloxana. A los tiempos indicados, se midió la actividad $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ en los nervios ciáticos, por el procedimiento descrito en Material y Métodos. Los datos son la media \pm desviación estándar (barras) de grupos de 3 a 12 ratones. La disminución de la actividad $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ fue significativa ($p < 0.001$) para todos los puntos.

3. Efecto de los inhibidores de la proteína kinasa C sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

En los objetivos números 2 y 3 del presente trabajo se planteaba la utilización de los inhibidores de la PKC en animales con neuropatía diabética. Este tipo de experimentos presenta un doble interés: por un lado, contribuir a esclarecer el papel que la PKC, y concretamente su activación, desempeña en la fisiopatología de esta neuropatía, y por otro, estudiar el posible efecto beneficioso de su inhibición y la posible incorporación de los inhibidores de la PKC al tratamiento de estas lesiones.

A continuación se presentan los resultados obtenidos con la administración de dos inhibidores de la PKC, el H7 y el calfostin C, en el modelo experimental utilizado en este trabajo, y su efecto sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático, utilizada como índice de neuropatía diabética. Se presenta primero el efecto de la administración de forma aguda de H7, a continuación el de la de calfostin C y por último los resultados obtenidos con la administración de forma lenta y continua de ambos.

3.1. Efecto de la inyección aguda de H7.

Los primeros experimentos realizados con la administración de H7 se presentan en la tabla 3. Se puede observar que la administración de 30 mg/Kg de H7 a un grupo de ratones control no modificaba la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático.

La inyección intraperitoneal de 30 mg/Kg de H7, 15 minutos antes de la inyección de la aloxana, previno completamente la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

Con el fin de estudiar si la administración de H7 revierte, y no sólo previene, la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, se inyectó un grupo

TABLA 3

Efecto de la inyección de H7 en la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones control y diabéticos.

Grupo	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa		Glucemia
	nmol/mg prot x h	% control	mM
Control	637 ± 22	100	7.0 ± 1.4
Diabético	365 ± 25*	57	22.3 ± 3.3**
H7, 15' antes de la aloxana	572 ± 53	90	22.1 ± 2.5**
H7, 4 días después	582 ± 41	91	23.0 ± 3.7**
H7	608 ± 51	95	7.1 ± 0.3

Se utilizaron cinco grupos de 5 ratones. El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana. El tercer grupo fue inyectado con 30 mg/Kg de H7 15 minutos antes de la inyección de aloxana. Estos ratones fueron sacrificados 4 días más tarde. El cuarto grupo fue inyectado con 30 mg/Kg de H7 cuatro días después de la inyección de aloxana y sacrificado 15 minutos después. Un grupo control fue inyectado con 30 mg/Kg de H7 y sacrificado 15 minutos después. Los datos son media ± desviación estándar de la determinación por quintuplicado de cinco ratones por grupo.

F(4, 20) = 46.93, p < 0.001, para los valores de la Na⁺/K⁺ ATPasa.

F(4, 20) = 16.70, p < 0.001, para los valores de glucemia.

* p < 0.001, comparado con el resto de grupos.

** p < 0.001, comparado con los grupos control y control tratado con H7.

de ratones diabéticos de cuatro días de evolución y se les administró una dosis única de 30 mg/Kg de H7, intraperitonealmente, 15 minutos antes de ser sacrificados. Como se puede comprobar en la tabla 3, la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa puede considerarse completa, teniendo en cuenta la ausencia de efectos directos del H7 sobre esta actividad, como ya se ha comentado. La repetición de este experimento en animales de 5 días (figura 11 y tablas 4 y 6), así como en experimentos preliminares realizados a los 7 y 9 días de evolución produjo resultados similares.

Este efecto beneficioso del H7 es transitorio. En la figura 10, se puede observar que la actividad Na^+/K^+ ATPasa se recuperó completamente 15 minutos después de la administración de una dosis única intraperitoneal de 30 mg/Kg de H7 a un grupo de ratones diabéticos de cuatro días de evolución. Sin embargo, una hora después, la recuperación era tan sólo de la mitad de la actividad perdida, siendo todavía significativamente mayor la actividad del grupo tratado con H7 que la del grupo diabético. Cuatro horas después, no existía efecto de la administración del H7 sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratón diabético. El efecto del H7 en este modelo animal presenta, a la vista de los datos presentados, una duración media de aproximadamente 1 hora.

En la figura 11 se muestra el efecto de diferentes dosis de H7 sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de cuatro grupos de ratones diabéticos de cinco días de evolución. La administración de 30 y 15 mg/Kg de H7 produjo una recuperación prácticamente completa de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático 15 minutos después de ser inyectado. La administración de una dosis de 10 mg/Kg recuperó aproximadamente un 50% de la actividad perdida. La dosis de 5 mg/Kg no produjo ningún efecto sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Con los datos presentados, podemos establecer que la dosis que produce la mitad del efecto máximo (dosis eficaz 50; DE_{50}) en nuestro modelo experimental es de ≈ 10 mg/Kg.

**Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(nmol/mg prot x h)**

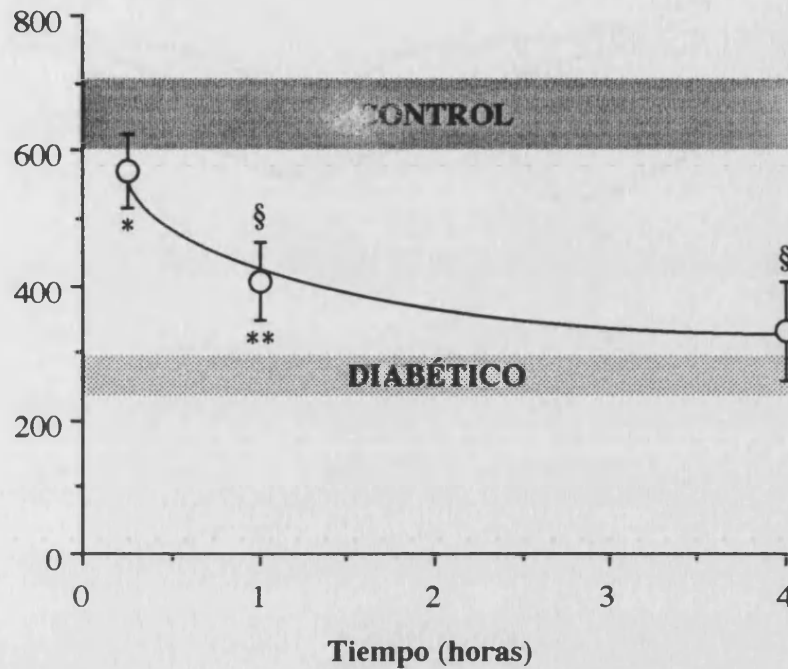


Figura 10: Evolución a lo largo del tiempo del efecto de la inyección de H7 en la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. Grupos de 4 ratones diabéticos de 4 días de evolución fueron inyectados intraperitonealmente con 30 mg/Kg de H7 y sacrificados en los tiempos indicados. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control (n=3) y del grupo diabético no tratado con H7 (n=3).

$F(4, 13) = 19.51, p < 0.001$.

* $p \leq 0.001$ y ** $p < 0.02$ comparado con el grupo diabético.

§ $p \leq 0.005$ comparado con el grupo control.

**Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(nmol/mg prot x h)**

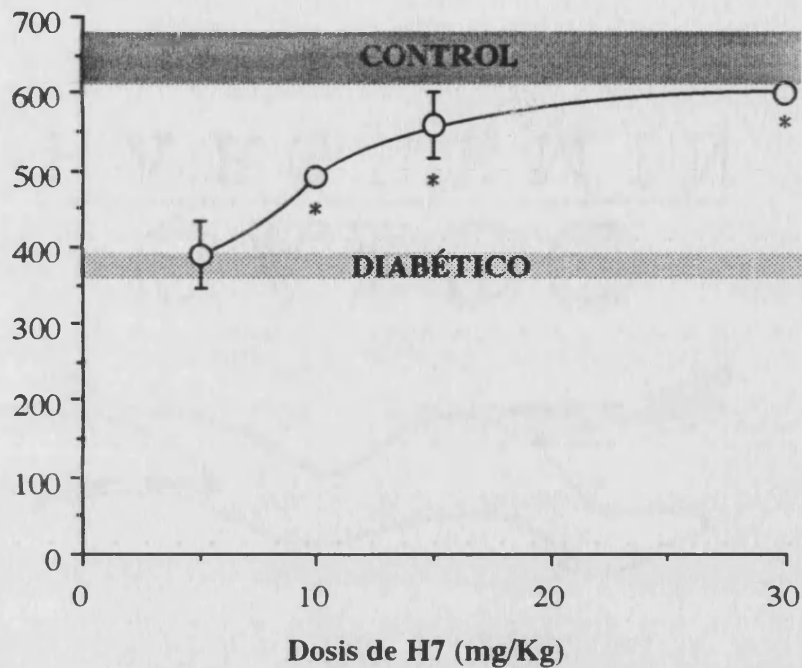


Figura 11: Efecto de diferentes dosis de H7 en la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de ratones diabéticos. Grupos de 3 ratones diabéticos de 5 días de evolución fueron inyectados con las dosis indicadas de H7 y sacrificados 15 minutos después. El área sombreada representa la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control (n=4) y del grupo diabético (n=5). Los valores son media \pm desviación estándar (barras).

$F(5, 15) = 58.00, p < 0.001$.

* $p < 0.001$ comparado con el grupo diabético.

Es importante hacer notar que, a las dosis de H7 utilizadas, no se observó ningún síntoma de toxicidad en los ratones inyectados y se mantuvieron totalmente asintomáticos durante largos periodos de tiempo.

Como se comentó en la Introducción (apartado 4.1.2.), el H7 es un inhibidor selectivo pero no totalmente específico de la PKC, siendo capaz de inhibir las proteína kinasas dependientes de AMP y GMP cíclico. Por ello, se inyectó un grupo de ratones diabéticos de cinco días de evolución con HA1004, un inhibidor 20 ó 30 veces más específico para las proteína kinasas dependientes de AMP y GMP cíclico que para la PKC, y se comparó su efecto con el del H7. En la tabla 4 se puede comprobar cómo la administración de HA1004 no presentó ningún efecto sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático, probablemente debido a su escasa capacidad para inhibir la PKC. En el mismo experimento, la administración de H7 recuperó completamente la actividad Na^+/K^+ ATPasa, confirmando los resultados presentados en la tabla 3 y en las figuras 10 y 11. Estos resultados indican que el efecto del H7 sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos puede ser atribuido a la inhibición de la PKC y no de las otras proteína kinasas que es capaz de inhibir este compuesto.

3.2. Efecto de la inyección aguda de calfostin C.

Tal y como se adelantaba en la Introducción (apartado 4.1.2.), un nuevo y más potente inhibidor de PKC, el calfostin C, fue descubierto en 1989 y se comercializó a principios de 1992. Los experimentos anteriormente planteados, realizados con H7, presentaban algunos problemas, debidos fundamentalmente a su poca especificidad, a las elevadas dosis utilizadas y a la poca duración de su efecto. Por todo ello se decidió realizar los experimentos con calfostin C que se presentan a continuación.

La administración de una inyección intraperitoneal de $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de calfostin C a un grupo de cuatro ratones no produjo ningún efecto sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa cuando la comparamos con la actividad que

TABLA 4

Comparación del efecto de la inyección de H7 y HA1004 en la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón.

Grupo	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	
	nmol/mg prot x h	% control
Control	609 ± 30	100
Diabético	348 ± 40*	57
+ H7 (30 mg/Kg)	582 ± 41	96
+ HA1004 (30 mg/Kg)	394 ± 22*	65

El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana y sacrificado 5 días después. Dos grupos de 5 ratones diabéticos de 5 días de evolución fueron inyectados con la misma dosis (30 mg/Kg) de H7 y de HA1004 y sacrificados 15 minutos después. Los datos son media ± desviación estándar de la determinación por quintuplicado de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa.

F(3, 16) = 73.58, p < 0.001

* p < 0.001, comparados con el grupo control.

presentan los nervios ciáticos del grupo control (tabla 5).

La administración de la misma dosis de calfostin C a un grupo de ratones diabéticos de cinco días de evolución recuperó completamente la actividad Na^+/K^+ ATPasa, no existiendo diferencias entre la actividad del grupo tratado con calfostin C, sacrificado 15 minutos después, y la actividad presente en el grupo control (tabla 5).

En la tabla 6 se compara el efecto de los dos inhibidores de la PKC utilizados en este trabajo. Se comprueba en un mismo experimento que ambos inhibidores fueron capaces de recuperar completamente la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático al ser inyectados a un grupo de ratones diabéticos de cinco días de evolución. En este caso, se obtuvo el mismo efecto con una dosis de 15 mg/kg de H7 que con una dosis 750 veces menor de calfostin C (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

En la figura 12 se presenta el efecto de diferentes dosis de calfostin C sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. En los experimentos anteriores se había demostrado que el calfostin C recuperaba completamente esta actividad a las dosis de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La dosis mínima que produjo la recuperación completa de la actividad Na^+/K^+ ATPasa 15 minutos después de su inyección fue de 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Esta recuperación completa se produce del mismo modo con todas las dosis superiores ensayadas (hasta 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Con todas estas dosis, la actividad Na^+/K^+ ATPasa de los grupos tratados con calfostin C fue la misma que la del grupo control. La menor dosis utilizada (0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) también produjo una ligera recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, significativamente distinta de la actividad del grupo diabético no tratado.

Los datos presentados en la figura 12 permiten calcular la dosis de calfostin C que produjo la mitad del efecto máximo en este modelo experimental (dosis eficaz 50; DE_{50}), que es $\approx 0.5 \mu\text{g}/\text{Kg}$. La DE_{50} para el H7

TABLA 5

Efecto de la inyección de calfostin C sobre la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón.

Grupo	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa		Glucemia
	nmol/mg prot x h	% control	mM
Control	777 ± 19	100	8.4 ± 0.7
+ Calfostin C	749 ± 61	96	8.7 ± 2.1
Diabético	424 ± 9*	55	26.9 ± 5.1*
+ Calfostin C	761 ± 13	98	29.0 ± 3.1*

El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana y sacrificado cinco días más tarde. El segundo grupo fue inyectado con una dosis única intraperitoneal de 10 µg/Kg de calfostin C y sacrificado 15 minutos después. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana y sacrificado 5 días después. Un grupo de ratones diabéticos de cinco días de evolución fue inyectado con una dosis única intraperitoneal de 10 µg/Kg de calfostin C y sacrificado 15 minutos después. Los datos son media ± desviación estándar de los valores de cuatro ratones por grupo.

F(3, 12) = 70.80, p < 0.001, para los valores de Na⁺/K⁺ ATPasa.

F(3, 12) = 50.21, p < 0.001, para los valores de glucemia.

* p < 0.001, comparado con los valores del grupo control.

TABLA 6

Comparación del efecto de la inyección de H7 y calfostin C sobre la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratón.

Grupo	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa		Glucemia
	nmol/mg prot x h	% control	mM
Control	655 ± 36	100	7.0 ± 0.6
Diabético	375 ± 29*	57	24.9 ± 5.6**
+ H7	651 ± 30	99	22.8 ± 2.9**
+ Calfostin C	699 ± 26	107	24.3 ± 3.6**

El grupo control fue inyectado con el solvente de la aloxana. El grupo diabético fue inyectado con 200 mg/Kg de aloxana y sacrificado 5 días después. Dos grupos de ratones diabéticos de 5 días de evolución fueron inyectados con 15 mg/Kg de H7 y con 20 µg/Kg de calfostin C, respectivamente, y sacrificados 15 minutos después. Los datos son media ± desviación estándar de cuatro ratones por grupo.

F(3, 12) = 95.48, p < 0.001, para los valores de Na⁺/K⁺ ATPasa.

F(3, 12) = 22.09, p < 0.001, para los valores de glucemia.

* p < 0.001, comparado con el resto de grupos.

