



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**“Regulación de la COX-2 por el NaCl en la Macula Densa durante la Diabetes**

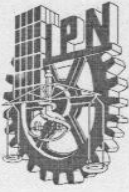
**Mellitus inducida en ratas**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA  
PRESENTA:

M.C. y P. ESTIBEYESBO SAID SIGMUND REIVAJ PLASCENCIA NIETO

DIRECTOR DE TESIS  
DR. EN C. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ

México D.F. 2006



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 13 del mes de junio del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. M. para examinar la tesis de grado titulada:

**“Regulación de la COX-2 por el NaCl en la Mácula Densa durante la Diabetes Mellitus inducida en ratas”**

Presentada por el alumno:

PLASCENCIA  
Apellido paterno

NIETO  
materno

ESTIBEYESBO SAID SIGMUND REIVAJ  
nombre(s)

Con registro: 

A	0	4	0	5	6	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

DR. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ

DRA. ROSA AMALIA BOBADILLA LUGO

DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ

DR. ÁNGEL MILIAR GARCÍA

DR. SANTIAGO VILLAFAÑA RAUDA

### EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I. P. N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D. F. el día 05 del mes de octubre del año 2006, el que suscribe **Estibeyesbo Said Sigmud Reivaj Plascencia Nieto**, alumno del Programa de **Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología** con número de registro **A040565**, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Pedro López Sánchez** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Regulación de la COX-2 por el NaCl en la Mácula Densa durante la Diabetes Mellitus inducida en ratas”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **saidpn@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**ESTIBEYESBO SAID SIGMUD REIVAJ PLASCENCIA NIETO**  
Nombre y firma

# ÍNDICE

	pag
S14	i
CESION DE DERECHOS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi

---

I. INTRODUCCIÓN	
1. Diabetes Mellitus	1
1.1. Definición	1
1.2. Descripción	1
1.3. Epidemiología	2
1.4. Clasificación	2
1.4.1. Diabetes Mellitus tipo 1	4
1.4.2. Diabetes Mellitus tipo 2	4
1.4.3. Otros tipos específicos	5
1.4.4. Diabetes Gestacional	5
1.5. Modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina	6
1.6. Complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus	7
2. NEFROPATÍA DIABÉTICA	7
2.1. Fisiología de la filtración glomerular	8
2.2. Fisiopatología de las complicaciones crónicas de la DM	12
2.2.1. Cambios estructurales	12
2.2.2. Factores metabólicos	13
2.2.2.1. Vía del Poliol	13
2.2.2.2. Protein cinasa C	14
2.2.2.3. Glucosilación no enzimática de proteínas	14
2.2.3. Factores hemodinámicos	15
2.2.4. Hipertrofia renal	15
3. CICLOOXIGENASA 2	19
3.1. Historia	19
3.2. Estructura	20

3.3. Control de la expresión génica	21
3.4. Ciclooxigenasa 2 en el riñon	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
II. HIPÓTESIS	29
III. OBJETIVOS	29
1. OBJETIVOS GENERAL	29
2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	30
1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
2. ANÁLISIS POR INMUNOBLOT DE LA COX-2 EN LA CORTEZA RENAL DE RATA	30
2.1. Homogenización	33
2.2. Determinación de la concentración de proteínas	34
2.3. Electroforesis	35
2.4. Transferencia	37
2.5. Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos	37
2.6. Reacción de Quimioluminiscencia	38
3. TINCIÓN DE LA CORTEZA RENAL DE RATA	39
4. ANÁLISIS DE ORINA Y PLASMA	40
4.1. Determinación de la concentración de Glucosa en sangre	40
4.2. Determinación de la concentración de Na <sup>+</sup> y creatinina en orina y suero	40
4.3.- Determinación de Proteínas en orina	41
V. ESTADÍSTICA	42
VI. RESULTADOS	43
1. REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE DIABETES	43
2. TAMAÑO RENAL	46
3. FUNCIÓN RENAL	47
4. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE COX-2 EN EL RIÑÓN DE RATAS CONTROL Y DIABÉTICAS	49
5. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2	50
5.1 Tamaño renal con los diferentes tratamientos	57
5.2. Función renal de los grupos con los diferentes tratamientos	61
5.3 Efecto de la DM y los tratamientos sobre la expresión de la COX-2	65
6. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE RATAS DIABÉTICAS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	67
VII. DISCUSIÓN	71

1. REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE DIABETES	71
2. EXPRESIÓN DE LA COX-2 EN LOS GRUPOS CONTROL Y DIABÉTICAS	72
3. MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 POR LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	74
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. REFERENCIAS	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1.1. Aparato yuxtaglomerular	9
Fig. 1.2. Reabsorción del NaCl a través de la nefrona	12
Fig. 1.3. Factores metabólicos	15
Fig. 1.4. Hipertrofia renal	18
Fig. 1.5. Hiperfiltración glomerular	18
Fig. 1.6. Estructuras por cristalografía de la COX-1 y COX-2	21
Fig. 1.7. Dominios funcionales de COX-1 y COX-2	22
Fig. 1.8. Señalización intracelular para la COX-2	22
Fig. 1.9. Biosíntesis de prostaglandinas	24
Fig. 4.1. Célula del túbulo proximal	32
Fig. 4.2. Componentes del sándwich de transferencia	37
Fig. 6.1.1-6.1.3 Glucemia de ratas control y diabéticas	44
Fig. 6.1.4 Peso de ratas control y diabéticas	45
Fig. 6.1.5 Ingesta de Agua de ratas control y diabéticas	45
Fig. 6.1.6 Ingesta de alimento de ratas control y diabéticas	45
Fig. 6.1.7 Volumen urinario de ratas control y diabéticas	46
Fig. 6.2.1. Peso del riñón de ratas control y diabéticas	46
Fig. 6.2.1. Área celular del túbulo proximal de ratas control y diabéticas	47
Fig. 6.3.1. Proteinuria de los grupos control diabéticas	48
Fig. 6.3.2 Depuración de creatinina de ratas control y diabéticas	48
Fig. 6.3.3 Sodio en sangre de ratas control y diabéticas	49
Fig. 6.3.4 Excreción de sodio en orina de 24 h de ratas control y diabéticas	49
Fig. 6.4.1. Expresión de la COX-2 de ratas control y diabéticas	50
Fig. 6.5.1 Glucemia de los grupos control y diabéticas alto sodio	51
Fig. 6.5.2 Glucemia de los grupos control y diabéticas bajo sodio	52
Fig. 6.5.3 Glucemia de los grupos vehiculo, control y diabéticas acetazolamida	53
Fig. 6.5.4-6.5.6 Peso de los grupos control y diabéticas alto sodio	54
Fig. 6.5.7-6.5.8 Ingesta de alimento y agua en 24 h tratadas con alto sodio	55
Fig. 6.5.9. Volumen urinario en 24 h de ratas tratadas con alto sodio	55
Fig. 6.5.10-6.5.12 Ingesta de agua, alimento y volumen urinario	

	Pág.
de ratas tratadas con bajo sodio	56
Fig. 6.5.13-6.5.15 Ingesta de agua, alimento y volumen urinario	
de ratas tratadas con acetazolamida	57
Fig. 6.5.1.1-6.5.1.3 Peso de los riñones de ratas tratadas	58
Fig. 6.5.1.4-6.5.1.6 Área de las células tubulares proximales	
de las ratas tratadas	59
Fig. 6.5.2.1-6.5.2.3 Proteinuria de las ratas tratadas	61
Fig. 6.5.2.4-6.5.2.6 Depuración de creatinina de las ratas tratadas	62
Fig. 6.5.2.7-6.5.2.9 Concentración de Na <sup>+</sup> en suero de ratas tratadas	63
Fig. 6.5.2.10-6.5.2.12 Concentración de Na <sup>+</sup> en orina de ratas	
tratadas	64
Fig. 6.5.3.1. Expresión de la COX-2 de ratas tratadas con alto Na <sup>+</sup>	65
Fig. 6.5.3.2. Expresión de la COX-2 de ratas tratadas con bajo Na <sup>+</sup>	66
Fig. 6.5.3.3. Expresión de la COX-2 de ratas tratadas con	
Acetazolamida	67
Fig. 6.6.1. Peso renal de ratas tratadas contra diabéticas y control	67
Fig. 6.6.2. Área celular tubular proximal de ratas tratadas contra	
diabéticas y control	68
Fig. 6.6.3. Proteinuria de ratas tratadas contra diabéticas y control	69
Fig. 6.6.4. Depuración de creatinina de ratas tratadas contra	
diabéticas y control	69
Fig. 6.6.5. Expresión de la COX-2 de las ratas tratadas contra	
diabéticas y control	70



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosin Difosfato
AMP	Adenosin Monofosfato cíclico
ATP	Adenosin Trifosfato
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CRE	Elementos de respuesta a AMPc
cTALH	Células de la rama ascendente del asa de Hele
DM	Diabetes mellitus
DMID	Diabetes mellitus insulino dependiente
DMNID	Diabetes mellitus no insulina dependiente
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Acido desoxirribonucleico
GADG's	Auto anticuerpos a ácido glutámico descarboxilasa
IAA's	Auto anticuerpos a insulina
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
Kb	Kilobase
MD	Mácula densa
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NaCl	Cloruro de sodio
ND	Nefropatía Diabética
NPF	Presión de filtración neta
ODC	Ornitin descarboxilasa
ON	Óxido Nítrico
PAN	Péptido auricular natriurético
PCK	Protein cinasa c
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGA	Productos de glucosilación avanzada
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>

PGI	Prostaciclina
PVDF	Fluoruro de Polivinildieno
RNA	Acido Ribonucleico
RTG	Retroalimentación túbulo glomerular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
STZ	Estreptozotocina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida
TFG	Tasa de Filtración glomerular
TFG $\alpha$	Factor de crecimiento transformante $\alpha$
TFG $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas asociadas con daño a múltiples órganos incluyendo la falla renal (O`Bryan et al 1997). En la DM se ha descrito hipertrofia tubular proximal (Thomson et al., 2001 and 2004). La patogénesis de la nefropatía diabética aun es poco entendida y aunque no hay una causa que desarrolle la hiperfiltración glomerular, la mayor parte resulta del incremento en la reabsorción tubular proximal (Vallon V et al., 2002).

En condiciones normales, la expresión de la COX-2 aumenta en la mácula densa con la restricción de cloruro de sodio; este aumento es importante para la regulación del tono arteriolar aferente a través de un mecanismo conocido como retroalimentación tubuloglomerular (Harris et al., 2000 and 2001).

En este trabajo, proponemos que la DM induce cambios en el túbulo proximal que produce un incremento de la expresión de la COX-2 en la corteza renal y que el NaCl regula este fenómeno.

Usamos ratas Wistar macho con peso de  $250 \pm 20$  g divididas en 2 grupos (n=6): ratas control y ratas diabéticas. La DM fue inducida usando estreptozotocina (65 mg/kg). Siete subgrupos experimentales fueron tratados con dieta alta en sodio (0.8%), dieta baja sodio (0.02%) y acetazolamida (5 mg/kg) durante 7 días. Monitoreamos niveles de glucosa en sangre, ingesta de agua, ingesta de alimento, volumen urinario, peso renal, área renal, proteinuria, excreción de  $\text{Na}^+$ , creatinina plasmática y urinaria. La corteza renal fue usada para medir la expresión de la COX-2 por inmunoblot. La  $\beta$ -actina fue usada como control interno. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y después por la prueba de Tuckey, Los resultados fueron considerados significativos cuando  $p < 0.05$

En las ratas diabéticas alimentadas con bajo sodio hubo una mayor expresión de la COX-2 comparadas con las ratas diabéticas tratadas con dieta normal.

En las ratas diabéticas alimentadas con dieta alta en sodio y al de acetazolamida, la expresión fue menor que las alimentadas con dieta normal y dieta baja en sodio.

Este estudio da evidencia de que en la DM, el riñón se hipertrofia y la concentración de NaCl regula la expresión de la COX-2 en ratas diabéticas.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases associated with long-term damage and multiple organ dysfunction including renal failure (O`Bryan et al 1997). In early Diabetes mellitus it has been described proximal tubule hypertrophy (Thomson et al., 2001 and 2004). The pathogenesis of diabetic nephropathy is poorly understood and although no single cause has emerged for glomerular hyperfiltration, a major portion of it results from a primary increase in proximal tubular reabsorption (Vallon V et al., 2002).

In normal conditions, COX-2 expression increases in macula densa with salt restriction; this enhanced expression is important for regulation of afferent arteriolar tone through tubuloglomerular feedback mechanisms (Harris et al., 2000 and 2001).