** p < 0.001, comparado con los valores del grupo control.

**Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(% del control)**

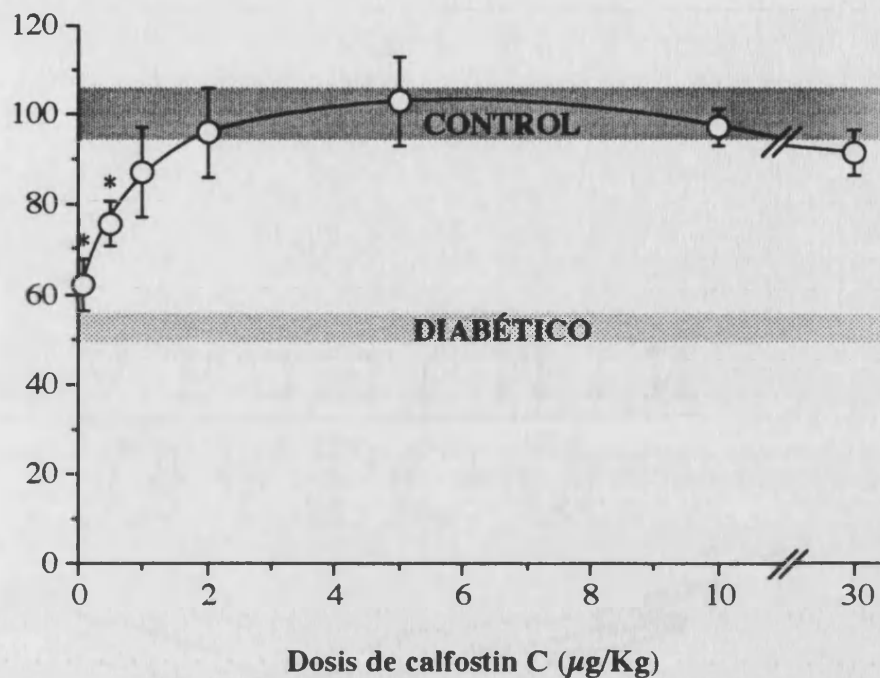


Figura 12: Efecto de diferentes dosis de calfostin C en la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de ratones diabéticos. Grupos de 3 ratones diabéticos (6 en la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) de 5 días de evolución fueron inyectados con las dosis indicadas de calfostin C y sacrificados 15 minutos después. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control (n=7) y del grupo diabético (n=9) no tratado con calfostin C.

$F(8, 31) = 26.00, p < 0.001$.

Todos los valores de los grupos tratados con calfostin C fueron significativamente distintos de los valores del grupo diabético.

* $p < 0.001$ comparado con los valores del grupo control.

era ≈ 10 mg/Kg. Estos datos demuestran de forma aproximada que el calfostin C es unas 20.000 veces más potente que el H7 para recuperar la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de los ratones diabéticos.

Con el fin de estudiar la duración del efecto de la inyección única de calfostin C se realizaron los experimentos recogidos en la figura 13. Se representa la evolución, a lo largo del tiempo, del efecto de la inyección única intraperitoneal de dos dosis de calfostin C, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. La inyección de la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ mantuvo completamente recuperada la actividad Na^+/K^+ ATPasa 4 horas después de su administración, pero su efecto decayó rápidamente, y a las 8 horas de haber sido inyectados su actividad Na^+/K^+ ATPasa era igual a la del grupo diabético no tratado.

Cuando la dosis inyectada fue de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, la actividad se mantuvo igual que la del control hasta las 8 horas, disminuyendo lentamente el efecto del calfostin C, de manera que a las 24 horas la actividad Na^+/K^+ ATPasa seguía siendo diferente de la del grupo control. Tras 48 horas, los ratones diabéticos inyectados y no inyectados con calfostin C presentaban la misma actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático.

Comparando estos resultados con los obtenidos con la administración de H7 se puede concluir que el calfostin C produce un efecto mucho más duradero en este modelo experimental, ya que una dosis de 30 mg/Kg de H7 tardaba ≈ 1 hora en reducir su efecto a la mitad mientras que el calfostin C, a una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, tarda ≈ 5.5 horas. Tanto por la duración del efecto considerado, como por su potencia, el calfostin C demuestra un mejor comportamiento, en este modelo experimental, que el H7.

Por último, y del mismo modo que ocurría con el H7, a las dosis utilizadas no se observó ningún tipo de alteración en el comportamiento de los animales inyectados con calfostin C, ni síntomas de toxicidad durante el periodo

**Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(nmol/mg prot x h)**

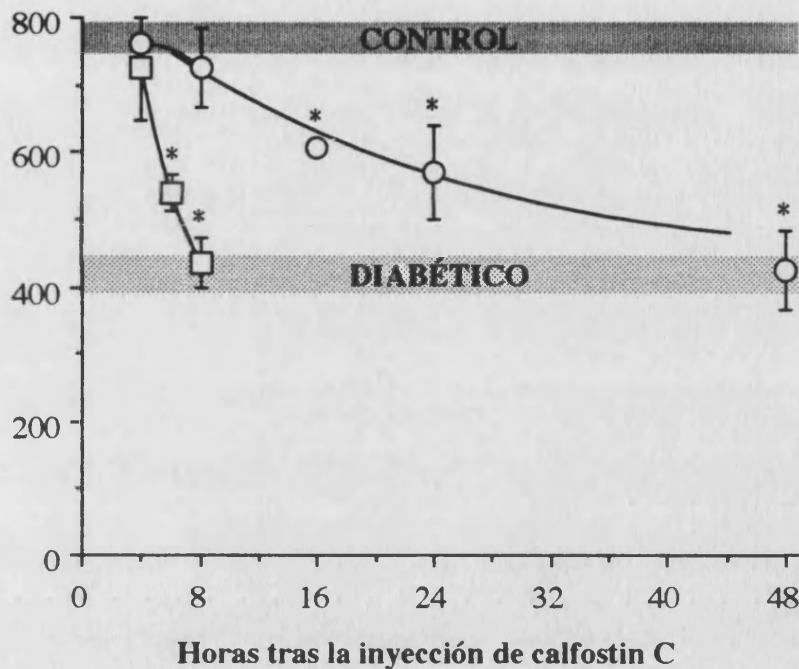


Figura 13: Evolución del efecto de dos dosis de calyculin C sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. Grupos de 3 ratones diabéticos de 5 días de evolución fueron inyectados intraperitonealmente con 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (\square) y 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (\circ) de calyculin C. Se sacrificaron en los tiempos señalados. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control y del grupo diabético no tratado con calyculin C.

$F(9, 26) = 46.15, p < 0.001$.

Todos los puntos son significativamente distintos de los valores del grupo diabético ($p < 0.001$) excepto los últimos de cada dosis.

* $p < 0.001$, comparado con los valores del grupo control.

de realización de los experimentos.

3.3. Efecto de la liberación lenta de inhibidores de la proteína kinasa C.

De los tres problemas planteados con la administración del H7 en inyección única (ver apartado 3.2. de este capítulo de Resultados) dos han sido resueltos con la administración de calfostin C: una inhibición mucho más específica y potente sobre la PKC que la ejercida por el H7. Esto ha permitido utilizar dosis mucho menores de inhibidor, sin embargo, la duración del efecto de ambos, cuando se administran mediante una inyección intraperitoneal, sigue siendo limitada. Para tratar de subsanar este problema se recurrió a la implantación de bombas de liberación lenta y continua de inhibidor, que permiten mantener el tratamiento durante periodos más largos de tiempo.

La administración continua de H7 se consiguió mediante la implantación de bombas microosmóticas en el dorso de los ratones. Se utilizaron tres grupos de tres ratones diabéticos de cinco días de evolución y se sacrificaron 24, 48 y 72 horas después de su implantación. Los datos obtenidos con estos experimentos se presentan en la figura 14. Se puede observar que, 24 horas después, de la implantación de las bombas microosmóticas la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático era completa, presentando la misma actividad que el grupo control. A las 48 horas de haber sido implantadas las microbombas, la actividad recuperada por el H7 era el 60% de la actividad perdida por la diabetes, mientras que a las 72 horas no existían diferencias entre la actividad de los ratones diabéticos tratados o no con H7.

Los resultados presentados en la figura 14 demostraban que se podía mantener normalizada la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de los ratones diabéticos durante al menos 24 horas. Sin embargo, dado que la liberación de H7 se mantenía constante durante 72 horas, éste debería perder eficacia antes de ser liberado, de otro modo, la respuesta al H7 habría de ser igual a las 72 horas que a las 24 horas de haber sido implantadas las bombas microosmóticas. Esta pérdida de eficacia del H7 sugería que éste no era estable

**Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(% control)**

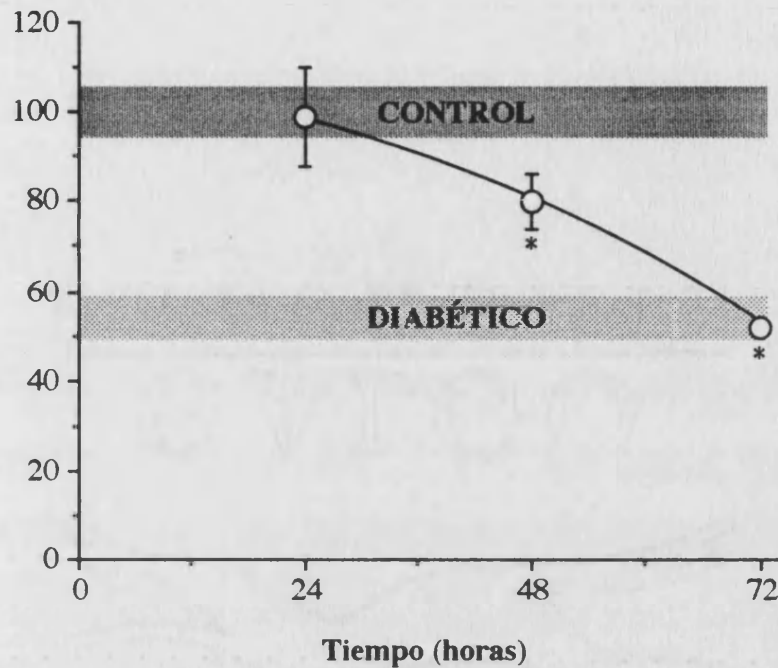


Figura 14: Efecto de la liberación lenta y continua de H7 durante diferentes periodos de tiempo sobre su capacidad para recuperar la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. Se colocaron bombas microosmóticas de liberación lenta y continua a 3 grupos de 3 ratones diabéticos de 5 días de evolución, llenas de una solución de H7 (250 mg/ml) en 50% de dimetilsulfóxido, liberándose 250 μg de H7 por hora. Se sacrificaron en los tiempos indicados. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control (n=10) y del grupo diabético no tratado con H7 (n=12).

$F(4, 26) = 107.06, p < 0.001.$

* $p < 0.001$, comparado con los valores del grupo control.

en esas condiciones.

Con el fin de comprobar si la pérdida de eficacia del H7 era debida a la temperatura a la que se encontraba sometido durante horas (la temperatura corporal del ratón) se calentó una solución de 15 mg/Kg de H7 a 37°C y se inyectaron con ella distintos grupos de ratones diabéticos. Los resultados obtenidos con este experimento se presentan en la figura 15. La inyección de la solución calentada a 37°C durante 4 horas normalizó la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Sin embargo, la recuperación al cabo de 8 horas de calentamiento del H7 fue del 70% de la actividad perdida, y a las 24 horas tan sólo del 33% de la misma. La actividad de todos los grupos tratados con H7 fue diferente de la del grupo diabético no tratado. La inyección de un grupo de ratones diabéticos con la solución fresca de H7 normalizó completamente la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático (tiempo 0).

Los resultados descritos en la figura 15 indican claramente que el H7 es muy inestable en estas condiciones, y explican por qué el efecto de su liberación lenta y sostenida no se mantuvo durante 72 horas (figura 14).

La implantación de bombas miniosmóticas en el dorso de los ratones permitía administrar calfostin C de forma continua durante dos semanas. En la figura 16 se presenta el efecto de la liberación continua de calfostin C en ratones diabéticos de cinco días de evolución. Tres días después de haber implantado las minibombas, la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático representaba el 86% de la actividad del grupo control, frente al 48% del grupo diabético no tratado. La recuperación se mantuvo en este nivel (86% de la actividad del grupo control) durante los 14 días que se pueden utilizar este tipo de bombas.

Es importante resaltar que a pesar de la larga duración de este experimento, la glucemia se mantuvo sin variaciones a lo largo de las dos semanas. Por ejemplo, en los ratones del grupo control, diabético sin tratar y diabético con bomba miniosmótica de calfostin C durante 14 días, los valores de glucemia fueron, el día que se implantaron las bombas, 8.6 ± 0.5 mM, $31.9 \pm$

**Actividad Na⁺/K⁺ ATPasa
(nmol/mg prot x h)**

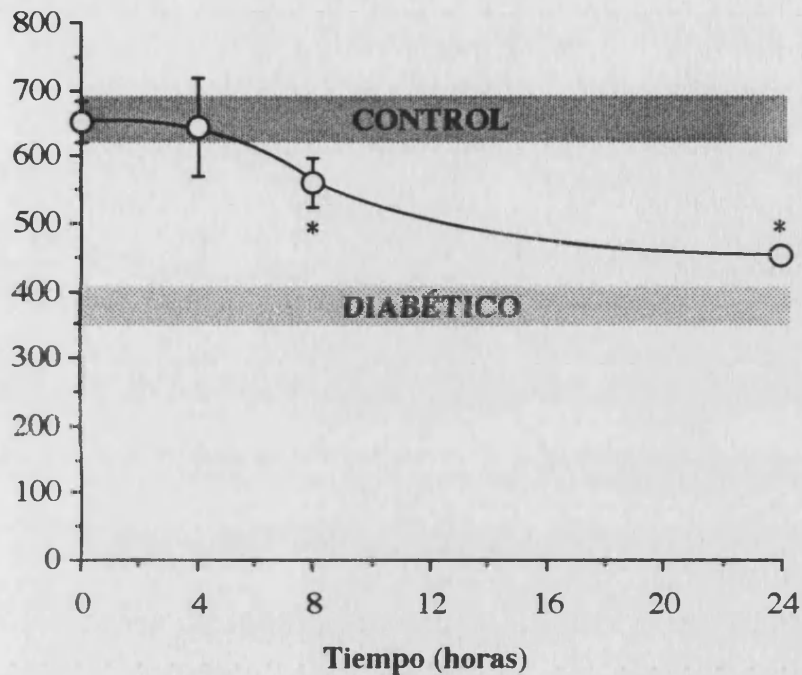


Figura 15: Efecto del calentamiento de H7 durante diferentes periodos de tiempo sobre su capacidad para recuperar la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. Grupos de 4 ratones diabéticos de 5 días de evolución fueron inyectados intraperitonealmente con 15 mg/Kg de H7 calentado a 37°C durante los tiempos indicados y sacrificados a los 15 minutos. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media ± desviación estándar de los valores del grupo control (n=4) y del grupo diabético (n=4) no tratado con H7.

$F(5, 18) = 32.52, p < 0.001.$

* $p < 0.01$ comparado con la actividad del grupo inyectado con H7 sin calentar.

La actividad de todos los grupos tratados con H7 es significativamente distinta ($p < 0.005$) de la del grupo diabético.

Actividad Na^+/K^+ ATPasa
(% del control)

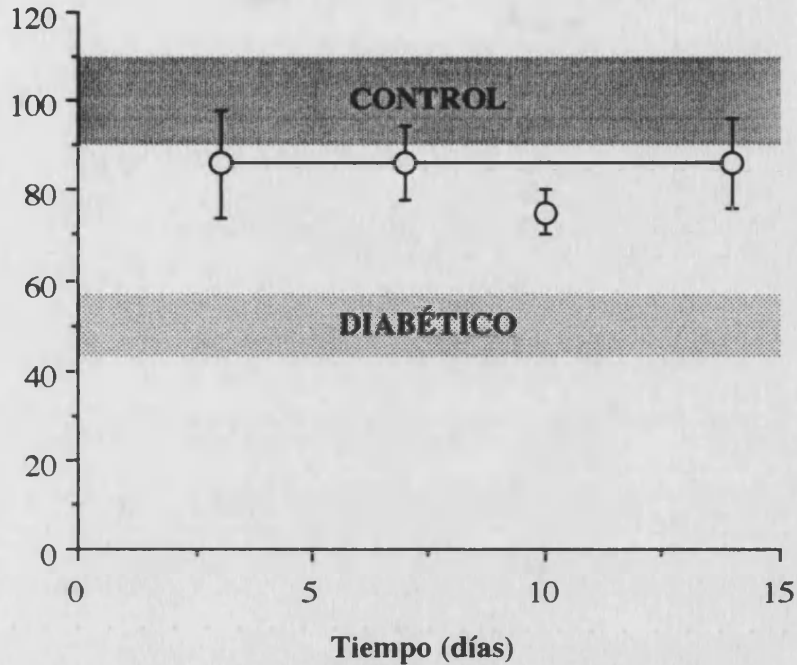


Figura 16: Efecto de la liberación continua de calfostin C sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de ratones diabéticos. Se colocaron bombas miniosmóticas de liberación lenta y continua a 4 grupos de 3 ratones diabéticos de 5 días de evolución, llenas de una solución de calfostin C ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) en 10% de dimetilsulfóxido, liberándose $0.025 \mu\text{g}$ de calfostin C por hora. Se sacrificaron en los tiempos indicados. Los valores, presentados como porcentaje de la actividad del grupo control, se expresan como media \pm desviación estándar (barras). Las áreas sombreadas representan la media \pm desviación estándar de los valores del grupo control ($n=6$) y del grupo diabético no tratado con calfostin C ($n=6$).

$F(5, 18) = 40.99, p < 0.001$.

Todos los valores de los animales tratados con calfostin C son estadísticamente diferentes ($p < 0.001$) de los del grupo diabético.

4.3 mM y 30.1 ± 4.1 mM, respectivamente, y 8.9 ± 0.5 mM, 31.7 ± 5.7 mM y 31.5 ± 3.3 mM para los mismos grupos, dos semanas después.

4. Medida de la actividad proteína kinasa C en nervio ciático de ratones diabéticos y efecto de la administración de sus inhibidores.

La determinación de la actividad PKC en nervio ciático de ratones control y diabéticos constituía parte del segundo objetivo de este trabajo. Los resultados de los experimentos presentados hasta el momento ponen de manifiesto, de forma indirecta, la existencia de una activación de la PKC en nervio ciático de ratones diabéticos, que sería responsable de la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Con el fin de comprobar esta hipótesis, y, después de poner a punto el método adecuado, se determinó la actividad PKC en nervio ciático de ratones control y diabéticos.

En la figura 17 se presenta la actividad PKC en nervio ciático de ratones control y diabéticos. La actividad PKC se determinó tanto en homogenado fresco de nervio ciático como en las fracciones citosólica y de membranas del mismo. Se puede comprobar que la actividad PKC en membranas es muy superior (≈ 4 veces) a la que se encontró en la fracción citosólica, tanto en ratones control como en ratones diabéticos.

La actividad PKC en el nervio ciático de los ratones diabéticos, especialmente en las membranas, presentó unos valores discretamente superiores a los del grupo control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Como se discutirá en el apartado correspondiente, el método utilizado para esta determinación incluye la utilización de activadores de PKC en el ensayo *in vitro*, pudiendo modificar las condiciones reales de activación de la PKC *in vivo*.

A pesar de no existir diferencias en la actividad PKC del nervio ciático entre los grupos control y diabéticos, resultó interesante determinar la actividad

Actividad PKC
(nmol/ mg prot x min)

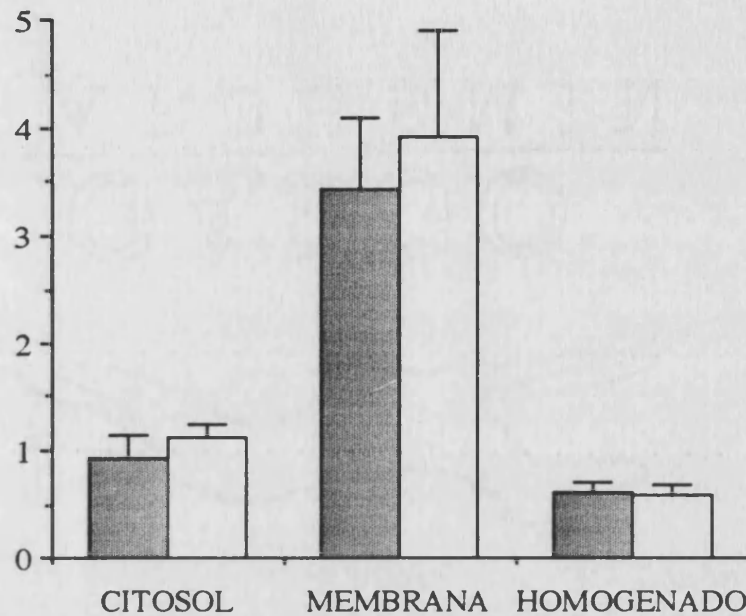


Figura 17: Medida de la actividad PKC del nervio ciático de ratones control y diabéticos. Se midió la actividad PKC en citosol, membrana y homogenado fresco de nervio ciático de 2 grupos de 5 ratones, controles (■) y diabéticos (□) de 5 días de evolución. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras).

PKC tras el tratamiento con inhibidores de la PKC, con un doble objetivo: por un lado, comprobar que los inhibidores son capaces de modificar la actividad PKC del tejido nervioso periférico y por otro lado, evaluar la inhibición provocada por éstos.

En la figura 18 se presenta el efecto de la administración de inhibidores de la PKC sobre su actividad en citosol y membranas de nervio ciático de ratón. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de 30 mg/Kg de H7 o de 30 μ g/Kg de calfostin C. El grupo control recibió el solvente de ambos (dimetilsulfóxido diluido), 15 minutos después los ratones fueron sacrificados y se midió la actividad PKC en las fracciones señaladas de nervio ciático.

La actividad PKC en la fracción citosólica del nervio ciático no se afectó por la inyección de H7 o de calfostin C a las dosis indicadas. La actividad PKC en membranas de nervio ciático fue significativamente menor en los grupos tratados con inhibidores que en el grupo, lo cual demostró que estos inhibidores eran capaces de ejercer su efecto sobre la PKC del nervio ciático. La disminución de la actividad PKC, respecto a la que presentaba el grupo control, fue del 24% para el grupo tratado con H7 y del 25% para el grupo tratado con calfostin C.

Con la determinación de la actividad PKC en nervio ciático, aunque el método no nos permitiera observar diferencias entre los ratones de los grupos control y los diabéticos, se ha podido comprobar que los inhibidores de la PKC utilizados alcanzan el tejido nervioso periférico con unas concentraciones suficientes para disminuir su actividad de forma significativa.

5. Efecto de la diabetes sobre la velocidad de conducción nerviosa.

En el apartado 4.2.5. de la Introducción se ponía de manifiesto que la disminución de la velocidad de conducción nerviosa en los animales diabéticos,

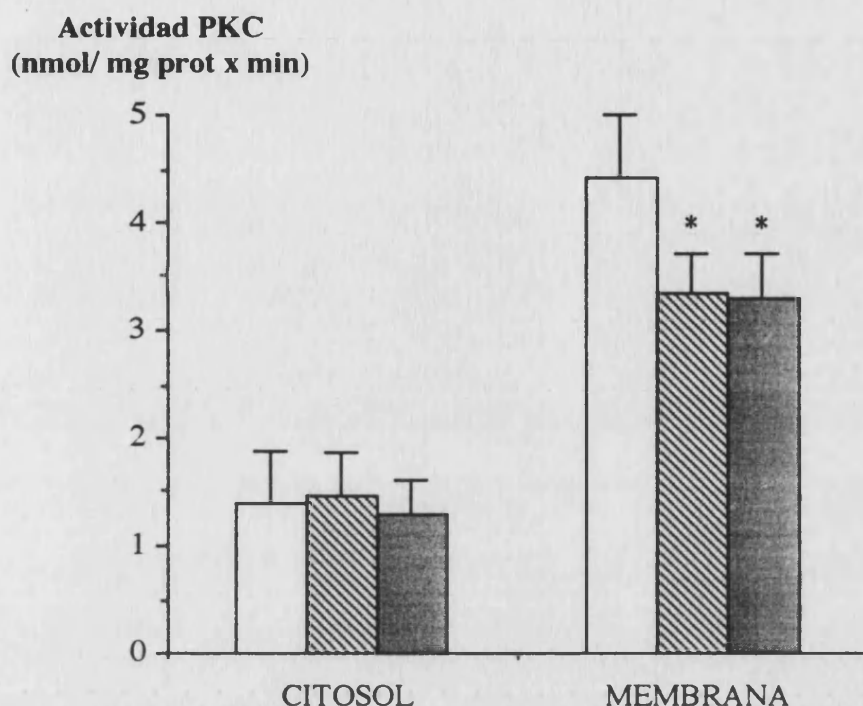


Figura 18: Efecto de la inyección intraperitoneal de H7 y de calfostin C sobre la actividad PKC en nervio ciático de ratón. Los ratones fueron inyectados con H7 (30 mg/Kg; ▨) o con calfostin C (30 µg/Kg; ■) y el grupo control (□) con los solventes y sacrificados 15 minutos después. Se midió la actividad PKC en citosol y membrana. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (barras) de 6 y 8 ratones por grupo para las determinaciones en citosol y membrana, respectivamente.

$F(2, 15) = 0.16, p > 0.8$, para los valores en citosol.

$F(2, 21) = 14.43, p < 0.001$, para los valores en membrana.

* Estadísticamente diferente ($p < 0.001$) comparado con los valores del grupo control.

y también en el hombre, era uno de los fenómenos observados en la neuropatía diabética, si bien su presencia es discutida en numerosos modelos. También se ha comentado cómo algunos autores han asociado la disminución de la VCN a la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático de los animales diabéticos.

Hasta el momento, con el modelo experimental utilizado, se ha podido demostrar una disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, que se puede prevenir y recuperar con la administración de inhibidores de la PKC. A continuación se estudia la posible alteración de la VCN y su modificación con los inhibidores de la PKC utilizados.

En la figura 19 se presentan los resultados de la determinación a diferentes temperaturas de la VCN por el método indirecto (diferencia de latencias), en el nervio caudal de la cola del ratón, en un grupo de ratones control y otro de ratones diabéticos de 16 días de evolución.

La determinación de la VCN a la temperatura fisiológica de la cola del ratón (27°C) no demostró diferencias entre los valores del grupo control y los del grupo diabético.

Por otra parte, la posibilidad de realizar determinaciones de la VCN a temperaturas constantes y controladas, diferentes de la fisiológica, puso de manifiesto las alteraciones inducidas por la diabetes en la conducción nerviosa. Se puede comprobar que, a temperaturas alejadas de la fisiológica, la VCN fue significativamente menor en el grupo de ratones diabéticos que en el grupo control, demostrando que en este modelo experimental es posible estudiar alteraciones de la conducción nerviosa inducidas por la diabetes.

El estudio del efecto de los inhibidores de la PKC sobre la VCN se inició con la administración aguda de H7 a las dosis de 30 mg/Kg, a ratones control y diabéticos. Se midió la VCN durante las 2 horas siguientes a la inyección, sin que se observaran cambios en la misma.

**Velocidad de conducción
nerviosa motora (m/s)**

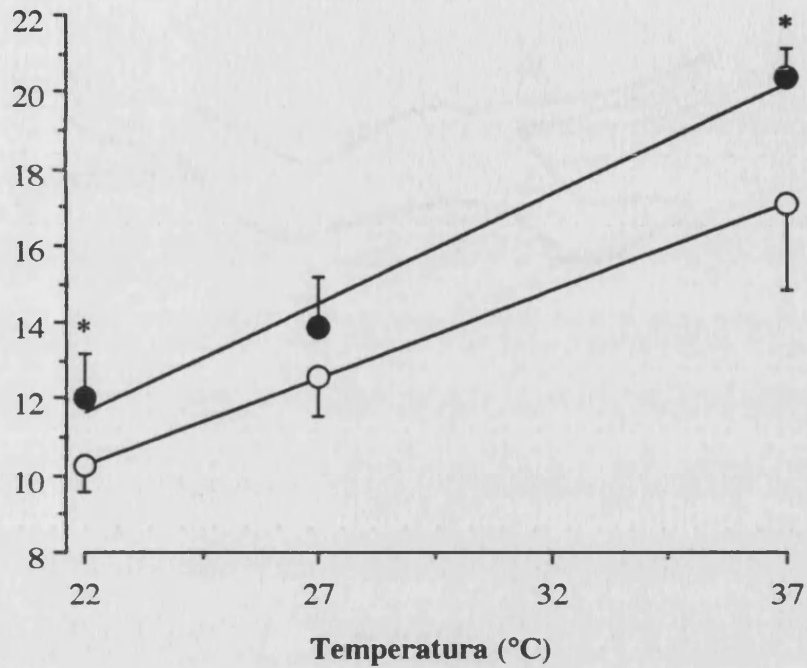


Figura 19: Efecto de la diabetes sobre la velocidad de conducción nerviosa motora máxima. Se midió la velocidad de conducción nerviosa mediante el método indirecto (diferencia de latencias), a las temperaturas indicadas, en el grupo control (●) y diabético (○) de 16 ± 3 días de evolución. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras) de 7 ratones por grupo. Se muestran las rectas de regresión para los valores del grupo control ($y = -0.844 + 0.568x$, $r = 0.99$) y para el diabético ($y = 0.289 + 0.454x$, $r = 1.00$).

* Estadísticamente diferente ($p < 0.05$) comparado con los valores del grupo control.

Como muestran los resultados expuestos en el apartado 3.3. de este capítulo de Resultados, la inhibición más potente y duradera de la PKC se consiguió con la administración continua de calfostin C mediante bombas miniosmóticas. En la tabla 7 se presentan los valores de VCN obtenidos en un grupo de ratones control y dos grupos de ratones diabéticos de 18 días de evolución, al segundo de los cuales se le administró calfostin C de la forma mencionada.

Se puede comprobar que la VCN determinada a 27°C en el grupo de calfostin C fue la misma que en los grupos control y diabético, descartando posibles efectos tóxicos. La determinación de la VCN a 22°C demostró que la administración continua de calfostin C no recuperaba la disminución de la VCN que se producía en los ratones del grupo diabético, siendo los valores en el grupo diabético iguales que en el grupo diabético tratado con calfostin C y en ambos, inferiores a los del grupo control. No se observó diferencia alguna entre los valores correspondientes al incremento de la VCN por grado centígrado entre ninguno de los grupos considerados (tabla 7).

De los resultados obtenidos con la determinación de la VCN cabe destacar que, en este modelo experimental, la VCN en el nervio caudal está disminuida en los ratones diabéticos a temperaturas diferentes de la fisiológica y que la administración de calfostin C de forma continua, aunque recuperó la actividad Na^+/K^+ ATPasa del nervio ciático en los mismos tiempos de evolución, no recupera la disminución de la VCN inducida por la diabetes.

6. Efecto de la diabetes sobre la defensa antioxidante en el nervio ciático.

La presencia de estrés oxidativo, como se vio en el apartado 4.4.3. de la Introducción, se ha propuesto como uno de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la neuropatía diabética. Con el fin de estudiar esta teoría, y como se adelantaba en el punto 4 del apartado de Objetivos, se estudian los aspectos más importantes de la defensa antioxidante en nervio ciático de ratones

TABLA 7

Determinación de la velocidad de conducción nerviosa en ratones control, diabéticos y diabéticos tratados con calfostin C de forma continua.