The proximal tubule hypertrophy in early DM causes a primary increase in proximal tubular reabsorption (Blantz et al., 2003). The enhanced reabsorption reduce the NaCl which is the signal at the macula densa (Polloc et al 1991) to activate tubuloglomerular feedback to increase GFR (Vallon et al., 2003). Who to regulate this phenomenon is COX-2, its expression increase significantly with salt depletion (Harris et al., 2000)

In this work, we propose that DM induced changes in proximal tubule produce an increase of COX-2 expression in the renal cortex and NaCl regulates this phenomenon.

We used male Wistar rats weighing  $250\pm 20$  g set in 2 groups (N=6): control and diabetic rats. DM was induced using Streptozotocin (65 mg/kg). We work with 7 experimental groups that were treated with high salt diet (0.8%), low salt diet (0.02%) and acetazolamide (5 mg/kg) during 7 days. We monitored glucose levels, food intake, water intake, urinary volume, renal weight, proximal tubule cell area, proteinuria,  $\text{Na}^+$  excretion, plasma and urinary creatinine. Kidney cortex was used to measure COX-2 expression by immunoblot.  $\beta$ -actin was used as housekeeping protein. Results were analyzed with ANOVA followed by Tuckey's test, results were considered significative when  $p < 0.05$

We observed an increase of COX-2 in cortex from diabetic rats.

In diabetic rats fed with low salt diet there was a higher expression of COX-2 compared diabetic rats with normal diet.

In diabetic rats fed with high salt diet and treated with acetazolamide the expression was lesser than rats fed with low salt and normal diet.

This study provides evidence that in early diabetes, kidney undergoes hypertrophy and NaCl concentration plays a role regulating COX-2 expression in diabetic rats.



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. DIABETES MELLITUS

### 1.1 Definición.

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, en la acción de ella o de ambas cosas. El término diabetes (día: a través; betes: pasar) es atribuido al griego Areteo de Capadocia (s. II d.C.), quien posiblemente fue el primero en diferenciar a la diabetes de orina dulce (mellitus, vocablo latino usado después) y la que carecía de tal sabor (insipidus) (Gale, 2001)

### 1.2 Descripción.

La base de las anormalidades en el metabolismo de los carbohidratos, ácidos grasos y proteínas en la DM es por la acción deficiente de la insulina en los tejidos, esta resulta de la inadecuada secreción de insulina y/o la disminución en la respuesta del tejido a la insulina en uno o mas puntos de la compleja vía de señalización de la acción de la hormona; la mayoría de las veces pueden coexistir la inadecuada secreción y acción sin ser claro cual anormalidad es la primera causa de hiperglucemia.

La mayoría de casos de la diabetes mellitus cae dentro de dos categorías la DM tipo uno (DM1) y la DM tipo dos (DM2). La causa de la DM1 es la deficiencia absoluta de secreción de insulina; por otro lado la DM2 que es la categoría prevalente, manifestada por la resistencia a la acción de la insulina y a una inadecuada respuesta secretoria compensadora de insulina; caracterizada esta porque la hiperglucemia causa cambios patológicos y funcionales en varios tejidos, pero estos pueden estar presentes sin síntomas clínicos hasta por un largo periodo de tiempo antes de ser detectada. (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2005).



### **1.3 Epidemiología.**

La diabetes representa uno de los principales problemas de salud pública en México. Nuestro país se ubica entre los que presentan mayor número de casos registrados en el ámbito mundial. El 10% por ciento de la población mexicana padece DM, cifra que para el 2025 se elevará al veinte por ciento, esta perspectiva futura señala que se mantendrá el incremento en la cantidad de diabéticos pues se advierte un cambio en la pirámide poblacional que agrega condiciones de riesgo para la población adulta. La forma de mayor frecuencia es la DM2 que corresponde al 80% del total en tanto que la DM1 alcanza cerca del 10% y el otro 10% los otros tipos de diabetes. En cuanto a la distribución del padecimiento por grupo de edad, se encuentra que la mayor prevalencia se presenta en los pacientes de 60 a 90 años. Las complicaciones renales son la primera causa de muerte por la DM, seguida por los trastornos de la circulación periférica, las complicaciones neurológicas y, finalmente, las oftálmicas. (NOM-015-55A2-2001).

### **1.4 Clasificación.**

El sistema de clasificación de la DM evidencia que es un grupo de desórdenes clínicos y etiológicos heterogéneos, que tienen como característica común la hiperglucemia. La primera clasificación que hubo fue en 1979, donde la clasificaban en cinco distintos tipos (diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), diabetes gestacional (DMG), diabetes relacionada a la malnutrición y otros tipos de diabetes) esta clasificación se basó en el conocimiento que se tenía hasta ese momento y en la combinación de las manifestaciones clínicas o tratamiento requerido (ejemplo: insulino dependiente, no insulino dependiente; o de patogénesis: relacionada a la malnutrición, otros tipos y gestacional). (National Diabetes Data Group, 1979).

Con el avance en conocimiento de la diabetes, la clasificación se ha tenido que ir revisando y cambiando. Actualmente la clasificación de la DM es la siguiente:



Tabla 1- Clasificación Etiológica de la DM

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>I. Diabetes tipo 1 (Destrucción celular que se caracteriza por deficiencia absoluta de insulina)           <ul style="list-style-type: none"> <li>A. Mediada inmunemente</li> <li>B. Idiopática</li> </ul> </li> <li>II. Diabetes tipo 2 (resistencia a la insulina, deficiencia relativa de la insulina, defectos en la secreción con resistencia a la insulina)</li> <li>III. Otros tipos específicos           <ul style="list-style-type: none"> <li>A. Defectos genéticos de la función celular               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Cromosoma 12, HNF-1_(MODY3)</li> <li>2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2)</li> <li>3. Cromosoma 20, HNF-4_(MODY1)</li> <li>4. DNA mitocondrial</li> <li>5. Otras</li> </ul> </li> <li>B. Defectos genéticos en la acción de la insu               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Resistencia a la insulina tipo A</li> <li>2. Leprechaunismo</li> <li>3. Síndrome de Rabson-Mendenball</li> <li>4. Diabetes lipoatrófica</li> <li>5. Otras</li> </ul> </li> <li>C. Enfermedades exocrinas del páncreas               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Pancreatitis</li> <li>2. Pancreatectomía</li> <li>3. Neoplasias</li> <li>4. Fibrosis quística</li> <li>5. Hemocromatosis</li> <li>6. Pancreatopatía fibrocalculosa</li> <li>7. Otras</li> </ul> </li> <li>D. Endocrinopatías               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Acromegalia</li> <li>2. Síndrome de Cushing</li> <li>3. Glucagonoma</li> <li>4. Feocromocitoma</li> <li>5. Hipertiroidismo</li> <li>6. Somatostatina</li> <li>7. Aldosteronoma</li> <li>8. Otros</li> </ul> </li> <li>E. Inducida por químicos o drogas               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Vacor</li> <li>2. Pentamidina</li> <li>3. Acido nicotínico</li> <li>4. Glucocorticoides</li> <li>5. Hormona tiroidea</li> <li>6. Diazóxido</li> <li>7. Agonistas <math>\beta</math>-adrenérgicos</li> <li>8. Tiazidas</li> <li>9. Dilantin</li> <li>10. Interferón-<math>\alpha</math></li> <li>11. Otros</li> </ul> </li> <li>F. Infecciones               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Rubéola congénita</li> <li>2. Citomegalovirus</li> <li>3. Otras</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>G. Formas no comunes de DM mediadas inmunologicamente           <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Síndrome de Stiff-man</li> <li>2. Anticuerpos receptores anti-insulina</li> <li>3. Otras.</li> </ul> </li> <li>H. Otros síndromes genéticos asociados con DM           <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Síndrome de Down</li> <li>2. Síndrome de Klinefelter</li> <li>3. Síndrome de Turner.</li> <li>4. Síndrome de Wolfram</li> <li>5. Ataxia de Frederich</li> <li>6. Corea de Huntington</li> <li>7. Síndrome de Laurence-Moon-Bield</li> <li>8. Distrofia miotónica</li> <li>9. Porfiria</li> <li>10. Síndrome de Prader-Willi</li> <li>11. Otros</li> </ul> </li> <li>IV. DM Gestacional</li> </ul> |
|--|---|



Los diferentes tipos de DM se agrupan con un criterio patogénico (etiológico) (tabla 1). Esta clasificación vigente, cambia con respecto a la anterior en lo siguiente: el término insulinodependiente y no insulinodependiente, así como sus siglas son eliminados y son sustituidos por números arábigos 1 y 2 para cada tipo respectivamente; la tipo 1 engloba a la mayoría de casos que son debidos a destrucción celular de los islotes pancreáticos, que incluyen aquellos casos con procesos autoinmunes y aquellos en los cuales la etiología es desconocida. La clase o forma 2 incluye las formas más prevalentes de DM, las cuales resultan de una resistencia a la insulina con defectos en la secreción de insulina; La malnutrición (deficiencia proteínica) puede influenciar a la expresión de otros tipos de DM aunque la evidencia de ello aun no es convincente y por tal motivo la clase relacionada a la malnutrición ha sido eliminada (Hoett JJ, Tripathy BB, Rao RH, Yajnik CS, 1996); se considera además un grupo denominado tipos específicos que agrupa un numero considerable de enfermedades de causa conocida que pueden producir DM; y la DM gestacional se conserva (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2006)

#### **1.4.1 Diabetes Mellitus 1**

Diabetes mellitus mediada inmunemente. Es la diabetes mellitus caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. Hay marcadores de esta destrucción inmunitaria como lo son autoanticuerpos a los islotes, autoanticuerpos a insulina (IAA's), anticuerpos a ácido glutámico descarboxilasa (GAD65) y autoanticuerpos a tirosin fosfatasa (IA-2); presentes en el 85-90% de individuos al detectarse inicialmente la hiperglucemia (Atkinson y Maclaren, 1994). Esta forma, esta asociada al HLA DQA y DQB; el grado de destrucción es variable, siendo más rápida en algunos individuos (principalmente en los niños) y más lenta en otros (adultos) (Cantor et al., 1995).

Diabetes idiopática. Se caracteriza por insulopenia, no hay evidencia de autoinmunidad, no se relaciona con el HLA, en esta categoría caen la minoría





de casos de este tipo de DM (Gale, 2001).

#### **1.4.2 Diabetes mellitus 2**

Es el tipo de DM, que se caracteriza por resistencia a la insulina o deficiencia relativa de insulina. Las etiologías específicas de esta forma de DM son desconocidas, no hay destrucción autoinmune y la mayoría de los casos cursa con obesidad que causa algún tipo de resistencia a la insulina: esta forma de DM frecuentemente no es diagnosticada hasta que la hiperglucemia desarrolla los síntomas clásicos (Hayden et al., 2005)

#### **1.4.3 Otros tipos específicos.**

El tercer grupo incluye los defectos genéticos en la función de la célula beta con falla secretoria que causan los distintos tipos de MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young (diabetes en el joven)). Estos tienen baja frecuencia, herencia dominante e inicio clínico antes de los 25 años. También se incluyen los defectos genéticos en la acción de la insulina, por mutaciones en el receptor de la insulina, que producen cuadros de insulinoresistencia severa.

Dentro de este grupo destacan las endocrinopatías que causan diabetes y que deben ser evaluadas frente a la sospecha clínica que nos orienten a la existencia de una acromegalia, un síndrome de Cushing o un feocromocitoma.

De mayor frecuencia son las diabetes causadas por enfermedad del páncreas exócrino como la pancreatitis crónica, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa y neoplasia del páncreas, También corresponden a este grupo los casos inducidos por acción de fármacos y otras formas menos frecuentes como infecciones, alteraciones inmunológicas y síndromes genéticos asociados a diabetes. (Gale, 2001)

#### **1.4.4 Diabetes gestacional**

La Diabetes Gestacional constituye el cuarto grupo de la clasificación. Mantiene la definición de cualquier grado de intolerancia a la glucosa, de severidad variable,



que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. (Engelgau et al., 1995).

### **1.5 Modelo experimental de Diabetes inducida por estreptozotocina**

Al ser la DM una patología de importancia desde el punto de vista clínico y de investigación básica, se han desarrollado diversos modelos experimentales para poder estudiar los eventos involucrados en esta. La diabetes experimental puede ser producida por hormonas (glucagon, somatotropina, glucocorticoides, adrenalina, hormonas esteroideas), ciproheptadina, L-asparaginasa, quinolonas y compuestos relacionados. La diabetes permanente estreptozotocina (STZ) es inducida al producir daño irreversible a las células  $\beta$ -pancreáticas, la acción citotóxica de esta es mediada por especies de oxígenos reactivas. (Szkudelki T, 2001)

La estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea) 1-d-glucopirranosa) ( $\alpha$ - $\beta$ ) es un antibiótico aislado de *Streptomyces acromógenes*, su determinación estructural fue reportada en 1979; existen 50 mezclas de  $\alpha$  y  $\beta$  anómeros, a una tercera parte de estos en su estructura básica se les hicieron modificaciones que incluyen acetilaciones, alquilaciones, que reducen sustancialmente las propiedades antibacteriales, dando una mayor actividad antitumoral.