Grupo	Glucemia (mM)	VCNM (m/s)		$\Delta^{\circ}\text{C}$ VCNM (m/s x $^{\circ}\text{C}$)
		22 $^{\circ}\text{C}$	27 $^{\circ}\text{C}$	
Control (n=6)	8.6 \pm 0.8	12.18 \pm 1.17	13.80 \pm 1.37	0.32 \pm 0.12
Diabético (n=6)	29.6 \pm 9.0*	10.39 \pm 0.61**	12.58 \pm 1.06	0.44 \pm 0.11
+ Calfostin C (n=5)	32.4 \pm 8.8*	9.94 \pm 1.14**	12.09 \pm 1.43	0.43 \pm 0.10

La velocidad de conducción nerviosa motora (VCNM) se calculó mediante el método indirecto (diferencia de latencias) a las temperaturas indicadas en un grupo control y dos grupos diabéticos de 18 días de evolución, el segundo de los cuales fue tratado con calfostin C liberado de forma continua durante los últimos 14 días. El incremento de la velocidad de conducción nerviosa por grado centígrado, entre las temperaturas estudiadas ($\Delta^{\circ}\text{C}$ VCNM), se calculó según se detalla en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar con el número de experimentos que se indica entre paréntesis.

F(2, 14) = 18.85, $p < 0.001$, para los valores de glucemia.

F(2, 14) = 8.10, $p < 0.005$, para los valores de VCNM a 22 $^{\circ}\text{C}$.

F(2, 14) = 2.65, $p > 0.1$, para los valores de VCNM a 27 $^{\circ}\text{C}$.

F(2, 14) = 1.97, $p > 0.1$, para los valores de $\Delta^{\circ}\text{C}$ VCNM.

* $p < 0.001$ y ** $p < 0.05$, comparado con los valores del grupo control.

control y diabéticos.

6.1. Efecto sobre la concentración de glutatión.

El GSH constituye uno de los ejes centrales de la defensa antioxidante celular, y la determinación de su concentración constituye un buen índice para su estudio.

En la figura 20 se presenta la evolución de la concentración de GSH y la glucemia en un grupo de ratones control y dos grupos de ratones diabéticos de 7 y 21 días de evolución. La determinación del contenido de GSH se realizó en los nervios ciáticos de dos ratones en cada determinación. La concentración de GSH en nervio ciático de ratón no se modificó en las tres primeras semanas de evolución.

6.2. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes relacionadas con el glutatión.

La ausencia de modificaciones en la concentración de GSH en nervio ciático llevó al estudio de la actividad de algunos enzimas antioxidantes relacionados con el GSH, los cuales ejercen un papel fundamental en la defensa frente al estrés oxidativo. Se escogió la actividad GSH S-transferasa, y la actividad GSH peroxidasa frente a dos peróxidos, peróxido de hidrógeno y *tert*-butil hidroperóxido.

La determinación de estas actividades enzimáticas se realizó en un grupo de ratones control y un grupo de ratones diabéticos de 7 días de evolución, con 9 ratones en cada grupo. La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo en citosol preparado a partir de los nervios ciáticos de tres ratones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8.

La actividad GSH S-transferasa no se modificó con la inducción de la diabetes, presentando la misma actividad el grupo control que el grupo

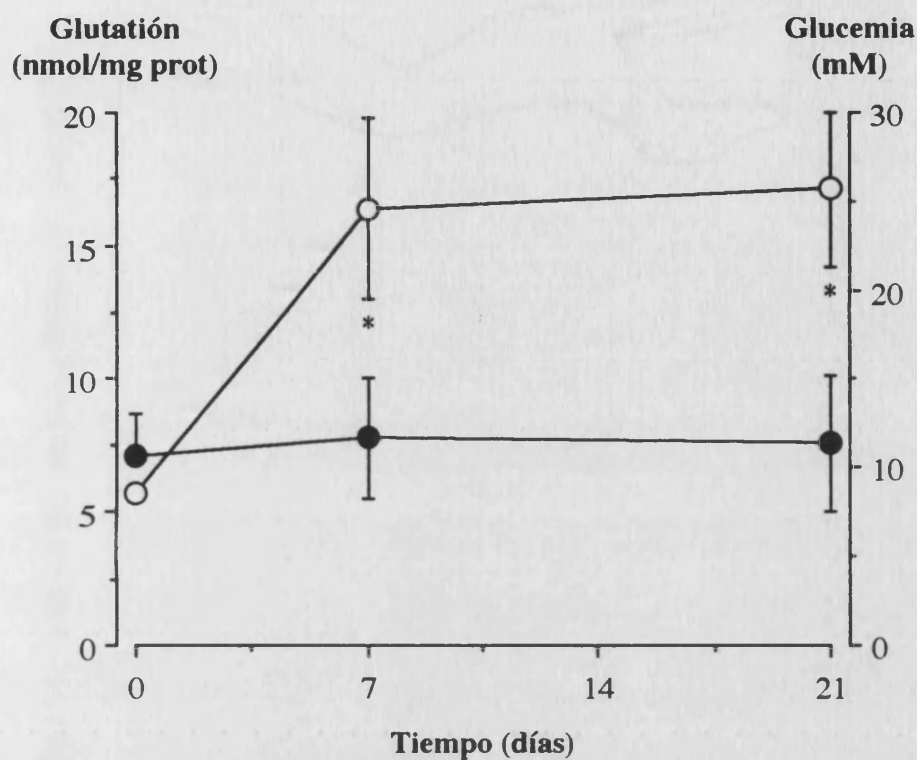


Figura 20: Efecto de la diabetes sobre la concentración de glutatión en nervio ciático de ratón. Se midió la concentración de glutatión en nervio ciático de un grupo de ratones control (n=8) y en dos grupos de ratones diabéticos de 7 (n=8) y 21 días (n=6) de evolución. Cada determinación de glutatión se realizó agrupando los nervios ciáticos de dos ratones. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras) de los valores de glutatión (●) o de glucemia (○).

* $p < 0.001$ comparado con los valores del grupo control.

TABLA 8

Actividad glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa en citosol de nervio ciático de ratones control y diabéticos de una semana de evolución.

Grupo	Glucemia (mM)	Glutatión S-transferasa (nmol/mg prot x min)	Glutatión peroxidasa (nmol/mg prot x min)	
			<i>t</i> -BOOH	H ₂ O ₂
Control	7.3 ± 0.5	180 ± 20	38.2 ± 6.8	61.1 ± 2.3
Diabético	30.6 ± 5.5*	174 ± 33	33.6 ± 7.0	42.8 ± 4.4*

Se midió la actividad glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa frente a dos peróxidos, *tert* butil hidroperóxido (*t*-BOOH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un grupo de ratones control y en un grupo de ratones diabéticos de 7 días de evolución. La determinación de las actividades enzimáticas se realizó en la fracción citosólica de los nervios ciáticos de tres ratones agrupados. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de los valores correspondientes a 9 ratones por grupo.

* $p < 0.001$, comparado con los valores del grupo control.

diabético. De igual modo, la actividad GSH peroxidasa frente a *tert*-butil hidroperóxido no se modificó después de una semana de evolución de la diabetes. Sin embargo, la actividad GSH peroxidasa frente a peróxido de hidrógeno, al cabo de 7 días, presentaba una disminución estadísticamente significativa, comparada con los valores del grupo control.

Debido al interés que la última enzima presenta desde el punto de vista de la defensa antioxidante, así como su marcada disminución tras una semana de evolución de la diabetes, se consideró oportuno ampliar su estudio.

6.3. Efecto de la diabetes sobre la actividad glutatión peroxidasa.

Como se presentó en el apartado anterior, la actividad GSH peroxidasa en nervio ciático de ratones diabéticos de 7 días de evolución estaba significativamente disminuida respecto a la actividad que presentaba el grupo control. Con el fin de estudiar la evolución de esta disminución en la actividad de la enzima, se preparó el experimento recogido en la figura 21.

En la figura 21 se presenta la actividad GSH peroxidasa frente a peróxido de hidrógeno en citosol de nervio ciático de un grupo de ratones control, un grupo de ratones diabéticos de 7 días de evolución y un grupo de ratones diabéticos de 21 días de evolución. También se presenta la evolución de la glucemia en los mismos tiempos. La actividad GSH peroxidasa, que al cabo de 7 días de evolución de la diabetes era significativamente menor que la actividad del grupo control, se mantuvo disminuida tres semanas después de la inducción de la diabetes en valores semejantes a los de la primera semana.

Por otro lado, la representación de esta actividad y de la glucemia mostró una evolución inversa que sugería la existencia de una relación entre los valores de glucemia y la actividad GSH peroxidasa del nervio ciático de los ratones diabéticos.

En la figura 22 se presenta la regresión lineal entre la actividad GSH

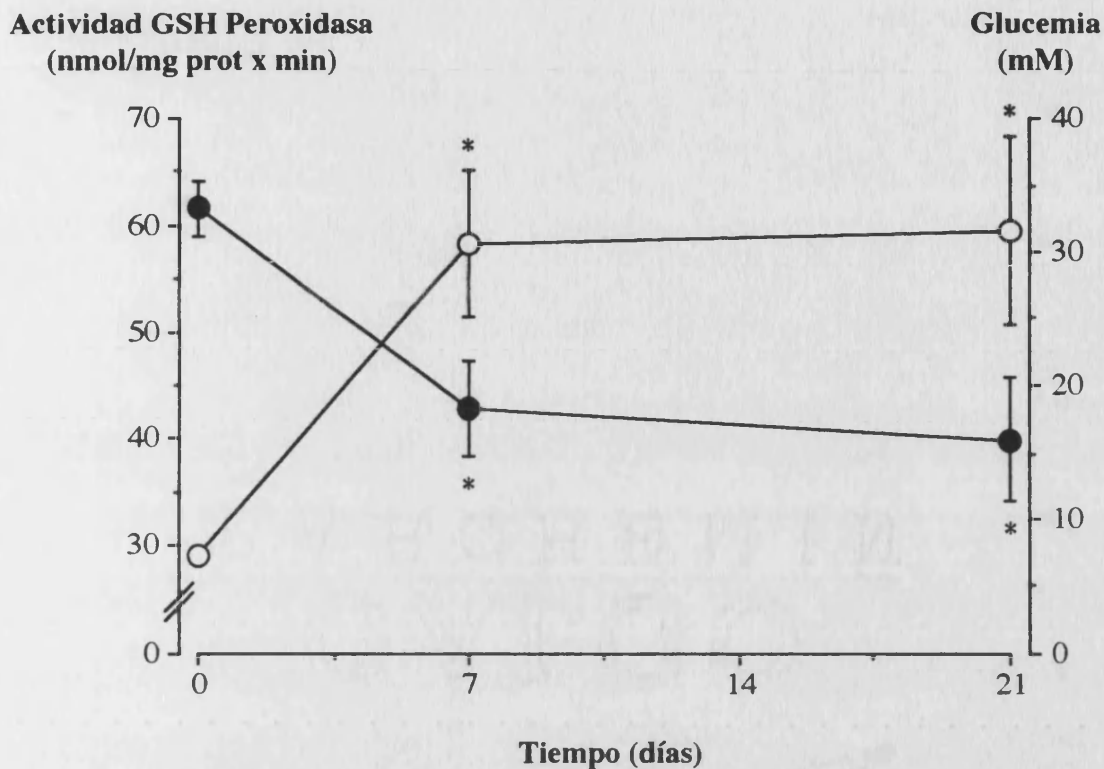


Figura 21: Evolución a lo largo de tres semanas de la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de ratones diabéticos y de la glucemia. Se determinó la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de un grupo de ratones control (n=9) y en dos grupos de ratones diabéticos de 7 (n=9) y 21 días (n=9) de evolución. Cada determinación de la actividad glutatión peroxidasa se realizó agrupando los nervios ciáticos de 3 ratones. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (barras) de los valores de la actividad glutatión peroxidasa (●) o de glucemia (○).

* $p < 0.001$ comparado con los valores del grupo control.

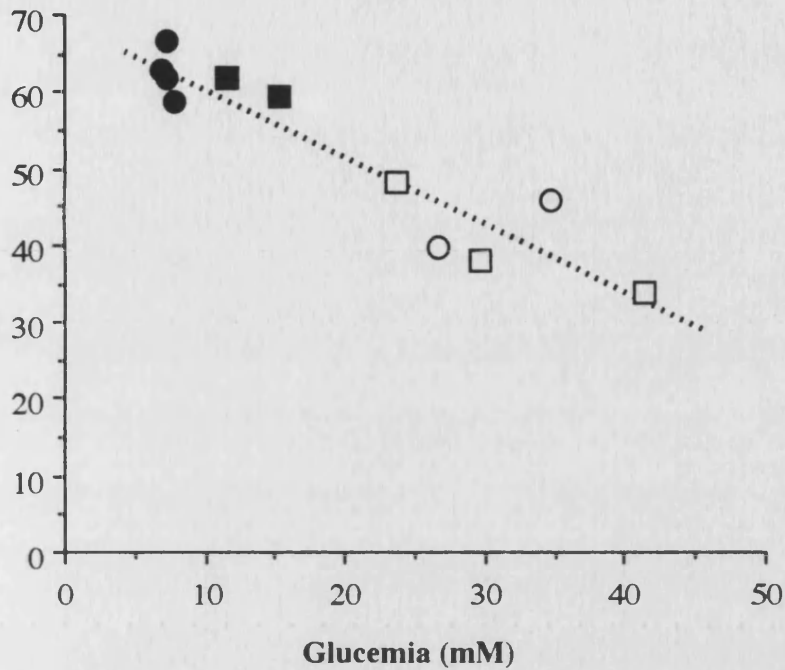
**Actividad GSH Peroxidasa
(nmol/mg prot x min)**

Figura 22: Correlación entre la glucemia y la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de ratón. Cada punto representa la actividad glutatión peroxidasa en citosol de los nervios ciáticos agrupados de tres ratones y la glucemia de los mismos. Se incluyen los valores de ratones control (●), ratones diabéticos de 7 (○) y 21 (□) días de evolución y de los ratones que, inyectados con 200 mg/Kg de aloxana, no se hicieron diabéticos (■). Los valores se ajustan a una representación lineal ($y = 69.270 - 0.874x$) con un coeficiente de correlación de $r = -0.94$.

peroxidasa medida en citosol de nervio ciático y la glucemia. Los valores representados corresponden a cada una de las determinaciones de GSH peroxidasa en los grupos control, diabético de 7 y 21 días de evolución, y se incluyen los valores de los ratones que, a pesar de haber sido inyectados con aloxana, no se hicieron diabéticos, correspondiendo cada punto a la medida realizada en nervio ciático de un grupo de tres ratones.

La representación gráfica entre los niveles de glucemia y la actividad GSH peroxidasa evidenció una relación inversa entre ambos parámetros. Los datos presentados en esta figura se ajustaron a una representación lineal con una muy buena correlación negativa (coeficiente de correlación $r = -0.94$).

V. DISCUSIÓN

1. Modelo experimental.

La obtención de un modelo experimental adecuado para el estudio de la neuropatía diabética constituía el primer objetivo de este trabajo. Como ya se adelantó en el apartado 3 de la Introducción, de entre los múltiples modelos que se han utilizado hasta el momento, se decidió utilizar el modelo del ratón diabético por administración de estreptozotocina o aloxana.

Con el fin de determinar cuál de estos dos tóxicos presentaba mayores ventajas para conseguir nuestros objetivos, se comenzó inyectando estreptozotocina intraperitonealmente. Las dosis de esta sustancia más frecuentemente utilizadas para inducir diabetes en ratas son 60 mg/Kg, tanto mediante inyección intravenosa (Greene y Mackway, 1986) como mediante inyección intraperitoneal (Zhu y Eichberg, 1990), y 50 mg/Kg (Atienza *et al.*, 1992). Como se puede comprobar en la figura 6, dosis aún mayores que las descritas (70 mg/Kg) no consiguieron inducir diabetes en los ratones. La administración de 105 mg/Kg, tampoco indujo la aparición de diabetes. La administración de una dosis doble que la inicialmente estudiada (140 mg/Kg) produjo un incremento mantenido de la glucemia pero llevó a los ratones a la muerte una semana después de la inyección (figura 6).

Estos resultados motivaron la búsqueda de otro modelo más adecuado, ya que la administración de dosis intermedias entre 105 y 140 mg/Kg resultaba difícil de ajustar en animales de tan poco peso y, además, el margen entre la dosis que provocaba la aparición de diabetes en los ratones y la que provocaba su muerte era muy estrecho.