Mecanismo de acción: la estreptozotocina entra a la célula  $\beta$  por el transportador GLUT 2 y causa alquilación del DNA, y ATP. Se observó en experimentos que también el Óxido Nítrico (ON) contribuye a la destrucción de la célula  $\beta$  del páncreas (Turk e tal., 1993), así como especies de oxígenos reactivos que contribuyen a la fragmentación del DNA y evocan a otros cambios deletéreos en las células. La formación de aniones superóxido resultan de la acción de la STZ sobre la mitocondria y el aumento de la actividad de la xantina oxidasa, se ha demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria (Nukatsuka et al. 1990), provocando disminución del ATP. El daño al DNA por la STZ induce la activación de poliribolisación del ADP que lleva a la depleción de  $\text{NAD}^+$  y ATP.



Farmacocinética: La STZ es administrada parenteralmente, la dosis de STZ para los modelos experimentales de diabetes varía entre los 40 y los 65 mg/kg (Ganda et al.,1976), su vida media a pH 4.5 es de 10 a 15 min. después de la administración IV y la excreción es renal.

La toxicidad que puede provocar es hepática y renal.

### **1.6 Complicaciones crónicas de Diabetes Mellitus.**

La hiperglucemia crónica de la DM es asociada con disfunción y falla de varios órganos. Genera daño circulatorio sistémico desde el momento que se inicia a nivel micro y macrovascular especialmente en el riñón, retina, sistema nervioso y arterias este daño gradual es lo que a la larga causa la mortalidad por DM. Actualmente se acepta que las complicaciones pueden tener una base metabólica común, pero es posible que algunos factores genéticos desempeñen un papel importante. Las alteraciones metabólicas y funcionales interactúan en forma sinérgica en el desarrollo de la micro y macroangiopatía.

Complicaciones macrovasculares:

- Aterosclerosis Coronaria acelerada
- Aterosclerosis cerebrovascular acelerada
- Enfermedad vascular de extremidades inferiores acelerada

Complicaciones microvasculares:

- **Nefropatía**
- Retinopatía
- Neuropatía

La Nefropatía Diabética (ND) es la principal complicación de la DM tanto 1 como 2.

## **2. NEFROPATÍA DIABÉTICA.**

De los casos nuevos de Insuficiencia renal terminal, aproximadamente el 33% de éstos corresponde a Nefropatía Diabética (ND), lo que convierte a este padecimiento en la causa más común de enfermedad renal terminal en el mundo



occidental. En los pacientes diabéticos la nefropatía diabética clínica se presenta en el 30 a 40 % de los casos y constituye una de las principales causas de muerte (Alexandria, 2004). El síndrome clínico de la nefropatía diabética consiste en proteinuria, hipertensión y disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (Bojestig, 1994).

## 2.1 Fisiología de la Filtración glomerular

¿Qué es lo que determina la Tasa de Filtración Glomerular?:

La barrera glomerular de filtración esta compuesta por 1) células endoteliales, 2) membrana basal glomerular y 3) los podocitos endoteliales, que permiten el paso de diferentes solutos de acuerdo a su tamaño (bajo peso molecular < 5500 Da) y a su carga negativa. La TFG depende la presión hidrostática y oncótica (presión neta de filtración (NPF)) de los capilares renales. La microvasculatura renal tiene un sitio de control de resistencia en las arteriolas aferentes y eferentes, que permiten constricción o relajación como control de la presión hidrostática y su vez de la TFG (Brenner et al., 2003)

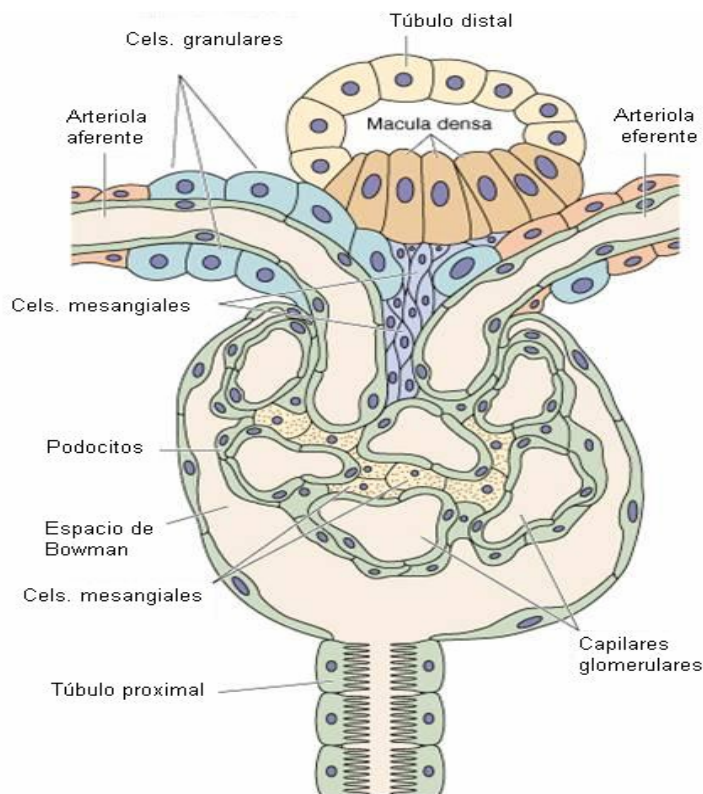
Una característica importante de la circulación renal es la habilidad que tiene para mantener el flujo renal y la TFG dentro límites normales, a esta habilidad se le conoce como autorregulación, que es una propiedad vascular para preservar la perfusión del riñón.

Hay dos mecanismos importantes para esta autorregulación:

- 1) Respuesta miógena. Las arteriolas tienen una habilidad inherente para responder a cambios en la tensión de la pared vascular por contracción o relajación, lo que activa canales no selectivos a cationes, que despolarizan la membrana, permitiendo la entrada de  $Ca^{++}$  para estimular la contracción.
- 2) Retroalimentación tubuloglomerular (RTG): Las células de la mácula densa (MD) localizadas en la rama ascendente del asa de Henle, detecta los cambios en la TFG y la concentración de solutos, echando andar una retroalimentación negativa, para compensar a través de las arteriolas aferente y eferente (vasodilatando o vasoconstruyendo) y así regular la TFG, manteniendo la estabilidad, contra varias perturbaciones.



El mecanismo se da por un incremento en la presión arterial que a su vez aumenta la presión glomérulo-capilar y del fluido plasmático y como consecuencia aumenta TFG; este cambio incrementa el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que se filtra al túbulo proximal, asa de henle y túbulo distal. La MD no detecta el flujo, sino la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que aumentan con el incremento del flujo. En la membrana apical de la MD se encuentra el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  que permite el paso de estos iones al espacio intracelular, este incremento de  $\text{Cl}^-$  despolariza la membrana, activando canales a  $\text{Ca}^{++}$ , permitiendo la entrada de este ión a la MD, liberando de esta forma agentes parácrinos como la adenosina, tromboxano etc. Que pueden contraer el músculo liso vascular. Los receptores  $\text{A}_1$  para adenosina en el músculo liso son importantes en esta respuesta, el efecto que se provoca es incremento en la resistencia arteriolar aferente y a su vez disminución de la TFG. (Schnerman et al., 1998)



**Figura 1.1.** Esquema del aparato juxtaglomerular. (Boron et al., 2005)



Existen diversos mediadores que aumentan o disminuyen la sensibilidad de la Retroalimentación tubuloglomerular, entre los que se encuentran:

- Factores que incrementan la sensibilidad de la Retroalimentación tubuloglomerular:

Adenosina

**PGE<sub>2</sub>**

Tromboxano

HETE

Angiotensina II

- Factores que disminuyen la sensibilidad de la Retroalimentación tubuloglomerular:

Péptido auricular natriurético.

Oxido Nítrico.

AMP<sub>c</sub>.

PGI<sub>2</sub>.

Dieta alta en proteínas.

Hay factores que modulan el flujo sanguíneo renal (FSR) y la TFG manteniendo volumen circulante efectivo.

Sustancias que modulan la hemodinamia renal o la reabsorción renal de Na<sup>+</sup>; estas son:

El sistema renina-angiotensina-aldosterona: La angiotensina II (ANG II), tiene múltiples acciones, una de ellas es promover la retención de sodio. Que actúa en caso de disminución de la presión sanguínea, estimulando la liberación de renina a través de estimulación simpática. La disminución de NaCl en la mácula densa, modula directamente la liberación de renina

Inervación simpática: el control del circulante, es regulado por influencia del sistema simpático al 1) aumentar la resistencia vascular (dolor, estrés, trauma etc.), 2) aumentar la liberación de renina y al 3) aumentar la reabsorción tubular de Na<sup>+</sup>. Las terminales nerviosas simpáticas liberan norepinefrina en el espacio

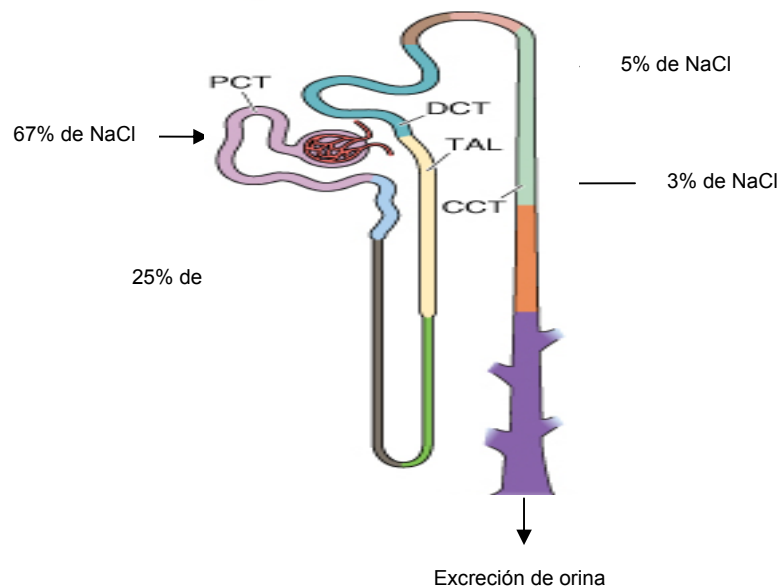


intersticial, estimulan la resistencia arteriolar aferente y eferente disminuyendo el flujo sanguíneo renal y la TFG.

Vasopresina (hormona antidiurética): actúa al aumentar la osmolaridad del líquido extracelular, su principal efecto es incremental la reabsorción de agua en el túbulo colector, y aumenta la resistencia vascular.

Péptido auricular natriurético: los miocitos de la aurícula liberan este péptido (PAN), es respuesta a un incremento de la presión auricular; su efecto es hemodinámica, vasodilata las arteriolas aferentes y eferentes, incrementado el flujo sanguínea medular y cortical; indirectamente afecta la hemodinamia renal por inhibición de la secreción de renina. (Brenner et al., 2003; Boron et al., 2005)

Transporte del NaCl en el riñón. Una función principal del riñón es mantener el la homeostasis del Na<sup>+</sup>; el Na<sup>+</sup> es el ión que contribuye en mayor proporción en la osmolaridad del líquido extracelular. El túbulo proximal reabsorbe la mayor cantidad de Na<sup>+</sup> filtrado (67%) (fig. 1.2) y a lo largo de la nefrona se va reabsorbiendo el restante Na<sup>+</sup>. El túbulo reabsorbe Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> por vía paracelular a través de fuerzas electroquímicas; y transcelular a través de gradiente electroquímico, canales iónicos y transportadores que se encuentran en la membrana apical y basolateral; el transporte es pasivo porque la concentración intracelular es menor, y el gradiente electroquímico es favorable para la entrada de Na<sup>+</sup>. Existen una gran variedad de cotransportadores electrogénicos en la membrana apical que reabsorben Na<sup>+</sup>, además de intercambiadores de Na<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> donde el Na<sup>+</sup> se reabsorbe y salen H<sup>+</sup>; hay además cotransportadores Na<sup>+</sup>-glucosa (SGLT-1 y SGLT-2) (Brenner et al., 2003; Alpen et al., 1985). En el asa de Henle, el transporte es completamente pasivo. En la porción ascendente del asa de Henle, la principal vía es transcelular y parecelular. La vía transcelular tiene dos mecanismos principales, uno es el cotransportador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> donde actúan los diuréticos de asa y el segundo son intercambiadores Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>. En el túbulo distal es principalmente por vía transcelular a través de un cotransportador Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> este es independiente de K y es donde actúan los diuréticos tiazidicos. En el túbulo colector, la reabsorción es transcelular a través de las células principales (boron et al., 2005)



**Figura 1.2.** Reabsorción del NaCl a través de la nefrona. (TCP (túbulo contorneado proximal), TCD (túbulo contorneado distal) y TC (túbulo colector). (Boron et al., 2005).