Los experimentos para inducir diabetes en ratones con aloxana se iniciaron con las dosis utilizadas con ratas, 100 mg/Kg (Bianchi *et al.*, 1988; Triban *et al.*, 1989), siempre subcutáneamente. Como se puede comprobar en la figura 7, esta dosis no produjo ningún efecto en la glucemia de los ratones, por lo que se decidió utilizar una dosis doble de la anterior, 200 mg/Kg. Esta dosis, como se comentó en el apartado 1 de los Resultados, produjo un incremento de

la glucemia evidente y significativo desde el primer día tras la inyección, y mantuvo la glucemia, de manera prácticamente estable, en torno a 30-35 mM entre los días 4 y 16. Estas glucemias son unas cinco veces superiores a las obtenidas para el grupo control, y son mayores que el mínimo comúnmente aceptado (16 mM) para que un animal sea considerado diabético (Greene y Lattimer, 1986), como se adelantó en el apartado 2.2. de Materiales y Métodos. Por todo ello, se decidió realizar todos los experimentos del presente trabajo con ratones entre los días 4 y 16 tras la inyección de la aloxana.

La determinación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa ha sido propuesta como uno de los parámetros bioquímicos estándar de neuropatía diabética (Kahn, 1992) y ha sido utilizado por numerosos autores, tanto en animales (Bianchi *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991a), como en humanos (Dyck *et al.*, 1980), como indicador de neuropatía diabética.

Los datos obtenidos de disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de los ratones diabéticos son del mismo orden (40 - 50% de reducción respecto a los valores del grupo control) que los encontrados por la mayoría de los autores en nervio ciático de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Greene y Lattimer, 1983), de ratas genéticamente diabéticas Wistar BB (Greene *et al.*, 1984) y de conejos con diabetes inducida con aloxana (Greene y Lattimer, 1986). Sin embargo, en los estudios citados esta disminución se obtuvo tras una o dos semanas de evolución de la diabetes, mientras que en el modelo experimental utilizado en el presente trabajo esta disminución era significativa a los 3 días de haber inyectado la aloxana (figura 9). Esta diferencia, que puede ser atribuída al modelo experimental utilizado, permitió la realización de los experimentos a tiempos más cortos.

2. Proteína quinasa C y neuropatía diabética.

La utilización *in vivo* de dos inhibidores de la PKC con distinto mecanismo de acción en el modelo experimental elegido, ha permitido la demostración original de la normalización completa de la actividad Na^+/K^+

ATPasa del nervio ciático (tablas 3 a 6 y figuras 10 a 16). Este efecto se manifiesta tanto previniendo como revirtiendo la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, manteniéndose en valores cercanos a la normalidad durante al menos dos semanas (figura 16). Cabe destacar que este tratamiento no produjo aparentemente ningún efecto adverso ni afectó significativamente los valores de glucemia, de acuerdo con los resultados de otros investigadores que tampoco observan modificaciones de la glucemia con dosis de H7 similares a las utilizadas en este trabajo (25 mg/Kg) (Inaba y Filkins, 1991).

Los resultados obtenidos con la utilización de inhibidores de la PKC en neuropatía diabética experimental contrastan con los presentados por otros autores, que presentan normalizaciones del consumo de oxígeno dependiente de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de conejo diabético por inyección de aloxana tras una hora de incubación de este tejido con un activador de la PKC, forbol 12-miristato 13-acetato (Greene y Lattimer, 1986) y de la actividad Na^+/K^+ ATPasa de membranas de nervio ciático ratas de diabéticas por administración de estreptozotocina incubado con el mismo activador de la PKC (Kim *et al.*, 1991b).

La explicación de estos resultados, aparentemente contradictorios con los presentados en este trabajo, puede hallarse en que estos compuestos producen una activación transitoria de la PKC, seguida de una inhibición. Así, experimentos recientes han demostrado que la incubación con forbol 12-miristato 13-acetato durante una hora (las mismas condiciones que las usadas por Greene y Lattimer, 1986) disminuye la actividad de la PKC en células Swiss 3T3 (Linder *et al.*, 1991), en células HL60 (Kiss *et al.*, 1987) y en células MCF-7 (Darbon *et al.*, 1987).

Por ello, la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa inducida *in vitro* por activadores de la PKC podría ser debida, en realidad, a la inhibición de la PKC, como muestran los resultados realizados *in vivo* presentados en este trabajo. Por otra parte, se ha sugerido recientemente que los ésteres de forbol pueden estimular la Na^+/K^+ ATPasa por un mecanismo distinto de la activación

de la PKC (Tomlinson y Ettliger, 1992).

Tal y como se resumía en el apartado 4.3.3. de la Introducción, se ha demostrado que la Na^+/K^+ ATPasa es fosforilada por la PKC (Lowndes *et al.*, 1990), aunque el efecto de esta fosforilación era controvertido. Recientemente se ha descrito que la fosforilación de la Na^+/K^+ ATPasa purificada, por acción de la PKC, está asociada con una inhibición de su actividad de alrededor del 40 - 50% (Bertorello *et al.*, 1991). Cabe destacar que la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa observada en los experimentos presentados en este trabajo, realizados *in vivo*, y en los de otros grupos, como se ha discutido, es del mismo orden.

Un trabajo preliminar publicado recientemente y realizado *in vivo* ha venido a apoyar la hipótesis aquí defendida, sugiriendo que la PKC ejerce una inhibición tónica de la Na^+/K^+ ATPasa en el endoneuro del nervio ciático de la rata (Tomlinson y Ettliger, 1992).

El conjunto de datos presentados sugiere que la forma fosforilada de la Na^+/K^+ ATPasa es menos activa que la forma desfosforilada y que sería la activación de la PKC del nervio ciático de los ratones diabéticos la responsable de la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Los resultados presentados en este trabajo apoyan esta hipótesis, ya que demuestran que la administración de inhibidores de la PKC a ratones diabéticos por inyección de aloxana es capaz de normalizar la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático.

Las determinaciones de la actividad PKC, realizadas *in vitro*, no muestran diferencias significativas entre las muestras procedentes de animales control y diabéticos (figura 17). Esto puede ser debido al método empleado para la determinación de la actividad PKC, ya que se requiere la utilización en el ensayo de activadores de PKC a dosis muy superiores a las fisiológicas, que podrían enmascarar las diferencias que existieran *in vivo* en la modulación de la PKC. Sin embargo, se puede afirmar que los inhibidores empleados son capaces

de alcanzar el territorio nervioso periférico y disminuir la actividad PKC en el mismo (figura 18), por lo que los efectos observados pueden ser atribuidos a esta disminución.

Los resultados presentados en la figura 18 demuestran que la PKC está inhibida en la fracción de membranas del nervio ciático de los ratones inyectados con H7 o con calfostin C, apoyando la idea de que la recuperación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa es debida a la inhibición de la PKC. La actividad en citosol no está inhibida, lo cual podría ser consecuencia de una retención de los inhibidores en las membranas celulares. Debido a que se considera que la PKC está activada cuando está unida a membrana e inactiva cuando está en el citosol (Nishizuka, 1986), los resultados más significativos son los referentes a la fracción de membranas, en la cual los inhibidores de la PKC sí ejercen su acción.

La posibilidad de que el H7 y el calfostin C recuperen la actividad Na^+/K^+ ATPasa por un mecanismo diferente al de la inhibición de la PKC puede ser prácticamente descartada. En este sentido, las potencias relativas del H7 y del calfostin C para recuperar la actividad Na^+/K^+ ATPasa son similares a sus potencias para inhibir la PKC. Además, ambos inhibidores actúan en diferentes dominios de la PKC: el H7 en el dominio catalítico y el calfostin C en el dominio regulador. Por todo ello, parece probable que ambos inhibidores actúen a través de kinasas.

La posibilidad de que ambos inhibidores modulen diferentes proteína kinasas puede considerarse poco probable. Aunque el H7 no es un inhibidor específico de PKC, ya que es capaz de inhibir proteína kinasas dependientes de AMPc y GMPc, la utilización de HA1004, que inhibe las últimas pero muy poco la PKC, no recupera la actividad PKC (tabla 4), lo cual sugiere que las proteína kinasas dependientes de AMPc y GMPc no participan en este proceso. El calfostin C, que es un inhibidor altamente específico de la PKC (Kobayashi *et al.*, 1989; Tamaoki y Nakano, 1990), ha reproducido los resultados obtenidos con H7, apoyando el que sea efectivamente la PKC la responsable de los

fenómenos estudiados. Sin embargo, no puede excluirse que pueda inhibir alguna proteína kinasa diferente aún no identificada.

En resumen, los resultados obtenidos con la administración de inhibidores de la PKC en los ratones diabéticos, previniendo y recuperando la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático, nos ha hecho sugerir la hipótesis de que la actividad PKC está incrementada, conduciendo a la fosforilación y consiguiente disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Estas alteraciones pueden ser revertidas durante periodos de tiempo considerables con la administración de inhibidores de la PKC. Además de su interés para el estudio de la fisiopatología de la neuropatía diabética, los resultados presentados ofrecen un posible tratamiento de esta complicación de la diabetes.

3. Alteraciones electrofisiológicas.

Como se comentó en el apartado 4.2.5. de la Introducción, la mayor parte de los autores describe una disminución de la VCN en los animales diabéticos de más de tres semanas de evolución. Los resultados presentados en el presente trabajo demuestran que, en tiempos de evolución menores (16 ± 3 días) y a la temperatura fisiológica de la cola del ratón (27°C), la VCN no está afectada (figura 19).

Sin embargo, la técnica utilizada, tal y como se ha descrito en el apartado 6 de Materiales y Métodos, controla de forma exhaustiva todos los parámetros que pueden influir en la VCN, especialmente la temperatura. De este modo, los resultados presentados en la figura 19 ponen de manifiesto que la determinación de la VCN a temperaturas distintas de la fisiológica (22°C y 37°C) evidencia de forma precoz una disminución significativa de la VCN. Los ratones del grupo diabético presentan una VCN un 20-25% menor que la del grupo control. Esta disminución es del mismo orden que las obtenidas en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Spüller *et al.*, 1987), en ratas espontáneamente diabéticas (Sima y Brismar, 1985) y en humanos (Schütt *et al.*, 1983).

Por otro lado, el tiempo en que se hicieron las determinaciones (16 ± 3 días después de la inducción de la diabetes) es más precoz que el considerado en los trabajos publicados recientemente sobre el tema (Bianchi *et al.*, 1987; Calcutt *et al.*, 1990; Carrington *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991). La explicación más adecuada para esta precocidad en la detección de una disminución de la VCN es, como han señalado trabajos previos realizados con la misma técnica electrofisiológica (Romá *et al.*, 1990), que la detección de disfunciones nerviosas se puede realizar más precozmente cuando la temperatura de la preparación se aleja de sus valores fisiológicos.

Los resultados presentados en la tabla 7 demuestran que la administración continua de calfofostin C durante 14 días no previene la disminución de la VCN presente a 22°C . Como se vio en la figura 16, esta pauta de administración mantenía normalizada la actividad Na^+/K^+ ATPasa durante los 14 días que duraba el experimento, lo cual permite afirmar que en el modelo experimental utilizado ambos fenómenos son aparentemente independientes.

De esta forma, los resultados presentados en este trabajo están de acuerdo con los numerosos autores que defienden el que la disminución de la VCN es independiente, o al menos no depende directamente, de la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Bianchi *et al.*, 1987; Calcutt *et al.*, 1990; Carrington *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991).

Este dato, consecuentemente, cuestiona la hipótesis recogida en la Introducción y defendida por numerosos autores, según la cual la disminución de la VCN está causada por la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, debido a que la disminución de esta actividad altera el potencial de Na^+ transmembrana, necesario para la génesis y conducción del potencial de acción nervioso (Mizuno *et al.*, 1992).

4. Defensa antioxidante y neuropatía diabética.

Los datos sobre la defensa antioxidante en el tejido nervioso periférico de

animales diabéticos, que, como vimos en el apartado 4.4.3. de la Introducción, está muy poco estudiada, permiten afirmar que este tejido en los animales diabéticos, está menos protegido frente al estrés oxidativo que en los animales del grupo control.

La concentración de glutatión en nervio ciático de ratón no se modifica con la inducción de la diabetes (figura 20), resultado que, por otra parte, ya había sido descrito anteriormente (Carrol *et al.*, 1986). Tampoco se observan diferencias en la actividad glutatión S-transferasa ni en la actividad glutatión peroxidasa frente a *t*-BOOH. Sin embargo, la descripción de la disminución de la actividad glutatión peroxidasa, que, como vimos en el apartado 4.4.1. de la Introducción, ocupa un puesto clave en el sistema de defensa antioxidante frente a los radicales libres de oxígeno (Raes *et al.*, 1987), supone una aportación importante al estudio de la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la neuropatía diabética.

A este respecto, la actividad glutatión peroxidasa se ha descrito incrementada (Matkovics *et al.*, 1982), disminuida (Uzel *et al.*, 1987) y no alterada (Kaji *et al.*, 1985) en eritrocitos de pacientes diabéticos, disminuida en células endoteliales aórticas de conejo diabético (Tagami *et al.*, 1992) y en cristalino cataratoso de enfermos diabéticos (Puertas *et al.*, 1993), incrementada en hígado, riñón y corazón de ratas diabéticas (Asayama *et al.*, 1989), etc. Sin embargo, se carecía de datos sobre su posible afectación en tejido nervioso periférico.

Una de las posibles explicaciones para la disminución de la actividad glutatión peroxidasa parte de la demostración de que las ratas sometidas a pérdidas importantes de peso, en ayunos más o menos prolongados (72 horas), presentan alteraciones en los sistemas de defensa antioxidante en diversos tejidos (incremento de la actividad catalasa en corazón y páncreas, disminución de la misma en hígado, incremento de la actividad glutatión peroxidasa en riñón, disminución de los niveles de glutatión en hígado) (Wohaieb y Godin, 1987a). Esta podría ser una explicación para la disminución de la actividad glutatión

peroxidasa observada en los experimentos presentados. Sin embargo, a los siete días de evolución de la diabetes la diferencia de peso entre los ratones del grupo control y el diabético no es significativa y sí lo es la de actividad glutatión peroxidasa. A los 21 días, ambas diferencias son significativas, pero la actividad glutatión peroxidasa es la misma que a los siete días de inducir la diabetes. Se puede descartar, por tanto, que las diferencias observadas sean debidas a la disminución de peso de los ratones diabéticos.

Otra de las posibles explicaciones, como se adelantó en el apartado 4.4.3. de la Introducción, especialmente por el hecho de que la disminución observada guarda una buena correlación negativa con los valores de glucemia (figura 22), es que la enzima glutatión peroxidasa sufra una glicosilación no enzimática, a pesar de que en un artículo reciente (Tagami *et al.*, 1992) se descarta que la disminución de actividad glutatión peroxidasa observada en células endoteliales aórticas de conejos diabéticos sea debida a la glicosilación no enzimática, ya que ha sido descrita en algunos casos en animales con glucemias bien controladas.

Sin embargo, se ha demostrado que la glicosilación no enzimática de una enzima antioxidante como la superóxido dismutasa modifica *in vitro* sus propiedades sin afectar a su actividad (Adachi *et al.*, 1991). Esta glicosilación sin modificación de la actividad no descarta, como ha sido propuesto por estos mismos autores (Adachi *et al.*, 1992), que el enzima glicosilado sea más susceptible a la degradación, y por tanto, puede ser causa de una menor defensa frente a radicales libres, como se comenta más adelante, y consecuentemente de posteriores complicaciones. También se ha demostrado *in vitro* la glicosilación no enzimática de otra enzima antioxidante, la glutatión reductasa, acompañada de la pérdida de su actividad enzimática (Blakytyn y Harding, 1992), de forma similar a como ocurre en los resultados presentados en el este trabajo.

Además se ha evidenciado indirectamente la presencia de glicosilación autooxidativa en nervio periférico de ratas diabéticas, demostrando que la administración de aminoguanidina normaliza la velocidad de conducción

nerviosa y el flujo sanguíneo nervioso (Kihara *et al.*, 1991).

Estos datos apoyan la hipótesis propuesta en el presente trabajo, según la cual la disminución que se ha observado en la actividad glutatión peroxidasa del nervio ciático de ratones diabéticos puede ser debida a glicosilación autooxidativa.