## 2.2 Fisiopatología de las complicaciones crónicas de la DM.

Los mecanismos exactos por los cuales se desarrolla la ND no han sido completamente descritos, pero se sabe que tienen una influencia genética importante sobre la cual se yuxtaponen trastornos metabólicos y hemodinámicos (Bodansky et al., 2000)(Donnelly et al., 2000).

La evolución de estas numerosas complicaciones crónicas de la diabetes mellitus se correlaciona en la mayoría de los casos, con la severidad y duración de la hiperglucemia.

### 2.2.1 Cambios estructurales.

El tamaño de los riñones en la nefropatía diabética es variable. Al comienzo existe un aumento de la masa renal, del tamaño glomerular y tubular, y de la superficie capilar de filtración. Posteriormente, reducen su tamaño al alcanzar la etapa de riñón terminal (Mauer, 1984) (Caramori, 2002)

Las anormalidades estructurales microscópicas se dividen en 2 grupos:

- Lesiones glomerulares: (Glomeruloesclerosis difusa y nodular).





Las primeras anomalías demostrables con el microscopio electrónico son engrosamiento difuso de la membrana basal capilar del glomérulo, aumento de la matriz y proliferación de las células mesangiales. Al avanzar la evolución, aparecen ramificaciones del material de la membrana basal glomerular entre las células endoteliales. Con el microscopio óptico se observan lesiones difusas en esta etapa. Esta forma difusa se presenta como acumulación de una sustancia amorfa en la pared del capilar glomerular y en el mesangio.

Posteriormente estas lesiones evolucionan agrupándose y constituyendo la forma nodular, esta lesión es considerada patognomónica.

- Lesiones tubulares.

El depósito de glucógeno en las células tubulares, especialmente en el asa de Henle, constituye la nefrosis glucogénica.

La etapa temprana de daño renal, se caracteriza por hiperfunción e hipertrofia renal. La hiperfunción se demuestra por el aumento del filtrado glomerular, determinado por una depuración de creatinina elevada. Los incrementos varían del 20 a 40 %. Al mismo tiempo se observa un aumento en la excreción de albúmina en forma intermitente, tanto en condiciones basales como después del ejercicio (Lane, 1993)

El mecanismo por el cual se da la microalbuminuria está influido por la estructura, tamaño y carga de las macromoléculas, filtrando con mayor dificultad aquellas cargadas negativamente. La permeabilidad y selectividad se modifican por una disminución de las cargas negativas de la pared capilar glomerular con una reducción del ácido siálico y del heparán sulfato que son dos de los principales componentes de la barrera (Vernier, 1992).

Los factores hemodinámicos también alteran el pasaje de macromoléculas hacia el mesangio, produciendo en el modificaciones que llevan a su expansión, hecho que se correlaciona en forma directa con la mala evolución de la nefropatía.



### **2.2.2 Factores metabólicos.**

Hay varios factores metabólicos dentro de los que se encuentran: la hipótesis de la aldosa reductasa (Boel, 1995), la del estrés oxidativo (Soulis-Liparota, 1995), la hipótesis de la glucosilación o de Maillard (Brownlee M., 1990), los trastornos de actividad proteína kinasa C y la pseudo-hipoxia (Baynes, 1999), los trastornos del metabolismo de las lipoproteínas y los trastornos de actividad de las citocinas (Lopes-Virella, 1996).

#### **2.2.2.1 Via del poliol.**

La hiperglucemia mantenida, en algunos tejidos puede activar vías metabólicas alternativas cuyos metabolitos pueden afectar la función celular. Uno de estos mecanismos de consumo de glucosa es la vía de la aldosa reductasa (en estadios de hiperglucemia, se activa la vía) produciendo sorbitol y fructosa, que quedan atrapados en el interior de la célula porque la membrana es impermeable a estos polioles, de esta forma aumentan la osmolaridad (Lee, 1999) (Iso, 2001); por otro lado la aldosa reductasa reduce los niveles de NADPH celular lo que altera la producción de óxido nítrico endotelial y el balance redox. Participa en tejidos como membrana basal glomerular (Boel, 1995) (Hamada, 1995).

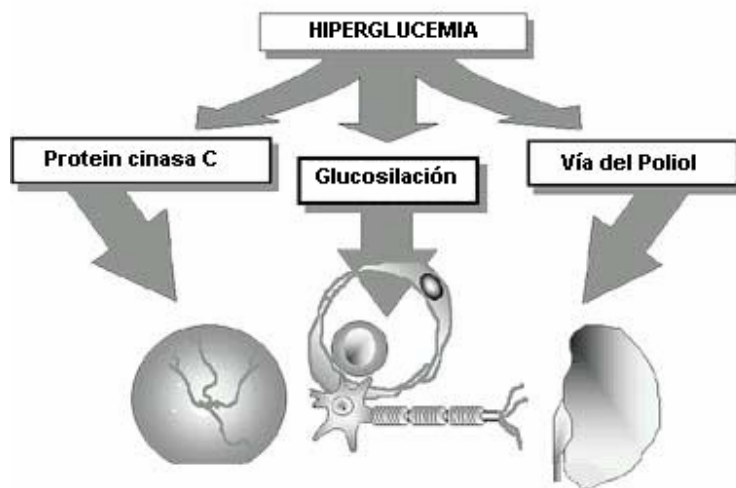
#### **2.2.2.2 Proteína Kinasa C.**

La hiperglucemia mantenida produce activación de la Proteína Kinasa C vía diacilglicerol (Ceolotto, 1999), con efectos a nivel de daño de la microcirculación y nervios; la hiperactividad de la PKC modula la expresión genética en células mesangiales, incluyendo la síntesis proteínica de la matriz extracelular especialmente de tipo IV de colágeno y fibronectina, las cuales son mediadas por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TFG- $\beta$ ) (Kuboki, 2000). La activación de PKC esta relacionada con la vía de los mitógenos activadores de protein cinasa (MAPK), la cual es importante en la señalización intracelular para la proliferación e hipertrofia. La activación de PKC aumenta la producción de prostanoides vasodilatadores que llevan a hiperfiltración e incremento de la permeabilidad a la albúmina (Haneda, 1997).



### 2.2.2.3 Glucosilación no enzimática de proteínas.

Es la capacidad de la glucosa de unirse a proteínas sin necesidad de participación de enzimas, fue descubierta por el químico francés L. Maillard en 1912, consideradas estas reacciones como de "glucosilación precoz". Como consecuencia se producen moléculas estables (conocidas como productos de glucosilación avanzada (PGA)) que afectan las proteínas circulantes, la membrana celular (membrana baso glomerular) y las proteínas intracelulares. La acumulación de los productos de glucosilación avanzada se hace de preferencia en proteínas de larga vida (Matriz mesangial, membrana basal, colágeno, fibrinógeno) (Wellsknecht, 1995) (Sheetz, 2002).



**Figura 1.3.** Factores metabólicos implicados en la fisiopatología de las complicaciones crónicas de la DM. Tres vías principales implicadas en la microangiopatía.

### 2.2.3 Factores hemodinámicos.

Las alteraciones hemodinámicas en el flujo y presión sanguíneas, son provocados cambios estructurales, los cuales resultarán en el desarrollo de complicaciones microvasculares. (Veldman, 2002).

La Hiperfiltración Glomerular, es el factor patogénico inicial de la nefropatía, es un hecho temprano, dependiente de la hiperglucemia y mediado por cambios hemodinámicos intraglomerulares. Esta hipótesis es apoyada por la reducción de



la hiperfiltración y de la albuminuria en un control metabólico estricto, la restricción de proteínas en la dieta, o ambas. Brenner y cols. demostraron un aumento de la presión intraglomerular como primera anomalía hemodinámica, que se produce por la reducción de la resistencia arteriolar aferente y eferente con predominio de la primera. (O'bryan et al.,1997). La vasodilatación producida aumenta el flujo plasmático renal y la presión intraglomerular, expresándose este cambio en el aumento del filtrado glomerular.

Estos cambios hemodinámicos pueden liberar hormonas vasoactivas como la angiotensina II, la endotelina, el óxido nítrico, las prostaglandinas, las cininas, y péptido auricular natriurético, que contribuyen a la manifestación de ésta patología. Además de la hiperglucemia pueden estar envueltos en los cambios hemodinámicos, el glucagón, los factores de crecimiento y la reducción de la actividad simpática, que causan daño en la pared vascular, produciendo un aumento en la permeabilidad, fibrosis de la íntima y proliferación del músculo liso. (Zatz, 1986) (Tooke, 1995)

En el riñón normal, existe una correlación entre el sistema Renina Angiotensina (vasoconstrictor) y el Sistema de Prostaglandinas (vasodilatadores) y ambos influyen sobre las células mesangiales, la membrana glomerular y hemodinamia renal. Las múltiples alteraciones de estos sistemas en la diabetes permiten especular que el desequilibrio entre ambos sistemas, vasoconstrictor y vasodilatador, a favor de éste último, produce un aumento de flujo y de presión intraglomerular en estado temprano de la nefropatía. El Sistema Renina Angiotensina no sólo actúa sobre la vasculatura glomerular sino que también tiene efecto sobre el pasaje de macromoléculas hacia el mesangio y sobre el coeficiente de ultrafiltración de la membrana a través de la constricción de las células mesangiales. Estudios con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), y con antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub>, demuestran que estos disminuyen la progresión de micro o macroalbuminuria. La angiotensina II induce el crecimiento de la célula del músculo liso, hipertrofia y proliferación de las células glomerulares, además que activa a la PKC por estimulación del receptor AT<sub>1</sub> en las células glomerulares (Lewis, 1993).

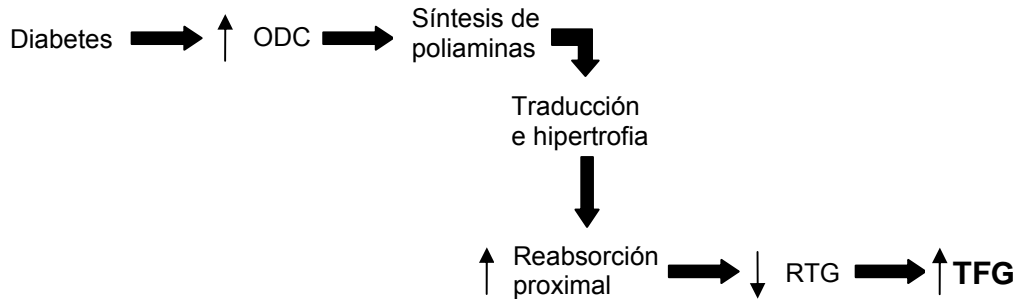


#### 2.2.4 Hipertrofia renal.

Thomson y colaboradores en el año 2001 proponen otra hipótesis de la ND en estadios tempranos de la DM. Como ya se describió anteriormente, el riñón se hipertrofia (crece) y la tasa de TFG se incrementa hay cambios estructurales en el glomérulo que provocan hiperfiltración y a su vez conlleva a ND progresiva (Hostetter et al., 1995). De esta forma se explicaba la ND por anomalías hemodinámicas y metabólicas (O'Bryan, 1997). Lo que demuestra este grupo de investigadores es su hipótesis, que la hiperfiltración glomerular resulta principalmente de un incremento primario en la reabsorción tubuloproximal la cual causa que se incremente TFG a través de acciones fisiológicas reguladas por la retroalimentación tubuloglomerular; y que este incremento en la reabsorción resulta en gran parte por la hipertrofia del túbulo proximal "**Hipótesis tubular de la hiperfiltración glomerular**".

Esta hipótesis invierte el orden de eventos como típicamente se describe la ND, en la cual una reducción primaria en resistencia vascular causa aumento de la TFG y por lo tanto el túbulo se hipertrofia (crece) como respuesta compensatoria a la carga filtrada (Thomson 2001).