La alteración de la defensa antioxidante, que puede aparecer como consecuencia de la disminución de la actividad glutatión peroxidasa, podría favorecer la aparición de especies activadas de oxígeno. Como se adelantaba, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa es especialmente sensible a la inactivación por radicales libres (Searle y Wilson, 1980) y por peróxidos (Pigeolet *et al.*, 1990). La presencia de radicales libres provocaría alteraciones de la estructura de los aminoácidos y conduciría probablemente a modificaciones de la estructura primaria de la proteína que pueden conducir a la desnaturalización, fragmentación e inactivación. Además, es conocido que tras estas modificaciones la molécula de glutatión peroxidasa es más susceptible de ser degradada por proteasas (Pigeolet y Remacle, 1991).

Por tanto, si el nivel de destrucción de la glutatión peroxidasa es suficientemente importante, la defensa antioxidante de la célula quedaría sensiblemente disminuida frente a los agentes oxidantes, tanto por efecto de la glicosilación autooxidativa como por la acción de los radicales libres de oxígeno sobre la propia enzima, facilitando la destrucción de otras moléculas y estructuras celulares.

Se ha demostrado que una de las consecuencias de la presencia de estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos de membrana, puede producir la inhibición de la actividad de varias enzimas de membrana, entre ellas la Na^+/K^+ ATPasa (Kovachich y Mishra, 1981; Anderson y Means, 1985). También puede desencadenar la activación de la PKC, ya que se ha demostrado que los peróxidos de lípidos producen una activación de la PKC a concentraciones mucho menores que las de sus respectivos lípidos originales (O'Brian *et al.*,

1988). De este modo, la activación de la PKC y la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de animales diabéticos, anteriormente discutidas, podrían ser una respuesta celular precoz a la presencia de estrés oxidativo celular.

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de la PKC (presente, como hemos visto, en el tejido nervioso de animales diabéticos), conduce en diferentes modelos experimentales *in vitro*, a la generación intracelular de radicales libres de oxígeno (Perchellet y Perchellet, 1989), a la disminución de la actividad glutatión peroxidasa (Perchellet *et al.*, 1985) y a la disminución de la concentración intracelular de glutatión (Schäfer *et al.*, 1990), y que la inhibición de la PKC incrementa el contenido intracelular de glutatión (Romero *et al.*, 1992).

Los últimos datos aportados permiten comprobar que las dos hipótesis principales para explicar la fisiopatología de la neuropatía diabética estudiadas en el presente trabajo (activación de la PKC y estrés oxidativo) se interrelacionan, ya que la disminución de la actividad glutatión peroxidasa puede ser causa y consecuencia de la activación de la PKC, y ésta, a su vez, de la presencia de estrés oxidativo causado, entre otros, por la disminución de la actividad glutatión peroxidasa.

Finalmente, tres estudios recientes relacionan la presencia de estrés oxidativo con la disminución de la VCN provocada por la diabetes. En el primero de ellos, la administración de glutatión a ratas diabéticas previene parcialmente la disminución de la velocidad de conducción nerviosa motora (Bravenboer *et al.*, 1992). En los dos últimos, la administración de aminoguanidina, que previene la formación de productos de la glicosilación no enzimática, a ratas con diabetes inducida por estreptozotocina previene de forma parcial la disminución de la VCN (Yagihashi *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1992).

VI. CONCLUSIONES

1ª El modelo experimental utilizado en el presente trabajo, la inducción de diabetes en ratones por la administración subcutánea de 200 mg/Kg de aloxana, se ha mostrado adecuado para la reproducción y estudio de las alteraciones que la diabetes induce en la función nerviosa periférica.

2ª La disminución inducida por la diabetes de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en el nervio ciático del ratón, considerada un parámetro bioquímico de neuropatía diabética, es significativa desde el tercer día de evolución, manteniéndose en los mismos valores durante más de dos semanas.

3ª En nuestro modelo experimental, se ha descrito que la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático inducida por la diabetes, puede ser prevenida y revertida *in vivo* por la administración de inhibidores de la proteína kinasa C.

4ª La administración de H7 y calfostin C, inhibidores de la proteína kinasa C con diferente mecanismo de acción, ejerce un efecto beneficioso *in vivo* en la lesión nerviosa inducida por la diabetes, normalizando la actividad Na^+/K^+ ATPasa en nervio ciático de ratón diabético. Este efecto beneficioso es de mayor duración y se obtiene con dosis menores de calfostin C que de H7, tanto en su administración de forma aguda como continua.

5ª La administración aguda de H7 y calfostin C provoca una disminución de la actividad proteína kinasa C en nervio ciático de ratón. Por lo tanto, los efectos referidos en las conclusiones anteriores pueden ser atribuibles a la inhibición de la proteína kinasa C.

6ª Los ratones diabéticos presentan una disminución de la velocidad de conducción nerviosa motora máxima a las dos semanas de evolución, cuando se determina a temperaturas distintas de la fisiológica. Ésta es la demostración experimental más precoz, descrita hasta el momento, de esta alteración.

Conclusiones

7ª Ninguno de los inhibidores ensayados ha demostrado un efecto beneficioso sobre la disminución de la velocidad de conducción nerviosa inducida por la diabetes, mostrando que la relación entre la actividad Na^+/K^+ ATPasa y la velocidad de conducción nerviosa es indirecta.

8ª Nuestros resultados demuestran una disminución de la actividad glutatión peroxidasa en nervio ciático de ratones diabéticos, estable desde la primera semana de evolución.

9ª La elevada correlación de la disminución de la actividad glutatión peroxidasa con la glucemia nos permite proponer la glicosilación no enzimática como el posible mecanismo molecular de esta modificación.

CONSIDERACIONES FINALES

El presente trabajo de investigación ha contribuido a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la neuropatía diabética mediante aportaciones originales a las diferentes teorías propuestas para su explicación. Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de la activación de la proteína kinasa C en el establecimiento de algunas lesiones inducidas por la diabetes en el nervio periférico. Por otra parte, los resultados presentados confirman y apoyan la hipótesis de la implicación del estrés oxidativo en la génesis de la neuropatía diabética y demuestran la independencia de las alteraciones observadas en la velocidad de conducción nerviosa respecto de las descritas en la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

El estudio de la participación relativa de cada uno de estos mecanismos en la fisiopatología de la neuropatía diabética, así como de su influencia en otras alteraciones presentes en la misma, delimita un campo de investigación del que deben surgir las respuestas definitivas a las cuestiones planteadas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, W. y MacLeod, K. M. (1990)
Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats.
Br. J. Pharmacol. **101**, 465-471.
- Adachi, T.; Ohta, H.; Hirano, K.; Hayashi, K. y Marklund, S. L. (1991)
Non-enzymatic glycation of human extracellular superoxide dismutase.
Biochem. J. **279**, 263-267.
- Adachi, T.; Ohta, H.; Hayashi, K.; Hirano, K. y Marklund, S. L. (1992)
The site of nonenzymic glycation of human extracellular-superoxide dismutase in vitro.
Free Radical Biol. Med. **13**, 205-210.
- Adams, J. D. y Odunze, I. N. (1991)
Oxygen free radicals and Parkinson's disease.
Free Radical Biol. Med. **10**, 161-169.
- Adams, J. D.; Klaidman, L. K.; Odunze, I. N.; Shen, H. C. y Miller, C. A. (1991)
Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide and vitamin E.
Mol. Chem. Neuropathol. **14**, 213-226.
- Allen, C.; Duck, S. C.; Sufit, R. L.; Swick, H. M. y D'Alessio, D. J. (1992)
Glycemic control and peripheral nerve conduction in children and young adults after 5-6 mo of IDDM. Wisconsin Diabetes Registry.
Diabetes Care **15**, 501-507.
- Anderson, D. K. y Means, E. D. (1985)
Iron-induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone.
J. Free. Rad. Biol. Med. **1**, 59-64.
- Asaoka, Y.; Nakamura, S.; Yoshida, K. y Nishizuka, Y. (1992)
Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation.
TIBS **17**, 414-417.
- Asayama, K.; Hayashibe, H.; Dobashi, K.; Niitsu, T.; Miyao, A. y Kato, K. (1989)
Antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in various tissues of diabetic and starved rats.
Diabetes Research **12**, 85-91.
- Atienza, G.; Andres, M. D.; Rebolledo, E. y Aldegunde, M. (1992)
Brain tryptophan uptake and sodium-potassium ATPase activity in long-term streptozotocin diabetic rats.
Neurochem. Res. **17**, 289-292.

Awazu, M.; Parker, R. E.; Harvie, B. R.; Ichikawa, I. y Kon, V. (1991)
Down-regulation of endothelin-1 receptors by protein kinase C in streptozotocin diabetic rats.

J. Cardiovasc. Pharmacol. **17** (Suppl. 7), S500-502.

Ayo, S. H.; Radnik, R.; Garoni, J. A.; Troyer, D. A. y Kreisberg, J. I. (1991)
High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures.

Am. J. Physiol. **261**, F571-577.

Bertorello, A. M. y Aperia, A. (1989)

Na⁺,K⁺-ATPase is an effector protein for protein kinase C in renal proximal tubule cells.

Am. J. Physiol. **256**, F370-373.

Bertorello, A. M.; Aperia, A.; Walaas, I.; Nairn, A. C. y Greengard, P. (1991)

Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺/K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 11359-11362.

Bianchi, R.; Boccasavia, E.; Vitadello, M.; Schiavinato, A. y Gorio, A. (1987)

Sciatic nerve ATPase activity is unaffected in diabetic mutant C57BI/Ks (db/db) mice.

Diabetes **36**, 1082-1085.

Bianchi, R.; Marini, P.; Merlini, S.; Fabris, M.; Triban, C.; Mussini, E. y Fiori, M. G. (1988)

ATPase activity defects in alloxan-induced diabetic sciatic nerve recovered by ganglioside treatment.

Diabetes **37**, 1340-1345.

Bianchi, R.; Marelli, C.; Marini, P.; Fabris, M.; Triban, C. y Fiori, M. G. (1990)

Diabetic neuropathy in db/db mice develops independently of changes in ATPase and aldose reductase. A biochemical and immunohistochemical study.

Diabetologia **33**, 131-136.

Blakytyn, R. y Harding, J.J. (1992)

Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase.

Biochem. J. **288**, 303-307

Bravenboer, B.; Kappelle, A. C.; Hamers, F. P. T.; vanBuren, T.; Erkelens, D. W. y Gispen, W. H. (1992)

Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat.

Diabetologia **35**, 813-817.

Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T. P. M. y Sies, H. (1983)
Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide.
Biochem. Pharmacol. **32**, 2529-2534.

Brismar, T. y Sima, A. A. F. (1981)
Changes in nodal function in nerve fibers of the spontaneously diabetic BB-Wistar rat: potential clamp analysis.
Acta Physiol. Scand. **113**, 499-506.

Brismar, T.; Sima, A. A. F. y Greene, D. A. (1987)
Reversible and irreversible nodal dysfunction in diabetic neuropathy.
Ann. Neurol. **21**, 504-507.

Caccia, M. R.; Osio, M.; Dezuanni, E.; Bevilacqua, M.; Bertora, P. L.; Salvaggio, A.; Mangoni, A. y Norbiato, G. (1992)
Nerve conduction velocity distribution in normal subjects and in diabetic patients without clinical neuropathy. I. Motor nerve.
Electromyogr. Clin. Neurophysiol. **32**, 403-409.

Calcutt, N. A.; Tomlinson, D. R. y Biswas, S. (1990)
Coexistence of nerve conduction deficit with increased Na⁺-K⁺-ATPase activity in galactose-fed mice.
Diabetes **39**, 663-666.

Cameron, N. E.; Cotter, M. A.; Dines, K. y Love, A. (1992)
Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats.
Diabetologia **35**, 946-950.

Carrington, A. L.; Ettliger, C. B.; Calcutt, N. A. y Tomlinson, D. R. (1991)
Aldose reductase inhibition with imirestat-effects on impulse conduction and insulin-stimulation of Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase activity in sciatic nerves of streptozotocin-diabetic rats.
Diabetologia **34**, 397-401.

Carrol, P. B.; Thornton, B. M. y Greene, D. A. (1986)
Glutathione redox state is not the link between polyol pathway activity and myo-inositol-related Na⁺-K⁺-ATPase defect in experimental diabetic neuropathy.
Diabetes **35**, 1282-1285.

Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982)

Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters.

J. Biol. Chem. **257**, 7847-7851.

Charonis, A. S.; Reger, L. A.; Dege, J. E.; Kouzi-Koliakos, K.; Furcht, L. T.; Wohlhueter, R. M. y Tsilibary, E. C. (1990)

Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation.

Diabetes **39**, 807-814.

Cloez, I.; Tavarani, I.; Morel, F. y Bourre, J. M. (1989)

Alterations in protective enzymes against peroxidation in the central and peripheral nervous system of control and dysmyelinating mutant mice.

J. Neurochem. **52**, 1353-1358.

Cohen, G. (1985a)

Oxidative stress in the nervous system.

En: Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress*.

Academic Press, Londres, pp.: 383-402.

Cohen, M. P. (1985b)

Reduced glomerular sodium-potassium adenosine triphosphatase activity in acute streptozotocin diabetes and its prevention by oral sorbinil.

Diabetes **34**, 1071-1074.

Cohen, P. (1992)

Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.

TIBS **17**, 408-413.

Committee on Health Care Issues, American Neurological Association (1986)

Does improved control of glycemia prevent or ameliorate diabetic polyneuropathy?

Ann. Neurol. **19**, 288-290.

Craven, P. A. y DeRubertis, F. R. (1989)

Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats: Possible mediation by glucose.

J. Clin. Invest. **83**, 1667-1675.

Craven, P. A.; Davidson, C. M. y DeRubertis, F. R. (1990)

Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from *de novo* synthesis of glycerolipids.

Diabetes **39**, 667-674.

Darbon, J. M.; Oury, F.; Clamens, S. y Bayard, F. (1987)
TPA induces subcellular translocation and subsequent down-regulation of both phorbol ester binding and protein kinase C activity in MCF-7 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **146**, 537-546.

Das, P. K.; Bray, G. M.; Aguayo, A. J. y Rasminsky, M. (1976)
Diminished ouabain sensitive, sodium potassium ATPase activity in sciatic nerves of rats with streptozotocin induced diabetes.
Exp. Neurol. **53**, 285-288.

Downie, N. M. y Heath, R. W. (1977)
Métodos estadísticos aplicados.
Ediciones del Castillo, S.A., Madrid.

Dyck, P. J.; Sherman, W. R.; Hallcher, L. M.; Service, F. J.; O'Brien, P. C.; Grina, L. A.; Palumbo, P. J. y Swanson, C. J. (1980)
Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and *myo*-inositol related to sural nerve morphometry.
Ann. Neurol. **8**, 590-596.

Dyck, P. J.; Karnes, J. L.; O'Brien, P.; Okazaki, H.; Lais, A. y Engelstad, J. (1986)
The spatial distribution of fiber loss of diabetic polyneuropathy suggests ischemia.
Ann. Neurol. **19**, 440-449.

Dyck, P. J.; Zimmerman, B. R.; Vilen, T. H.; Minnerath, S. R.; Karnes, J. L.; Yao, J. K. y Poduslo, J. F. (1988)
Nerve glucose, fructose, sorbitol, *myo*-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy.
N. Engl. J. Med. **319**, 542-548.

Eggen, B. J. L. y Eichberg, J. (1992)
Phorbol ester-mediated stimulation of phospholipase D activity in sciatic nerve from normal and diabetics rats.
J. Neurochem. **58**, 1467-1473.

Engerman, R. L.; Kern, T. S. y Larson, M. E. (1990)
Nerve conduction velocity in dogs is reduced by diabetes and not by galactosemia.
Metabolism **39**, 638-640.

Epand, R. M. y Lester, D. S. (1990)
The role of membrane biophysical properties in the regulation of protein kinase C activity.
TIPS **11**, 317-320.

- Espí, F. (1989)
Neuropatías diabéticas.
Medicine **5**, 1579-1591.
- Fagerberg, S. E. (1959)
Diabetic neuropathy, a clinical and histological study on the significance of vascular affection.
Acta. Med. Scand. **345** (Supl.), 1-97.
- Finegold, D.; Lattimer, S.; Nolle, S.; Bernstein, M. y Greene, D. A. (1983)
Polyol pathway activity and *myo*-inositol metabolism.
Diabetes **32**, 988-992.
- Flaherty, J. T. y Weisfeldt, M. L. (1988)
Reperfusion injury.
Free Radical Biol. Med. **5**, 409-419.
- Foster, D. W. (1991)
Diabetes Mellitus.
En: Wilson, J.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G., Martin, J.B., Fauci, A.S. y Root, R.K. (eds.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*.
McGraw-Hill, Inc., New York, pp.: 1739-1759.
- Gabbay, K. H. (1973)
The sorbitol pathway and the complications of diabetes.
N. Engl. J. Med. **288**, 831-836.
- Gabbay, K. H.; Merola, L. O. y Field, R. A. (1966)
Sorbitol pathway: presence in the nerve and cord with substrate accumulation in diabetes.
Science **151**, 209-210.
- Gillon, K. R. W. y Hawthorne, J. N. (1983)
Sorbitol, miositol and nerve conduction in diabetes.
Life Sci. **32**, 1943-1947.
- Godin, D. V.; Wohaiieb, S. A.; Garnett, M. E. y Goumeniouk, A. D. (1988)
Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes.
Mol. Cell. Biochem. **84**, 223-231.
- Goldfarb, S.; Ziyadeh, F. N.; Kern, E. F. O. y Simmons, D. A. (1991)
Effects of polyol-pathway inhibition and dietary *myo*-inositol on glomerular hemodynamic function in experimental diabetes mellitus in rats.
Diabetes **40**, 465-471.

- Goldman, S. S. y Albers, R. W. (1973)
Sodium-Potassium-activated adenosine triphosphatase. IX. The role of phospholipids.
J. Biol. Chem. **248**, 867-874.
- Gorio, A.; Aporti, F.; DiGregorio, F.; Schiavinato, A.; Siliprandi, R. y Vitadello, M. (1984)
Ganglioside treatment of genetic and alloxan-induced diabetic neuropathy.
Adv. Exp. Med. Biol. **174**, 549-564.
- Greene, D. A. (1983)
Metabolic abnormalities in diabetic peripheral nerve: relation to impaired function.
Metabolism **32**, 118-123.
- Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1982)
Sodium and energy-dependent uptake of *myo*inositol by rabbit peripheral nerve.
J. Clin. Invest. **70**, 1009-1018.
- Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1983)
Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary *myo*-inositol supplementation.
J. Clin. Invest. **72**, 1058-1063.
- Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1984a)
Action of sorbinil in diabetic peripheral nerve: relationship of polyol (sorbitol) pathway inhibition to a *myo*-inositol-mediated defect in sodium-potassium ATPase activity.
Diabetes **33**, 712-716.
- Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1984b)
Impaired energy utilization and Na-K-ATPase in diabetic peripheral nerve.
Am. J. Physiol. **246**, E311-E318.
- Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1986)
Protein kinase C agonists acutely normalize decreased ouabain-inhibitable respiration in diabetic rabbit nerve. Implications for (Na,K)-ATPase regulation and diabetic complications.
Diabetes **35**, 242-245.
- Greene, D. A. y Mackway, A. M. (1986)
Decreased *myo*-inositol content and Na⁺-K⁺-ATPase activity in superior cervical ganglion of STZ-diabetic rat and prevention by aldose reductase inhibition.
Diabetes **35**, 1106-1108.

- Greene, D. A. y Winegrad, A. I. (1979)
In vitro studies of the substrates for energy production and the effects of insulin on glucose utilization in the neural components of peripheral nerve.
Diabetes **28**, 878-887.
- Greene, D. A. y Winegrad, A. I. (1981)
Effects of acute experimental diabetes on composite energy metabolism in peripheral nerve axons and Schwann cells.
Diabetes **30**, 967-974.
- Greene, D. A.; DeJesus, P. V. y Winegrad, A. I. (1975)
Effects of insulin and dietary *myo*inositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes.
J. Clin. Invest. **55**, 1326-1336.
- Greene, D. A.; Lewis, R. A.; Lattimer, S. A. y Brown, M. J. (1982)
Selective effects of *myo*-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozocin-diabetic rat.
Diabetes **31**, 573-578.
- Greene, D. A.; Yagihashi, S.; Lattimer, S. A. y Sima, A. A. F. (1984)
Nerve Na⁺-K⁺-ATPase, conduction and *myo*-inositol in the insulin deficient BB rat.
Am. J. Physiol. **247**, E534-539.
- Greene, D. A.; Lattimer, S. A.; Finegold, D. N. y Tamres, L. K. (1985a)
Impaired Na-dependent amino acid uptake in diabetic peripheral nerve: correction by aldose reductase inhibition or *myo*-inositol supplementation.
Clin. Res. **33**, 431A.
- Greene, D. A.; Lattimer, S.; Ulbrecht, J. y Carroll, P. (1985b)
Glucose-induced alterations in nerve metabolism: current perspective on the pathogenesis of diabetic neuropathy and future directions for research and therapy.
Diabetes Care **8**, 290-299.
- Greene, D. A.; Chakrabarti, S.; Lattimer, S. A. y Sima, A. A. F. (1987a)
Role of sorbitol accumulation and *myo*-inositol depletion in paranodal swelling of large myelinated nerve fibers in the insulin-deficient spontaneously diabetic Bio-Breeding rat: reversal by insulin replacement, an aldose reductase inhibitor, and *myo*-inositol.
J. Clin. Invest. **79**, 1479-1485.

Greene, D. A.; Lattimer, S. A. y Sima, A. A. F. (1987b)
Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications.
N. Engl. J. Med. **316**, 599-606.

Greene, D. A.; Lattimer, S. A. y Sima, A. A. F. (1988)
Are disturbances of sorbitol, phosphoinositide, and Na⁺-K⁺-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic neuropathy?
Diabetes **37**, 688-693.

Greene, D. A.; Lattimer, S. A. y Sima, A. A. F. (1990a)
Tissue-specific metabolic alterations in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy.
En: Belfiore, F.; Molinatti, G.M. y Reaven, G.M. (eds.) *Tissue-specific metabolic alterations in diabetes. Front diabetes.*
Karger, Basilea, pp.: 83-96.

Greene, D. A.; Sima, A. A. F.; Pfeifer, M. A. y Albers, J. W. (1990b)
Diabetic neuropathy.
Annu. Rev. Med. **41**, 303-317.

Greene, D. A.; Sima, A. A. F.; Stevens, M. J.; Feldman, E. L. y Lattimer, S. A. (1992)
Complications: Neuropathy, pathogenetic considerations.
Diabetes Care **15**, 1902-1925.

Gregersen, G. (1967)
Diabetic neuropathy: influence of age, sex, metabolic control and duration of diabetes on motor conduction velocity.
Neurology **17**, 972-980.

Gupta, S.; Ruderman, N. B.; Cragoe, E. J. y Sussman, I. (1991)
Endotelin stimulates Na⁺/K⁺-ATPase activity by a protein kinase C-dependent pathway in rabbit aorta.
Am. J. Physiol. **261**, H38-45.

Habig, W. H.; Pabst, M. J. y Jakoby, W. B. (1974)
Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.
J. Biol. Chem. **249**, 7130-7139.

Hannun, Y. A.; Loomis, C. R. y Bell, R. M. (1985)
Activation of protein kinase C by Triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine.
J. Biol. Chem. **260**, 10039-10043.

Hirata, Y. y Okuda, K. (1990)

Relation of Na⁺,K⁺-ATPase to delayed motor nerve conduction velocity: Effect of aldose reductase inhibitor, ADN-138, on Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Metabolism* **39**, 563-567.

Horisberger, J. D.; Lemas, V.; Kraehenbühl, J. P. y Rossier, B. C. (1991)

Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 565-584.

Huang, K.-P. (1989)

The mechanism of protein kinase C activation. *TINS* **12**, 425-432.

Hunt, J. V.; Smith, C. C. T. y Wolff, S. P. (1990)

Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* **39**, 1420-1424.

Inaba, H. y Filkins, J. P. (1991)

Antagonism of endotoxic glucose dyshomeostasis by protein kinase C inhibitors. *Am. J. Physiol.* **261**, R26-R31.

Inoue, M.; Kishimoto, A.; Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1977)

Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* **252**, 7610-7616.

Ishizuka, T.; Hoffman, J.; Cooper, D. R.; Watson, J. E.; Pushkin, D. B. y Farese, R. V. (1989)

Glucose-induced synthesis of diacylglycerol de novo is associated with translocation (activation) of protein kinase C in rat adipocytes. *FEBS Lett.* **249**, 234-238.

Kahn, R. (1992)

Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. *Muscle & Nerve* **15**, 1143-1170.

Kaji, H.; Kurasaki, M.; Ito, K.; Satio, T.; Satio, K.; Niioka, T.; Kojima, Y.; Ohsaki, Y.; Ide, H. y Tsuji, M. (1985)

Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic women. *Klin. Wochenschr.* **63**, 765-768.

- Khan, N. A.; Quemener, V. y Moulinoux, J. P. (1991)
Exogenous diacylglycerols downregulate the activity of Na⁺-K⁺ pump in *Xenopus laevis* oocytes.
Exp. Cell Res. **194**, 248-251.
- Kihara, M.; Schmelzer, J. D.; Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Nickander, K. K. y Low, P. A. (1991)
Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 6107-6111.
- Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1986)
Protein kinase C.
En: Boyer, P.D. y Krebs, E.G. (eds.) *The enzymes*.
Academic Press, Orlando, pp.: 167-189.
- Kim, J.; Kyriazi, H. y Greene, D. A. (1991a)
Normalization of Na⁺-K⁺-ATPase activity in isolated membrane fraction from sciatic nerves of streptozocin-induced diabetic rats by dietary myo-inositol supplementation in vivo or protein kinase C agonist in vitro.
Diabetes **40**, 558-567.
- Kim, J.; Rushovich, E. H.; Thomas, T. P.; Ueda, T.; Agranoff, B. W. y Greene, D. A. (1991b)
Diminished specific activity of cytosolic protein kinase C in sciatic nerve of streptozocin-induced diabetic rats and its correction by dietary myo-inositol.
Diabetes **40**, 1545-1554.
- Kiss, Z.; Deli, E.; Girard, R. P.; Pettit, G. R. y Kuo, J. F. (1987)
Comparative effects of polymyxin B, phorbol ester and bryostatin on protein phosphorylation, protein kinase C translocation, phospholipid metabolism and differentiation of HL60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **146**, 208-215.
- Kobayashi, E.; Ando, K.; Nakano, H.; Iida, T.; Ohno, H.; Morimoto, M. y Tamaoki, T. (1989)
Calphostins (UCN-1028), novel and specific inhibitors of protein kinase C.
J. Antibiotics **42**, 1470-1474.
- Kovachich, G. B. y Mishra, O. P. (1981)
Partial inactivation of Na, K,-ATPase in cortical brain slices incubated in normal Krebs-Ringer phosphate medium at 1 and 10 atm oxygen pressure.
J. Neurochem **36**, 333-335.

- Kunst, A.; Draeger, B. y Ziegenhorn, J. (1984)
D-glucose.
En: Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*.
Verlag Chemie, Weinheim, pp.: 163-172.
- Larkins, R. G. y Dunlop, M. E. (1992)
The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy.
Diabetologia **35**, 499-504.
- Lawrence, R. A.; Parkhill, L. K. y Burk, R. F. (1978)
Hepatic cytosolic non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency.
J. Nutr. **108**, 981-987.
- LeDoux, S. P.; Hall, C. R.; Forbes, P. M.; Patton, N. J. y Wilson, G. L. (1988)
Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity.
Diabetes **37**, 1015-1019.
- Lee, T. S.; MacGregor, L. C.; Fluharty, S. J. y King, G. L. (1989a)
Differential regulation of protein kinase C and (Na,K)-adenosine triphosphatase activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells.
J. Clin. Invest. **83**, 90-94.
- Lee, T. S.; Saltsman, K. A.; Ohashi, H. y King, G. L. (1989b)
Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**, 5141-5145.
- Li, Y. S.; Mahadik, S. P.; Rapport, M. M. y Karpiak, S. E. (1986)
Acute effects of GM1 ganglioside: reduction in both behavioral asymmetry and loss of Na⁺,K⁺-ATPase after nigrostriatal transection.
Brain. Res. **377**, 292-297.
- Linder, M. E. y Gilman, A. G. (1992)
Proteínas G.
Investigación y Ciencia **9**, 20-28.
- Linder, D.; Gschwendt, M. y Marks, F. (1991)
Down-regulation of protein kinase C in Swiss 3T3 fibroblasts is independent of its phosphorylating activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **176**, 1227-1231.
- Low, P. A. (1987)
Recent advances in the pathogenesis of diabetic neuropathy.
Muscle & Nerve **10**, 121-128.

- Low, P. A. y Nickander, K. K. (1991)
Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes.
Diabetes **40**, 873-877.
- Low, P. A.; Lagerlund, T. D. y McManis, P. G. (1989)
Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic, and ischemic neuropathy.
Int. Rev. Neurobiol. **31**, 355-438.
- Lowndes, J. M.; Hokin-Neaverson, M. y Bertics, P. J. (1990)
Kinetics of phosphorylation of Na⁺/K⁺-ATPase by protein kinase C.
Biochim. Biophys. Acta **1052**, 143-151.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- MacGregor, L. C. y Matschinsky, F. M. (1986)
Altered retinal metabolism in diabetes. II. Measurement of sodium-potassium ATPase and total sodium and potassium in individual retinal layers.
J. Biol. Chem. **261**, 4052-4058.
- MacGregor, L. C.; Rosecan, L. R.; Laties, A. M. y Matschinsky, F. M. (1986)
Altered retinal metabolism in diabetes. I. Microanalysis of lipid, glucose, sorbitol, and myo-inositol in the coroid and in the individual layers of the rabbit retina.
J. Biol. Chem. **261**, 4046-4051.
- Matkovics, B.; Varga, S. I.; Szabo, L. y Witas, H. (1982)
The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolizing enzymes.
Horm. Met. Res. **14**, 77-79.
- Mayhew, J. A.; Gillon, K. R. W. y Hawthorne, J. N. (1983)
Free and lipid inositol, sorbitol and sugars in sciatic nerve obtained post-mortem from diabetic patients and control subjects.
Diabetologia **24**, 13-15.
- McCord, J. M. (1985)
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.
N. Engl. J. Med. **312**, 159-163.
- Meister, A. (1988)
Glutathione metabolism and its selective modification.
J. Biol. Chem. **263**, 17205-17208.

Meister, A. y Anderson, M. E. (1983)
Glutathione.
Ann. Rev. Biochem. **52**, 711-760.

Michell, B. (1986)
Inositol phosphates. Profusion and confusion.
Nature **319**, 176-177.

Miquel, J. (1989)
Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research.
En: Miquel, J., Quintanilha, A.T. y Weber, H. (eds.) *CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*.
CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.: 3-13.

Mizuno, K.; Kato, N.; Matsubara, A.; Nakano, K. y Kurono, M. (1992)
Effects of a new aldose reductase inhibitor, (2*S*,4*S*)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro [chroman-4,4'-imidazoline]-2-carboxamide (SNK-860), on the slowing of motor nerve conduction velocity and metabolic abnormalities in the peripheral nerve in acute streptozotocin-induced diabetic rats.
Metabolism **41**, 1081-1086.

Moncada, S. (1980)
Prostacyclin and thromboxane A₂ in the regulation of platelet-vascular interactions.
En: Remuzzi, G., Mecca, G. y de Gaetano, G. (eds.) *Homeostasis, prostaglandins, and renal disease*.
Raven Press, Nueva York, pp.: 175-188.

Moncada, S. y Vane, J. R. (1979)
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and protacyclin.
Pharmacol. Rev. **30**, 293-331.