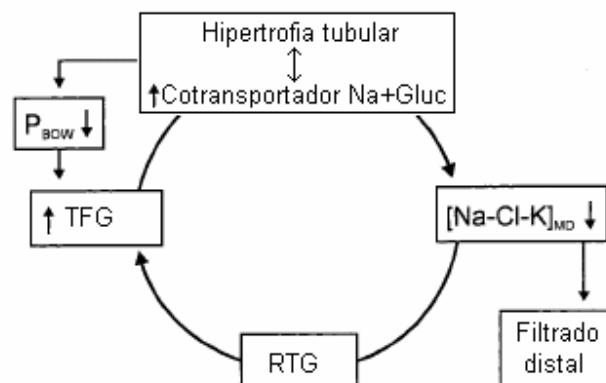
Se ha implicado a la vía de las poliaminas en la hipertrofia renal al comienzo de la diabetes. Estas son pequeñas moléculas biogénicas esenciales para el inicio, progresión y proliferación del ciclo celular que contribuyen a la hipertrofia. La ornitina descarboxilasa (ODC) renal, es la enzima limitante de la biosíntesis de las poliaminas que convierte a la ornitina en putrescina para producir la hipertrofia, incrementa a las 24 h de la administración de estreptozotocina, en los experimentos de estos investigadores a los tres días se detectó una proliferación de las células del túbulo proximal; se observó niveles de poliaminas y sitios de proliferación en riñón durante los primeros siete días del modelo de diabetes por estreptozotocina. A través de estudios de micropunción se demostró que al inhibir dicha enzima se atenúa la hipertrofia renal y la hiperfiltración glomerular. (Aihua, 2003).



**Figura 1.4. Hipertrofia renal (Thomson et al., 2001)**

Por lo tanto se tiene que pensar en factores hemodinámicos, metabólicos, y en la **hipertrofia renal**, para entender como la diabetes en estadios tempranos afecta al riñón.

La hipertrofia incrementa la reabsorción de los tubulos proximales, estos constituyen la mayor parte de la corteza renal que se hipertrofia, reduciendo así la concentración de NaCl luminal que llega a la MD y a través de la RTG incrementa la TFG aumentando la tasa de filtración glomerular por vasodilatación arteriolar aferente y vasoconstricción eferente para restaurar los electrolitos y fluidos en la nefrona distal, pero al mismo tiempo se desarrolla daño que provocará la ND (Vallon et al., 2003).



**Figura 1.5. Hiperfiltración glomerular en la DM temprana por hipertrofia, que activa la RTG (Vallon, et al., 2003)**



Por otro lado en ratas normales se ha estudiado el efecto que provoca el alimentar con dieta baja en NaCl (disminuir su concentración) sobre la RTG. Esta disminución de la concentración de NaCl en la MD se detecta a través del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ; el efecto que tiene concentración de NaCl luminal en la MD es la regulación de la resistencia arteriolar glomerular. Como ya se mencionó la RTG tiene una relación inversa entre la concentración de NaCl y la TFG (Cuando disminuye la concentración del NaCl aumenta la TFG y viceversa) (Jurgen S 1998)

¿Cuál es el mecanismo por el cual la MD se comunica con las arteriolas para modificar la TFG y regular la concentraciones de estos iones, así como el volumen? Cuando los animales fueron alimentados con restricción de NaCl se observó que en la región de la MD se sobre expresa la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) y que a través de sus metabolitos se comunica con las arteriolas (Harris et al., 1994)

### **3.- CICLOOXIGENASAS**

#### **3.1 Historia**

En los años 30, se descubrieron unos mensajeros lipídicos derivados del ácido araquidónico que tenían la particularidad de provocar contracción del músculo liso; en los años 50 se pudo purificar dichos mensajeros; en 1973 se estudió la reacción para convertir el ácido araquidónico en  $\text{PGG}_2$  y no fue hasta 1976 que se purificó por primera vez a la enzima encargada de catalizar dicha reacción, conocida hasta ese momento como prostaglandin sintetasa, encargada de esa reacción de ciclooxigenación y que también reduce el hidroxiperodil en la prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) a hidroxil para formar prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). A esta enzima también se le conoce como prostaglandin H sintetasa (PGHS) o prostaglandin endoperóxido sintetasa, actualmente se le conoce como ciclooxigenasa (COX).



En 1991 investigadores demostraron que había dos isoformas de las ciclooxigenasas (COX) una constitutiva (COX-1) y una inducible (COX-2) (Daniel et al., 2004).

### 3.2 Estructura

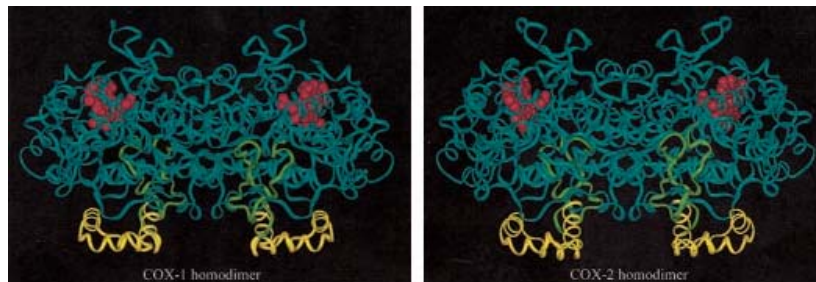
Las ciclooxigenasas son proteínas asociadas a la membrana que contienen un grupo Hemoprotoporfirina IX (DeWitt, 1988). Ambas isoformas, poseen aproximadamente 60% aminoácidos idénticos (Simmons, 1991). En su estructura por cristalografía, entre las dos isoformas hay una gran similitud, de hecho tienen los mismos dominios funcionales (Luong et., al, 1996), sus estructuras nos predicen que ambas se encuentran localizadas en la luz sobre el núcleo del retículo endoplásmico directamente por péptidos amino terminales; estos péptidos son hidrofóbicos y son los que demuestran la diferencia entre las dos isoformas, para la COX-1 son de 22 a 26 aminoácidos y para la COX-2 son 17 y parece ser menos hidrofóbica, y para ambas la estructura es de cuatro dominios. Los estudios de Gararavito describieron los distintos dominios para la dimerización de las COX, de unión a la membrana y para la catalisis; la COX-1 es rápidamente traslocada dentro del lumen de los microsomas pero la COX-2 es traslocada ineficientemente (Garavito and De Wit, 1999). Los dominios de dimerización entre las COX 1 y 2 es codificada por aproximadamente 50 aminoácidos cercanos al amino terminal a través de interacciones hidrofóbicas (Daniel et al., 2004). Los dominios catalíticos se encuentran en el carboxilo terminal (aproximadamente 480 aminoácidos) de la proteína y contienen dos sitios activos distintos: Sitio activo a peroxidasa y el sitio activo a ciclooxigenasa. (Malkowski et al., 2000)

La COX-1 tiene 3 sitios de glucosilación a lo largo de su cadena, y la COX-2 tiene 4 sitios (Nemeth et al., 2001). La glucosilación de la asparagina 410 en la COX-1, es esencial para sus actividades por promover propiedades de desdoblamiento de proteínas. Esto sugiere que la glucosilación es postranscripcional, sin embargo una vez que la COX-1 se ha desdoblado, estos residuos glucosilados pueden ser removidos por endoglucosidasas. La COX-2 es observada frecuentemente en múltiples estados glucosilados, que en el Western blot produce una doble o triple





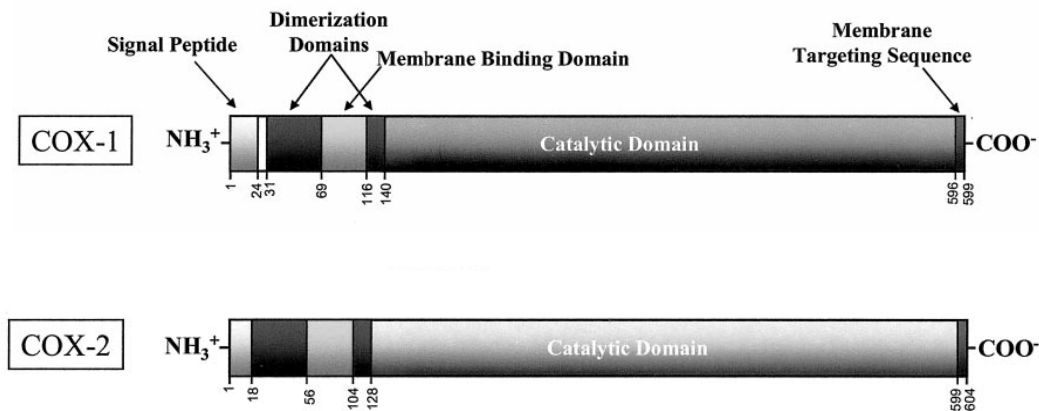
banda característica. Estas isoformas un peso molecular de 65,000-70,000 daltones para COX-1 y la COX-2 presenta un peso molecular de 72,000 a 75,000 daltones.



**Figura 1.6.** Estructuras por cristalografía de COX-1(izquierda) y COX-2 (derecha) de ovino. Tomadas del banco de proteínas. Los dominios funcionales: 1) dominios unidos a membrana (amarillo); 2) dominios de dimerización (verde); 3) dominios catalíticos (azul) y el grupo hemo (rojo).

### 3.3 Control de la expresión génica

La COX-2 es indetectable en la mayoría de tejidos, teniendo una distribución selectiva. El gene humano para COX-1, se ha mapeado en el cromosoma 9q32-q33.3, esta constituida por 22 pares de Kilobases (Kb) y contiene 11 exones y 10 intrones y codifica para un RNAm de 2.8 Kb (Yokohama and Tanabe, 1989; Kosaka et al., 1994). El gene humano para COX-2 mapeado en el cromosoma 1q25.2-q25.3, constituido por 8.3 pares de kilobases contiene 10 exones y ningún intrón, codifica para un RNAm de 4 a 4.5 Kb (Kosaka et al., 1994). El gene de la COX-2 contiene en la secuencia 5' una caja TATA conica. Los elementos potenciadores están localizados dentro de las 500 pares de bases del segmento UTR como elementos de respuesta a AMPc localizado a 59-53 pares de bases del sitio de inicio transcripción. Un largo número de transactivadores incluyendo elementos de respuesta a AMPc unidos a proteína, ATF, C/EBP, C-Jun, C-fos están localizados a 60-40 pares de bases.



**Figura 1.7.** Dominios funcionales de la COX-1 y COX-2 (Simmons et al., 2004)

La COX-1 y 2 participan de forma importante en la coagulación sanguínea, en la función renal, mantiene la integridad gastrointestinal y participa en procesos fisiopatológicos como inflamación, artritis, Alzheimer y cáncer (Dubois et al., 1998). La COX-1 principalmente cataliza la reacción para producción de tromboxano en la mucosa gástrica, riñón y plaquetas. La expresión de COX-2 es menor en los tejidos, pero es inducida por mediadores que incluyen citocinas, factores de crecimiento, promotores tumorales, virus, iones y radiación UVB; en diversas células se demostró que es inducida rápidamente (2-6h) (Kujubu et al., 1991). Se ha visto que la velocidad de recambio de esta enzima es muy rápida, del orden de 4 a 10 minutos (Yokohama, 1989).