Monnier, V. M.; Sell, D. R.; Abdul-Karim, F. W. y Emancipator, S. N. (1988)
Collagen browning and cross-linking are increased in chronic experimental hyperglycemia. Relevance to diabetes and aging.
Diabetes **37**, 867-872.

Mordes, J. P. y Rossini, A. A. (1981)
Animal models of diabetes.
Am. J. Med. **70**, 353-360.

Mori, A.; Hiramatsu, M.; Yokoi, I. y Edamatsu, R. (1990)
Biochemical pathogenesis of post-traumatic epilepsy.
Pavlov J. Biol. Sci. **25**, 54-62.

Muller-Felber, W.; Landgraf, R.; Wagner, S.; Mair, N.; Nusser, J.; Landgraf-Leurs, M. M.; Abendroth, A.; Ilner, W. D. y Land, W. (1991)
Follow-up study of sensory-motor polyneuropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects after simultaneous pancreas and kidney transplantation and after graft rejection.
Diabetologia **34** (Suppl. 1), S113-117.

Muona, P.; Sollberg, S.; Peltonen, J. y Uitto, J. (1992)
Glucose transporters of rat peripheral nerve. Differential expression of GLUT1 gene by Schwann cells and perineurial cells in vivo and in vitro.
Diabetes **41**, 1587-1596.

Nishizuka, Y. (1984)
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion.
Nature **308**, 693-697.

Nishizuka, Y. (1986)
Studies and perspectives of protein kinase C.
Science **233**, 305-312.

Nishizuka, Y. (1988)
The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.
Nature **334**, 661-665.

Nishizuka, Y. (1989)
Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation.
Cancer **63**, 1892-1903.

Norido, F.; Canella, R.; Zanoni, R. y Gorio, A. (1984)
Development of diabetic neuropathy in the C57BI/Ks (db/db) mouse and its treatment with gangliosides.
Exp. Neurol. **83**, 221-232.

O'Brian, C. A.; Ward, N. E.; Weinstein, I. B.; Bull, A. W. y Marnett, L. J. (1988)
Activation of rat brain protein kinase C by lipid oxidation products.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **155**, 1374-1380.

Oberley, L. W. (1988)
Free radicals and diabetes.
Free Radical Biol. Med. **5**, 113-124.

Odetti, P. R.; Borgoglio, A.; Pascale, A.; Rolandi, R. y Adezati, L. (1990)
Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked
fluorescence by aminoguanidine and rutin.
Diabetes **39**, 796-801.

Okamura, K.; Akiyama, N.; Hashimoto, H.; Ogawa, K. y Satake, T. (1988)
Alteration of 1,2-diacylglycerol content in myocardium from diabetic rats.
Diabetes **37**, 1168-1172.

Oughton, J. y Barnes, A. J. (1981)
Red cell filterability in diabetes mellitus; its relation to other methods of
measuring deformability and to blood viscosity.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. **41** (Supl. 156), 147-150.

Paisley, R. B.; Harkness, J.; Hartog, M. y Chadwick, T. (1980)
The effect of improvement in diabetic control on plasma and whole blood
viscosity.
Diabetologia **19**, 345-349.

Penefsky, H. S. y Bruist, M. F. (1984)
Adenosinetriphosphatases.
En: Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*.
Verlag Chemie, Weinheim, pp.: 324-335.

Penn, J. S. (1990)
Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation
reaction.
Doc. Ophthalmol. **74**, 179-186.

Perchellet, J. P. y Perchellet, E. M. (1989)
Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin.
Free Radical Biol. Med. **7**, 377-408.

Perchellet, J. P.; Perchellet, E. M.; Orten, D. K. y Schneider, B. A. (1985)
Inhibition of the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse
epidermal glutathione peroxidase and ornithine decarboxylase activities by
glutathione level-raising agents and selenium-containing compounds.
Cancer Lett. **26**, 283-293.

Peterson, G. L. (1977)
A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more
generally applicable.
Anal. Biochem. **83**, 346-356.

Pigeolet, E. y Remacle, J. (1991)
Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals.
Free Radical Biol. Med. **11**, 191-195.

Pigeolet, E.; Corbisier, P.; Houbion, A.; Lambert, D.; Michiels, C.; Raes, M.; Zachary, M. D. y Remacle, J. (1990)
Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
Mech. Age. Dev. **51**, 283-297.

Pirart, J. (1978)
Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973.
Diabetes Care **1**, 168-263.

Pitts, N. E.; Vreeland, F. y Shaw, G. L. (1986)
Clinical experience with sorbinil, an aldose reductase inhibitor.
Metabolism **35** (Suppl), 96-100.

Puertas, F. J.; Bosch-Morell, F.; Chipont, E.; Navea, A.; Raya, A.; Hermenegildo, C.; Clemente, M.; Díaz-Llopis, M. y Romero, F. J. (1993)
Enzymatic conjugation of lipid peroxidation products and glutathione peroxidase activity in human lens. Comparative study of donors' vs cataractous lenses from diabetic and non-diabetic patients.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **34**, 913.

Pugazhenthii, S.; Mantha, S. V. y Khandelwal, R. L. (1990)
Decrease of liver protein kinase C in streptozotocin-induced diabetic rats and restoration by vanadate treatment.
Biochem. Int. **21**, 651-657.

Raes, M.; Michiels, C. y Remacle, J. (1987)
Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase.
Free Radical Biol. Med. **3**, 3-7.

Rampling, M. W.; Feher, M. D.; Sever, P. S. y Elkeles, R. S. (1989)
Haemo-rheological disturbances in non-insulin-dependent diabetes and the effects on concomitant hypertension.
Clin. Hemorheol. **9**, 101-107.

Raya, Á.; Romá, J.; Hermenegildo, C. y Romero, F. J. (1993)
Alterations in the antioxidant defense of peripheral nervous tissue following acute ethanol administration.
Biochem. Soc. Trans. **21**, 92S.

- Romá, J. y Soria, B. (1984)
Isonicotinic acid hidrazide: early effects on peripheral nerve conduction velocity.
Experientia **40**, 378-380.
- Romá, J.; Cuervo, A. M.; Macián, F.; Raya, Á.; Gallego, J.; Llopis, J. E. y Romero, F. J. (1990)
Temperature dependence of the toxic effects of phenytoin on peripheral neuromuscular function of the rat tail.
Neurotoxicol. Teratol. **12**, 627-631.
- Romero, F. J.; Segura-Aguilar, J.; Monsalve, E.; Hermenegildo, C.; Nies, E.; Puertas, F. J. y Romá, J. (1990)
Antioxidant and glutathione-related enzymatic activities in rat sciatic nerve.
Neurotoxicol. Teratol. **12**, 603-605.
- Romero, F. J.; Monsalve, E.; Hermenegildo, C.; Puertas, F. J.; Higuera, V.; Nies, E.; Segura-Aguilar, J. y Romá, J. (1991)
Oxygen toxicity in the nervous tissue: comparison of the antioxidant defense of rat brain and sciatic nerve.
Neurochem. Res. **16**, 157-161.
- Romero, F. J.; Llopis, J.; Felipo, V.; Miñana, M. D.; Romá, J. y Grisolia, S. (1992)
H7, a protein kinase C inhibitor, increases the glutathione content of neuroblastoma cells.
FEBS Lett. **303**, 19-21.
- Sanmartí, A. M.; Lucas, A. y Salinas, I. (1991)
Lo fundamental en diabetes mellitus.
Ediciones Doyma, S.A., Barcelona.
- Schäfer, A.; Wieser, R. J.; Romero, F. J. y Oesch, F. (1990)
Reduction of glutathione content by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in confluent but not in sparse cultures of human diploid fibroblasts.
Carcinogenesis **11**, 697-699.
- Schütt, P.; Muche, H. y Lehmann, H. J. (1983)
Refractory period impairment in sural nerves of diabetics.
J. Neurol. **229**, 113-119.
- Searle, A. J. y Wilson, R. L. (1980)
Glutathione peroxidase: effect of superoxide, hydroxyl and bromine free radicals on enzyme activity.
J. Radiat. Biol. **37**, 213-217.

Sharma, A. K.; Thomas, P. K.; Gabriel, G.; Stolinski, C.; Dockery, P. y Hollins, G. W. (1983)

Peripheral nerve abnormalities in the diabetic mutant mouse.
Diabetes **32**, 1152-1161.

Sies, H. (1985)

Oxidative Stress: introductory remarks.

En: Sies, H. (ed.) *Oxidative Stress*.
Academic Press, Londres, pp.: 1-8.

Sies, H. (ed.) (1991)

Oxidative stress: oxidants and antioxidants.
Academic Press, Londres.

Sima, A. A. F. y Brismar, T. (1985)

Reversible diabetic nerve dysfunction: structural correlates to electrophysiological abnormalities.
Ann. Neurol. **18**, 21-29.

Sima, A. A. F. y Hay, K. (1981)

Functional aspects and pathogenetic considerations of the neuropathy in the spontaneously diabetic BB-Wistar rat.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. **7**, 341-350.

Sima, A. A. F.; Nathaniel, V.; Prashar, A.; Bril, V. y Greene, D. A. (1991)

Endoneurial microvesels in human diabetic neuropathy: endothelial cell dysfunction and lack of treatment effect by aldose reductase inhibitor.
Diabetes **40**, 1090-1099.

Simmons, D. A.; Kern, E. P. O.; Winegrad, A. I. y Martin, D. B. (1986)

Basal phosphatidyl inositol turnover control aortic Na⁺-K⁺ ATPase activity.
J. Clin. Invest. **77**, 503-513.

Skyler, J. S. (1989)

Etiología, patogenia y tratamiento de la diabetes mellitus.

En: Lavin, N. (ed.) *Manual de Endocrinología y Metabolismo*.
Salvat Editores, S.A., Barcelona, pp.: 669-678.

Smith, W. J.; Diemel, L. T.; Leach, R. M. y Tomlinson, D. R. (1991)

Central hypoxaemia in rats provokes neurological defects similar to those seen in experimental diabetes mellitus: evidence for a partial role of endoneurial hypoxia in diabetic neuropathy.
Neuroscience **45**, 255-259.

Sonobe, M.; Yasuda, H.; Hisanaga, T.; Maeda, K.; Yamashita, M.; Kawabata, T.; Kikkawa, R.; Taniguchi, Y. y Shigeta, Y. (1991)

Amelioration of nerve Na⁺/K⁺-ATPase activity independently of myo-inositol level by PGE1 analogue OP-1206.alpha-CD in streptozocin-induced diabetic rats.

Diabetes **40**, 726-730.

Spüller, M.; Dimpfel, W. y Tüllner, H. U. (1987)

Effect of gangliosides on nerve conduction velocity during diabetic neuropathy in the rat.

Arch. Int. Pharmacodyn. **287**, 211-223.

Spüler, M.; Dimpfel, W. y Tüllner, H. U. (1988)

Ganglioside therapy in experimental diabetic neuropathy.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. **38**, 881-884.

Stribling, D.; Mirrlees, D. J.; Harrison, H. E. y Earl, D. C. N. (1985)

Properties of ICI 128.436, a novel aldose reductase inhibitor and its effects on diabetic complications in the rat.

Metabolism **34** (Suppl.), 336-344.

Studer, R. K.; Craven, P. A. y DeRubertis, F. R. (1993)

Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium.

Diabetes **42**, 118-126.

Suzuki, K.; Yen-Chung, H.; Toyota, T.; Goto, Y.; Hirata, Y. y Okada, K. (1990)

The significance of nerve sugar levels for the peripheral nerve impairment of spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats.

Diabetes Res. **14**, 21-25.

Tagami, S.; Kondo, T.; Yoshida, K.; Hirokawa, J.; Ohtsuka, Y. y Kawakami, Y. (1992)

Effect of insulin on impaired antioxidant activities in aortic endothelial cells from diabetic rabbits.

Metabolism **41**, 1053-1058.

Takai, Y.; Kishimoto, A.; Inoue, M. y Nishizuka, Y. (1977)

Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum.

J. Biol. Chem. **252**, 7603-7609.

Tamaoki, T. y Nakano, H. (1990)

Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin.

BioTechnology **8**, 732-735.

Tesfamariam, B.; Brown, M. L. y Cohen, R. A. (1991)
Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C.
J. Clin. Invest. **87**, 1643-1648.

Tilton, R. G.; Baier, L. D.; Harlow, J. E.; Smith, S. R.; Ostrow, E. y Williamson, J. R. (1992)
Diabetes-induced glomerular dysfunction: Links to a more reduced cytosolic ratio of NADH/NAD⁺.
Kidney International **41**, 778-788.

Tomlinson, D. R. y Ettlinger, C. B. (1992)
Protein kinase C modulation of the sodium pump of peripheral nerve.
Br. J. Pharmacol. **105**, 68P.

Tomlinson, D. R. y Mayer, J. H. (1985)
Reversal of deficits in axonal transport and nerve conduction velocity by treatment of streptozocin diabetic rats with *myo*-inositol.
Exp. Neurol. **89**, 420-427.

Triban, C.; Guidolin, D.; Fabris, M.; Marini, P.; Schiavinato, A.; Dona, M.; Bortolami, M. C.; DiGiamberardino, L. y Fiori, M. G. (1989)
Ganglioside treatment and improved axonal regeneration capacity in experimental diabetic neuropathy.
Diabetes **38**, 1012-1022.

Tuck, R. R.; Schmelzer, J. D. y Low, P. A. (1984)
Endoneurial blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy.
Brain **107**, 935-950.

Uzel, N.; Sivas, A.; Uysal, M. y Öz, H. (1987)
Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus.
Horm. Metab. Res. **19**, 89-90.

Viña, J. R.; Sáez, G. T. y Viña, J. (1989)
The physiological functions of glutathione.
En: Miquel, J., Quintanilla, A.T. y Weber, H. (eds.) *CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*.
CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.: 121-132.

Wali, R. K.; Dudeja, P. K.; Bolt, M. J. G.; Sitrin, M. D. y Brasitus, T. A. (1990)
Correction of abnormal small intestinal cytosolic protein kinase C activity in streptozotocin-induced diabetes by insulin therapy.
Biochem. J. **272**, 653-658.

Whitely, S. R. y Tomlinson, D. R. (1985)
Motor nerve conduction velocity and nerve polyols in mice with sort-term genetic or streptozocin-induced diabetes.
Exp. Neurol. **89**, 314-321.

Williams, B. y Schirier, R. W. (1992)
Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells.
Diabetes **41**, 1464-1472.

Winegrad, A. I. (1987)
Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes?
Diabetes **36**, 396-406.

Wohaieb, S. A. y Godin, D. V. (1987a)
Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats.
Diabetes **36**, 169-173.

Wohaieb, S. A. y Godin, D. V. (1987b)
Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat.
Diabetes **36**, 1014-1018.

Wohaieb, S. A. y Godin, D. V. (1987c)
Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB Wistar) rat.
Can. J. Physiol. Pharmacol. **65**, 2191-2195.

Wolf, S. P.; Jiang, Z. Y. y Hunt, J. V. (1991)
Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing.
Free Radical Biol. Med. **10**, 339-352.

Yagihashi, S.; Kamijo, M.; Ido, Y. y Mirrlees, D. J. (1990)
Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy. Ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozocin-induced diabetic rats.
Diabetes **39**, 690-696.

Yagihashi, S.; Kamijo, M.; Baba, M.; Yagihashi, N. y Nagai, K. (1992)
Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of STZ-induced diabetic rats.
Diabetes **41**, 47-52.

Yorek, M. A.; Dunlap, J. A. y Leeney, E. M. (1989)
Effect of galactose and glucose levels and sorbinil treatment on *myo*-inositol metabolism and Na⁺/K⁺-pump activity in cultures neuroblastoma cells.
Diabetes **38**, 996-1004.

Yorek, M. A.; Dunlap, J. A. y Stefani, M. R. (1991)
Restoration of Na⁺-K⁺ pump activity and resting membrane potential by *myo*-inositol supplementation in neuroblastoma cells chronically exposed to glucose or galactose.
Diabetes **40**, 240-248.

Zhu, X. y Eichberg, J. (1990)
1,2-diacylglycerol content and its arachidonyl-containing molecular species are reduced in sciatic nerve from streptozotocin-induced diabetic rats.
J. Neurochem. **55**, 1087-1090.