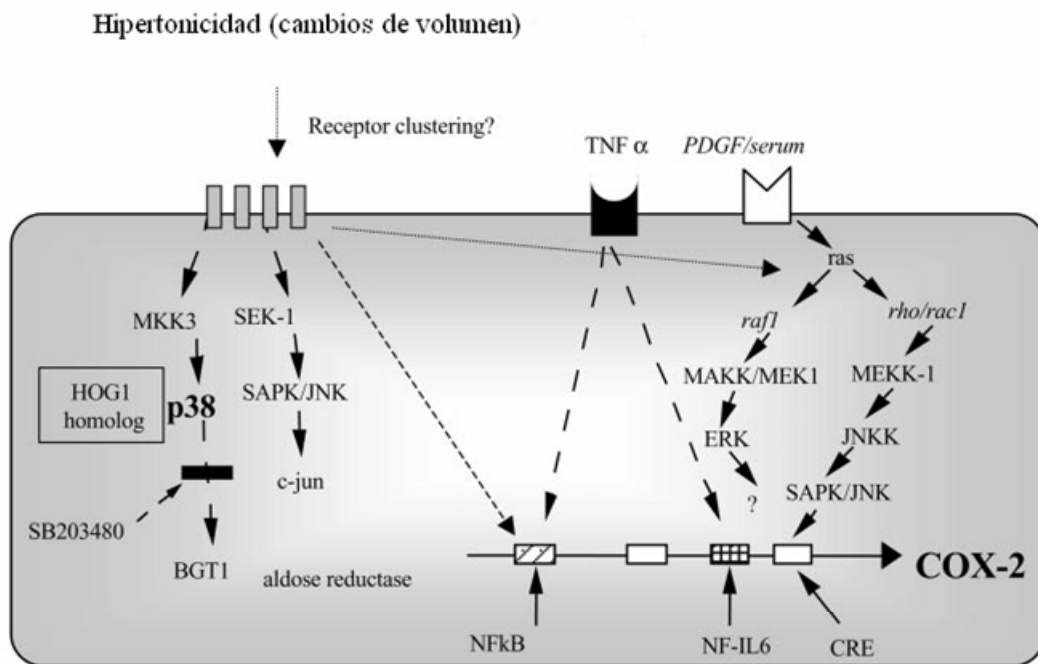
La expresión de la COX-2 es regulada por muchos procesos, que alteran su velocidad de transcripción, estabilidad y eficiencia de la traducción del mensaje (Dixon et al., 2000; Harrison et al., 2000; Hla et al., 1999). La transcripción de la COX-2 es regulada por una variedad de citocinas y factores de crecimiento, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) (Yakamoto et al., 1995), Interleucina (IL-1 $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Herschman, 1999; Hla et al., 1999)

Estos efectores son mediados, en parte por la activación coordinada de diversos factores de transcripción, factores que se unen y activan a la secuencia consenso en la región 5' del gene de la COX-2, gene para el factor nuclear-kB (NF-kB), NF-IL-6-C/EBP y un elemento de respuesta a AMPc (CRE). Después de la



estimulación con el factor derivado de plaquetas, la familia JNK activada unida al heterodímero fos/jun, se une al CRE de la COX-2 promoviendo su transcripción (Xie et al., 1996). En la inducción del RNAm de la COX-2 por endotoxinas (lipopolisacárido) interviene en el sitio CRE (Mestre et al., In press; Moore et al., 1993) y NF- $\kappa$ B (Inoue et al., 1998, 1995)

Los radicales pueden activar holoenzimas de COX para formar radicales tirosil enzimáticamente cruciales para Tyr385 (Daniel, 2004); y la activación simultánea de cinasas c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal y p38-MAPK (Geng, 1995). La catalasa, una enzima del sistema de antioxidantes de la célula, interviene también en la expresión de la COX-2 al estimular los sitios de respuesta a AMPc y NF-IL6 (Chen, 1998). La PE<sub>2</sub> es capaz de estimular la expresión de la COX-2 *de novo* al aumentar los niveles de AMPc y estimular el elemento de respuesta a AMPc de su zona promotora (Nüsing, 1996) (figura 1.8)

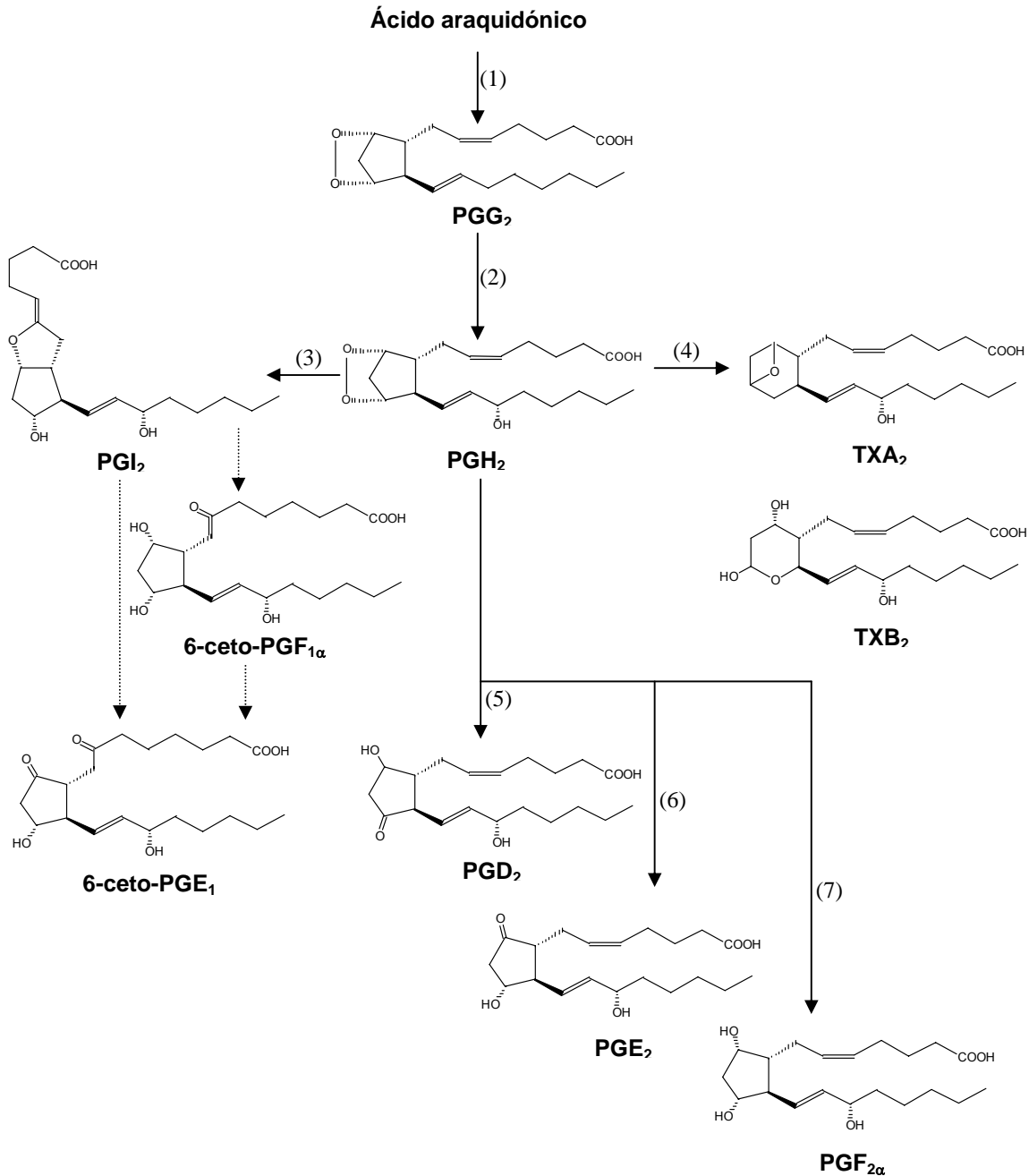


**Figura 1.88. Señalización intracelular para la COX-2 (Harris et al., 2001)**

La COX-2 es una enzima bifuncional que contiene un centro catalítico, el cual suma dos oxígenos (bioxigenación) del ácido araquidónico para formar peróxido, PGG<sub>2</sub> y un sitio activo para peroxidasa el cual reduce la PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> y a través de isomerasas y oxidoreductasas se producen varios isómeros de



prostaglandinas bioactivas usando como sustrato a esta, dichos isómeros son cinco prostanoïdes bioactivos primarios: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>)



**Figura 1.9.** Biosíntesis de prostaglandinas. Abreviaturas: PG = prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), PGI<sub>2</sub> = prostaciclina, TXA = tromboxano. Nomenclatura enzimática: 1 = sintasa de PGG/H (ciclooxigenasa), 2 = sintasa de PGG/H (hidroperoxidasa), 3 = sintasa de prostaciclina, 4 = sintasa de tromboxano, 5 = sintasa de PGD (PGH-D isomerasa), 6 = sintasa de PGE (PGH-E isomerasa), 7 = sintasa de PGF (PGF reductasa). Las líneas punteadas representan procesos no enzimáticos.



### 3.4 COX-2 en el riñón

La localización de la COX-2 se ha descrito en microsomas de corteza y papila, a través de inmunolocalizaciones e hibridación *in situ*, se ha demostrado la presencia de esta enzima en la mácula densa y en las células de la rama ascendente de la asa de Henle (cTALH), (Yang et al., 1998, 1999), así como en las células medulares intersticiales.

En la médula renal la expresión de esta enzima es un importante componente de la respuesta renal al estrés físico y a la deshidratación (Hao et. al., 1999; Yang et. al. 1999). Después de un estado de deshidratación, la COX-2 de la médula renal es inducida significativamente, por activación de la vía del NF- $\kappa$ B (Hao et. al., 1999); otros estudios sugieren que es a través de MAP cinasa/JNK, ERK y p38 (Wojtaszek et. al., 1998).

El rol que juega la COX-2 en la médula es la habilidad de estas células para sobrevivir en un estado hipertónico de estrés o por deshidratación a razón de 300 a 500 mosmol/Kg H<sub>2</sub>O. De esta forma esta enzima mantiene la viabilidad de las células medulares intersticiales. Ante de tratamiento con un inhibidor COX-2, un estado de deshidratación induce apoptosis de las células intersticiales medulares (Hao et al., 2000)

En la corteza renal se ha documentado la expresión de la COX-2 en la mácula densa en las células adyacentes a la rama ascendente de el asa de Henle en ratón, rata, conejo, y perro (Guan et al., 1997; Harris et al., 1994; Khan et al., 1998). Hay controversia con el humano, aunque en mayores de 60 años se localiza en ambos lugares de la corteza renal. La MD es relacionada con la liberación de renina al detectar alteraciones en el cloruro luminal a través del cotransportador Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> (Cowly et al., 1994, 1995). La expresión de COX-2 en la MD se sobreexpresa al alimentar con dieta baja en NaCl, al tratar con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), diuréticos de asa, por hipertensión renovascular y por antagonistas de los receptores AT1 (Harding et al., 1997).

La disminución intraluminal de Cl<sup>-</sup> es la señal para que se estimule la expresión de COX-2 (Lorenz et al., 1990) a través del cotransportador antes mencionado. Se



realizaron experimentos en cultivo de células en un medio 25 mM de  $\text{Na}^+$  y 7 mM de  $\text{Cl}^-$  (medio bajo en  $\text{Na}^+$ ) donde se observó el aumento de la expresión de esta enzima, en un medio de 100 mM (concentración de NaCl en condiciones normales) donde no se observó aumento de la enzima (Harris et al., 2001) y en un medio de de alto cloruro de colina, la expresión disminuyó. Al inhibir el cotransportador se aumentó la expresión.

La disminución del NaCl aumenta la expresión de COX-2 en 1 h

Los eventos de señalización intracelular que nos llevan a la sobre expresión de COX-2 en respuesta al bajo NaCl son iniciados por la fosforilación rápida de las cinasas p38 (Cheng et al., 2000)., se demostró que al inhibir con PD169316 , un inhibidor de p38, se inhibe el incremento de la COX-2 como respuesta al decremento de NaCl; esto sugiere el rol de p38, además de estar localizado en los mismo lugares que la COX-2 en la corteza renal (MD y rama ascendente de el asa de hele) (Kummer et al., 1997; Ito et al., 2000).

No se conoce el mecanismo por el cual el  $\text{Cl}^-$  activa p38 y otras MAPK en la MD; estas son activadas por fosforilación secuencial de un activador MEK por fosforilación dual de residuos de tirosina y treonina (Widmann et al., 1999; Schaeffer et al., 1999). p38 incrementa COX-2 por regulación postranscripcional.

En la DM se aumenta la expresión de COX-2, en estadios tempranos de la nefropatía, las prostaglandinas vasodilatadoras tal como la  $\text{PGE}_2$  han sido implicadas en mediar las alteraciones en la hemodinámica renal en humanos con DM1 y modelos experimentales (Radko et al., 2001)

La  $\text{PGE}_2$  es el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico por la COX-2 en el riñón (Bonvalet et al., 1987) media la hemodinamia renal glomerular y la reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$  durante el estrés fisiológico, y puede iniciar la producción de renina (Jensen et al., 1996). La  $\text{PGE}_2$  se localiza entre otros lados en la MD, se encuentra en contacto con el glomérulo. Estas células detectan los cambios en el NaCl tubular y envía señales que controlan la resistencia vascular preglomerular y la filtración glomerular (Harris et al., 1998). La  $\text{PGE}_2$  es un vasodilatador potente, esta prostaglandina interactúa con cuatro diferentes receptores designados como  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  y  $\text{EP}_4$  (Breyer M, Breyer RM, 2000);



los receptores exceptuando el EP<sub>1</sub>, son proteínas G acopladas a la adenilciclasa y el EP<sub>1</sub> está acoplado a IP<sub>3</sub> y diacilglicerol. Los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> modulan el tono vascular y transporte epitelial su activación provoca constricción. Los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>, permiten que la PGE<sub>2</sub> sirva como buffer previniendo la respuesta excesiva de perturbaciones fisiológicas, su activación se traduce en vasodilatación (Schaefer et al., 1998)

EP<sub>1</sub>. Descrito como constrictor de músculo liso, este receptor se encuentra localizado en útero y riñón (Bátshake et al., 1995), juega un papel importante en mediar el dolor; en riñón se localiza en el túbulo colector donde inhibe la reabsorción de Na<sup>+</sup>, es una proteína Gq (An S et al., 1994)

EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> regulan la reactividad vascular. El Receptor EP<sub>4</sub> es un clon del EP<sub>2</sub>, se localizan principalmente en el glomérulo, son proteínas Gs (Nishigaki et al., 1995)

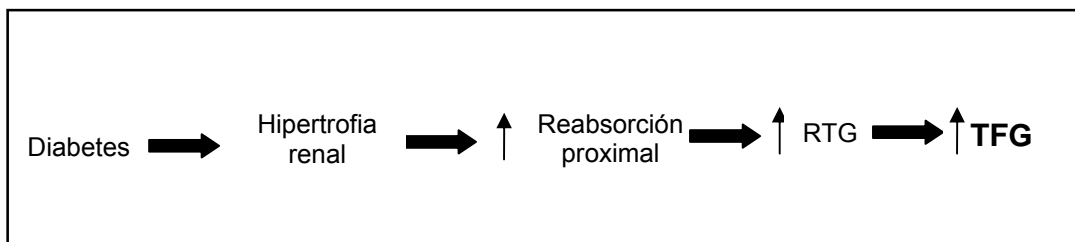
EP<sub>3</sub> este receptor se localiza en el asa ascendente de Henle es una proteína Gi generalmente actúa como constrictor de músculo liso (Coleman et al., 1994)



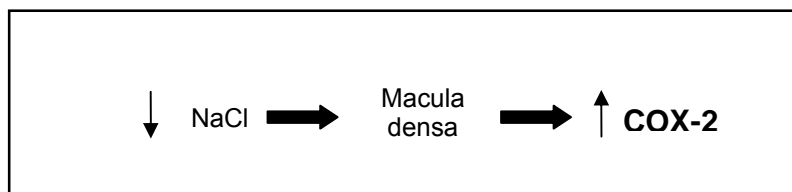
#### 4.- PLANETAMIENTO DEL PROBLEMA

1.- La Diabetes Mellitus es un problema de salud pública que va en aumento su morbilidad; la alta mortalidad causada por esta patología es por sus complicaciones siendo la principal de ellas la nefropatía diabética.

2.- En los modelos experimentales de diabetes inducida por estreptozotocina hay una hipertrofia renal que disminuye la concentración de NaCl que se detecta en Mácula Densa por aumento en la reabsorción proximal, provocando un aumento en la retroalimentación tubuloglomerular y a su vez un incremento en la tasa de filtración glomerular provocada por vasodilatación arteriolar aferente.



3.- Se ha observado que en ratas normales alimentadas con dieta baja en NaCl la enzima ciclooxygenasa 2 se sobreexpresa en la macula densa



4.- Por tanto: ¿Cómo influye el NaCl sobre la expresión de COX-2 en mácula densa en ratas diabéticas?





## **II. HIPÓTESIS**

En la DM hay un aumento en la expresión de COX-2 en la corteza como consecuencia de los cambios de NaCl.

## **III. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el papel del NaCl en la regulación de la expresión de COX-2 en corteza durante la DM inducida por estreptozotocina en ratas.

### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

2.1) Reproducir el modelo de diabetes en rata.

2.2) Caracterizar los cambios en la expresión de COX-2 en la DM inducida por estreptozotocina.

2.3) Estudiar si la administración de una dieta con bajo o alto NaCl influye en la expresión de COX-2 en la corteza renal durante la DM.

2.4) Estudiar si la inhibición de la reabsorción de NaCl en el TCP con acetazolamida modifica la expresión de COX-2 en la corteza renal.



## IV MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se emplearon para la caracterización del modelo experimental de diabetes los siguientes grupos:

*Grupo 1:*

Este grupo estuvo constituido por 6 ratas wistar macho de  $250\pm 20$  g de peso consideradas como ratas control, a las cuales se les aplicó intraperitonealmente el vehículo de la estreptozotocina (citrato de sodio (0894 AMRESKO. U.S.A.)).

*Grupo 2:*

Este grupo estuvo constituido por 6 ratas con las características antes mencionadas, a este grupo que se les consideró como grupo de ratas diabéticas, se les aplicó intraperitonealmente estreptozotocina (S-0130 CHEMICAL CO, St. Louis, MO U.S.A.) a la dosis de 65mg/Kg de peso.

Todas las ratas se mantuvieron en condiciones similares de luz, acceso al alimento (SIGMA-alimentos. U.S.A.) y agua *ad libitum*. Los animales fueron cuidados con las técnicas humanitarias de manejo, aprobadas por el comité de bioética de postgrado de nuestra institución y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

A cada rata se le administró intraperitonealmente citrato de sodio o estreptozotocina según correspondiera de acuerdo al grupo; previamente se les dejó en ayuno de 12 h para cuantificar la glucemia a través de un glucómetro por refracción; posterior a la administración, se les dejó en observación durante 48 h y se midió nuevamente la glucemia. Cada día se pesó a las ratas para observar si había modificaciones en el peso. Se consideró a las ratas controles al observar valores de glucosa entre 60 y 110 mg/dl dentro del grupo al cual se le administró citrato de sodio, la instauración de la diabetes se les consideró al obtener valores de glucosa sérica mayores a 200 mg/dl con respecto al grupo control. Al quinto día se colocó a cada rata en una jaula metabólica (Tecniplast. Italy), se les dejó 48



h, el segundo día de la jaula metabólica se procedió a la cuantificación de alimento y agua ingerida en 24 h, así como la recolección de orina de 24 h, para la cuantificación de sodio, creatinina, glucosa y proteínas. Se les sacrificó al finalizar las segundas 24 h en la jaula metabólica, obteniendo muestras de sangre para la cuantificación de sodio, glucosa y creatinina. Se obtuvo el peso de cada riñón y la corteza renal se extrajo para teñirlas con hematoxilina-eosina y para obtener la expresión proteica de la COX-2 mediante western blot.

Para estudiar si la regulación de la expresión de COX-2 era influenciada por la absorción alterada por la hipertrofia causada en los estadios tempranos de la diabetes se llevaron a cabo los siguientes bloques experimentales:

*Bloque I: efecto de la dieta alta en sodio ((8%) Harlan alimentos. USA.) en la expresión de COX-2 en la mácula densa durante la diabetes mellitus.*

Este bloque estuvo formado por dos grupos experimentales, cada grupo constituido por 6 ratas Wistar macho de  $250\pm 20$  g de peso, denominados grupo control y diabético tratados con dieta alta en sodio, al grupo control se le administró intraperitonealmente citrato de sodio, y al grupo al cual se le considera diabético se le administró estreptozotocina.

*Bloque II: efecto de la dieta baja en sodio ((0.02%) Harlan alimentos. USA) en la expresión de COX-2 en la mácula densa durante la diabetes mellitus.*

Bloque formado por dos grupos experimentales, constituidos por 6 ratas Wistar macho de  $250\pm 20$  g de peso, denominados grupo control y diabético tratados con dieta baja en sodio, al grupo control se le administró intraperitonealmente citrato de sodio, y al grupo al cual se le considera diabético se le administró estreptozotocina.

*Bloque III: efecto de la acetazolamida (A-6011. SIGMA-ALDRICH. USA)) en la expresión de COX-2 en la mácula densa durante la diabetes mellitus.*

Bloque formado tres grupos experimentales, constituidos por 6 ratas Wistar macho de  $250\pm 20$  g de peso, denominados grupo del vehiculo de acetazolamida (dimetil sulfoóxido DMSO (D 8418. SIGMA-ALDRICH. USA)), grupo control y diabético tratados con acetazolamida a la dosis de (5mg/kg), vía intraperitoneal



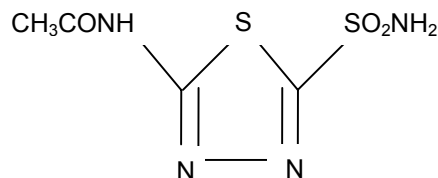
cada 12 h. Este fármaco es un inhibidor de la anhidrasa carbónica (Corinne et al., 2000).

Con respecto a estos grupos experimentales se les dio el mismo manejo que a los grupos considerados control y diabético obteniendo de ellas la corteza renal, orina y sangre para realizar las determinaciones antes mencionadas.

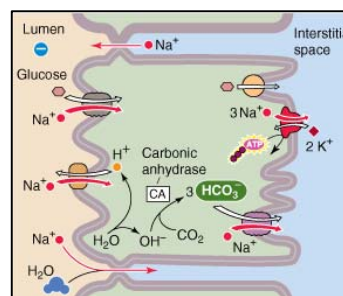
Fármaco utilizado: Acetazolamida

Pertenece a la familia de los inhibidores de la anhidrasa carbónica.

Química: sintetizada a partir de la sulfanilamida, al observar que provocaba acidosis metabólica como efecto adverso por inhibir a la anhidrasa carbónica; derivadas de esta se generaron compuestos con diferente habilidad de inhibir la anhidrasa carbónica.



Mecanismo de acción: las células endoteliales de los túbulos proximales están dotadas de una metaloenzima zinc anhidrasa carbónica, que se localizan en la membrana luminal y basolateral, así como en el citoplasma (Brown et al., 1988)



**Figura 4.1.** Célula del túbulo proximal (Boron et al., 2005)

La participación clave de la anhidrasa carbónica es en la resorción de carbonato monoácido de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). En los túbulos proximales, la energía del gradiente de sodio establecida mediante la bomba de sodio basolateral es usada por el antiportador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> en la membrana luminal para transportar H<sup>+</sup> hacia la luz tubular en intercambio por Na<sup>+</sup>. (Hardman et al., 1996). En la luz el H<sup>+</sup> reacciona con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> filtrado para formar ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) que se



descompone en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en presencia de la anhidrasa carbónica. La operación continua del antiportador de  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  conserva una concentración baja de protones en la célula, de modo que el  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , reacciona se ioniza de manera espontánea para formar anión hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) y  $\text{HCO}_3^-$  (Cogan et al., 1979). La inhibición de la anhidrasa carbónica se relaciona con un aumento rápido de la excreción urinaria de  $\text{HCO}_3^-$  incrementando el pH urinario hasta alrededor de 8 genera aparición de acidosis metabólica. La inhibición de la anhidrasa carbónica contribuye a la actividad diurética de los inhibidores de dicha enzima por el gran exceso de anhidrasa carbónica en los túbulos proximales, se necesita inhibir un alto porcentaje de la actividad enzimática para excretar  $\text{Na}^+$ , la excreción fraccionaria de sodio puede ser de 5 %, por lo tanto incrementan la liberación de solutos hacia la mácula densa, esto desencadena la retroalimentación tubuloglomerular (Person et al., 1982)

Absorción y eliminación: absorción oral y perenteral vida media de 9 h y eliminación renal

Efectos adversos: pérdida de  $\text{Na}^+$ , acidosis metabólica y alcalinización de la orina.

Dosis utilizada: 5 mg/kg peso

## **2.- ANÁLISIS POR INMUNOBLOT (WESTERN BLOT) DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA COX-2 EN LA CORTEZA RENAL DE RATA**

### **2.1.- Homogenización**

A los animales de cada grupo, después de la jaula metabólica se les pasó a una campana con éter etílico para su anestesia, se realizó una incisión abdominal transversal continuada en forma de U hasta la región axilar, se les extrajo ambos riñones, disecándolos en corteza, médula y papila. Se tomó la corteza homogenizando aproximadamente 100 mg de tejido en frío (4 °C) individualmente con la ayuda de un politrón (tissue terror, Biospec Products, INC. U.S.A.) en una solución Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), con un cocktail antiproteasas que consistió en PMSF [1.74 mg/ml de DMSO], TLCK [0.09M], IAA [0.001 M], y NEM [0.002 M] (SIGMA CHEMICAL CO, St Louis, MO U.S.A.) a una velocidad (entre 10,000 y



13,000 rpm) durante 2 minutos. El homogenizado se colocó en tubos de centrifuga de 2 ml y se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C, por 10 minutos con el equipo Sorvall Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products, Germany). Se toma el sobrenadante separándolo en alícuotas de 200 µl para su posterior uso.

Soluciones empleadas:

Solución homogenizadora	Tris-HCl 100mM, pH 7.4. Para preparar esta solución se disolvió 7.88 g de Tris-HCl (sigma) en 500 ml de agua desionizada, ajustándola a pH 7.4, 1 ml para 100 mg de tejido
Cocktail antiproteasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PMSF [1.74 mg/ml de DMSO]: disolver 52.3 mg en 30 ml de DMSO, 10 µl por cada ml de solución homogenizada.</li> <li>- TLCK [0.09M]: Se disuelve 33.23 mg en 1 ml de agua desionizada, 10 µl por cada ml de solución homogenizada</li> <li>- IAA [0.001 M]: 6.6 g en 30 ml de agua desionizada, 10 µl por cada ml de solución homogenizada.</li> <li>- NEM [0.002 M]: 18.7 mg en 30 ml de agua desionizada, 10 µl por cada ml de solución homogenizada.</li> </ul>

## 2.2.- Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con el Método modificado de Bradford (Bradford, 1976) (micrométodo). Se realizó el procedimiento en la placa para ELISA por duplicado. Para la curva de calibración se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µg de proteína a partir de una solución madre de 0.1 µg/µl de albúmina sérica bovina, completándose con buffer PBS a 160 µl. En el caso de las muestras, se agregan 5 µl del homogenizado y se adicionaron 155 µl de buffer PBS. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregaron 40 µl de reactivo de Bradford, se mezcló cada pozo y se leyó la absorbancia a 595 nm, en un lector para ELISA (Microplate; BIORAD). Se construyó la curva de calibración en Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.



## Soluciones empleadas:

Reactivo de Bradford (5X)	Se disuelven 100 mg de Azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de Etanol al 95 %. Una vez disuelto, se agregan lentamente 100 ml de Ácido fosfórico concentrado. Posteriormente se afora a 200 ml con agua desionizada. Se almacena a 4°C evitando la exposición a la luz (frasco ámbar); en estas condiciones se puede mantener estable por 6 meses.
Solución de PBS	Para prepara 1 litro de solución 10X se pesan 80g de NaCl, 2 g de KCl, 11.5 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y 2 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y se afora a 1 litro con agua desionizada; se ajusta el pH a 7,4.

**2.3.- Electroforesis**

Las alícuotas de las muestras (200 µl) se mezclaron con 20 µl de buffer de carga y 40 µl de β- mercaptoetanol (como agente reductor) y se hirvieron (100 °C) durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (Gel de corrida) y al 6 % el gel concentrador, cargándose una cantidad constante (100 µg) de la muestra. Se cargaron 10 µl de marcador de peso molecular Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences) de 10000 a 250000 daltons; kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad) de 6918 a 203926 daltons. La electroforesis se llevó en un equipo MiniPROTEAN 3 Cell de BIO-RAD durante 2 horas a 88 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular a favor de un gradiente eléctrico.

## Soluciones empleadas:

Solución Acrilamida	Se disuelven 30 g de acrilamida y 0,8 g de Bis-acrilamida (N,N'-metylen-bis-acrilamida) en 50 ml de agua desionizada. Se afora a 100 ml. Debe prepararse en campana de extracción.
Solución de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	Se disuelven 90.75 g de Tris-base aforando a 500 ml agua desionizada y se ajusta el pH a 8.8. Se almacena entre 2-8 °C.
Solución de Tris-HCl 1.0 M (pH 6.8)	Se disuelven 6.06 g de Tris-base ó 7.882g de Tris-HCl aforando a 100 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1N. Se conserva entre 2-8 °C.
Solución de SDS al 10 %	Se pesan 10g de SDS y se disuelven aforando a 100 ml de agua desionizada. Se conserva a temperatura ambiente.



Solución de persulfato de amonio al 10 %:	Se disuelven 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. Se conserva entre 2-4 °C.
Buffer de carga para Inmunoblot (10X).	Se adicionan en un tubo Falcon de 50 ml los reactivos en el siguiente orden: agua desionizada (0,5 ml), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (12,5 ml), SDS al 50 % (2 ml), Glicerol (10 ml) y Azul de Bromofenol (0,12 g). A la mezcla resultante se le agrega la cantidad necesaria de $\beta$ -mercaptoetanol para obtener una concentración final de 20 % del volumen de buffer de carga. El buffer de carga con $\beta$ -mercaptoetanol se adiciona a la muestra, de manera que alcance una concentración final del 10 % del volumen de la muestra. Se almacena en refrigeración.
Buffer de corrida para inmunoblot (10X)	Se pesan 30.2 g de Tris-HCl, 144 g de Glicina y 10 g de SDS. Todo se disuelven perfectamente en agua desionizada aforando a 1000 ml. Se almacena entre 2 y 8 °C.

#### Preparación de geles:

Soluciones	Gel de corrida (poliacrilamida al 10 %)
Agua desionizada	4.0 ml
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml
SDS 10 %	0.1 ml
Acrilamida-Bis acrilamida al 30 %	3.3 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

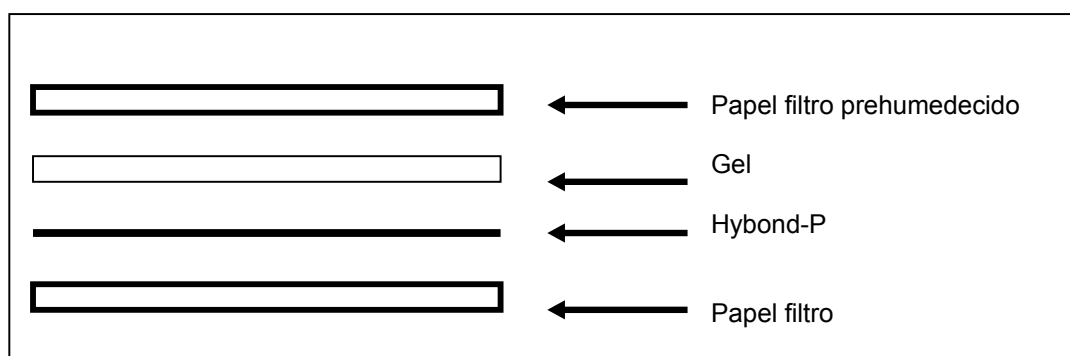
Soluciones	Gel concentrador (poliacrilamida al 6 %)
Agua desionizada	1.4 ml
Tris 0.5 M (pH 6.8)	0.25 ml
SDS 10 %	0.02 ml
Acrilamida-Bis acrilamida al 30 %	0.33 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.02 ml
TEMED	0.002 ml





## 2.4.- Transferencia

Ya que se terminó la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas PVDF (Hybond-P, Amersham Bioscences, UK) empleado en un sistema semiseco Trans-blot SD Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad durante 45 minutos a 15 volts. Para este paso se prehumedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto por 5 minutos y posteriormente se sumergió en buffer de transferencia junto con los papeles filtro (Extra Thick Blot Paper de Bio-Rad). Todos los pasos deben realizarse con guantes y de preferencia con pinzas. La membrana de PVDF, el Gel y los papeles filtros se dispusieron de la siguiente manera en la unidad de transferencia (a manera de sándwich). (Figura 4.11).



**Figura 4.2.** Componentes del sándwich de transferencia

Buffer de transferencia 10X	Se pesan y mezclan con agua desionizada los siguientes reactivos: Tris-HCl (3,0275 g), Glicina (14,4413 g) y se afora a 1000 ml. Esta solución madre se almacena entre 2 y 8 °C. Para prepara 200 ml de buffer de transferencia se disuelven 20 ml de la solución madre, 140 ml de agua desionizada y 40 ml de metanol. Debe ser en este orden para evitar la precipitación de las sales. La proporción es: 10 % de solución madre, 70 % de agua desionizada y 20 % de metanol en la solución final.
-----------------------------	--

## 2.5.- Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos.

Ya que se realizó la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con TBST-Leche al 5% durante 2 h a temperatura ambiente, en agitación constante, con la



finalidad de bloquear con caseína el resto de la membrana donde no hay proteína transferida.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo contra la enzima COX-2 (72 kDa) y cabra contra  $\beta$ -actina (43 kDa; Santa Cruz Biotechnology), diluidos 1:200 y 1:1000 respectivamente, en TBST-leche al 5 % a 4 °C durante toda la noche en agitación continua.

A continuación se lavaron las membranas 3 veces con TBST durante 10 min y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-cabra respectivamente; Santa Cruz Biotechnology) conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:1000 en TBST-leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con TBST durante 10 min.

Soluciones empleadas:

Solución de TBS (10X)	Se pesan 12,1 g de Tris-HCl o Tris-base y 89 g de NaCl y se afora a 1000 ml. Estando bien disueltos se almacena en refrigeración.
Solución de TBST (Tween) al 0,1 %:	a 1 litro de TBS 1X se le agrega 1 ml de Tween 20. Es conveniente pipetearlo con una jeringa de insulina debido a que es una sustancia muy espesa
Solución de TBST-leche al 5 %:	se pesan 5 g de leche en polvo (Svelty) y se afora a 100 ml con solución de TBST al 0,1 %, posteriormente se mezclan y se mantiene en agitación constante.

## 2.6 Reacción de Quimioluminiscencia

Las membranas se incubaron con sustrato quimioluminiscente (Western Blotting Luminol Peagent; Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A), siguiendo las recomendaciones del fabricante, posteriormente se expusieron a una película (Hyperfilm, Amersham Biosciences) dentro de un cassette (Spectroline; Spectronics Corporation) ensamblado a una pantalla intensificadora de imagen (Biomax; Kodak) entre 1 y 2,5 minutos. A continuación se revelaron y fijaron con la solución reveladora (Kodak Professional Dektol, Rochester, N.Y., U.S.A.) y fijadora (Kodak Professional Rapad Fixer, Rochester, N.Y., U.S.A.) para finalmente incluirlas en un baño de paro (Agua) y ponerlas a secar.



Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3200C (Hewlett Packard). La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (Quantity One 1-D Image Analysis Software; Bio-Rad) donde se hizo un análisis densitométrico posteriormente normalizado con la intensidad de la  $\beta$ -actina (control interno).

Soluciones empleadas:

Solución reveladora (2X)	A 180 ml de agua desionizada (38 °C) se le agregan 29 g de revelador y se agita vigorosamente, posteriormente se afora a 200 ml con agua desionizada y se envasa en un recipiente protegido contra luz. Se almacena a temperatura ambiente.
Solución fijadora	Se disuelven 49,78 ml de solución A en 100 ml de agua desionizada y en agitación constante se agregan 5,47 ml de solución B a goteo lento. Consecutivamente se afora a 200 ml con agua desionizada y se almacena a temperatura ambiente.

### 3.- TINCIÓN DE LA CORTEZA RENAL DE RATA

A través de la técnica hematoxilina-eosina se realizó tinciones de la corteza renal para medir el diámetro de las células del túbulo proximal, el cual consistió en lo siguiente:

- 1.- La corteza renal se conservó en formaldehído al 4%.
- 2.- Deshidratación de la muestra a través de alcoholes a porcentajes crecientes (Alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 96% 1, alcohol 96% 2, alcohol 100% 1, alcohol 100% 2, xileno 1, xileno 2).
- 3.- Inclusión en parafina.
- 4.- Corte de tejido en microtomo al tamaño de 7 $\mu$ .
- 5.- Baño María (35-40 min).
- 6.- Meter a estufa durante 20 min.
- 7.- Desparafinación (xileno 2, xileno 1, alcohol 100%, alcohol 96% 1, alcohol 80%, alcohol 70%)
- 8.- Hidratar con agua destilada.
- 9.- Coloración con hematoxilina de Harris durante 5 min.
- 10.- Lavar por inmersión en el agua corriente.
- 11.- Aplicación de Alcohol ácido.



12.- Lavar con agua corriente y posteriormente destilada.

13.- Coloración con eosina durante 30 min.

14.- Lavar con alcohol 96%. 1 min, después con alcohol al 100% y al final con xileno. (5 min mínimo).

15.- Montar en resina sintética.

Posteriormente se fija en un porta objetos, para poder observarlo en un microscopio óptico (Nylon eclipse e600) y a través del software Image Pro Plus versión 5.1, se realizó la medición del área de las células del túbulo proximal.

## **4.- ANALISIS DE ORINA Y PLASMA**

### **4.1 Determinación de la concentración de Glucosa en sangre**

Se realizó de acuerdo al día que correspondiera, previo ayuno de 8 h, se les tomo a los grupos de ratas una gota de sangre de la cola, la cual se colocó en una tira reactiva, posteriormente se analizó en el glucómetro (Kit One touch. LIFESCAN INC. U.S.A.).

### **4.2 Determinación de la concentración de Na<sup>+</sup> y creatinina en orina y suero.**

Para la determinación de Na<sup>+</sup> y creatinina de las muestras de orina de 24 h y suero al momento del sacrificio, se analizaron a través del autoanalizador Beckman (249447-F).

Para la determinación de Na<sup>+</sup> se tomaron 500 µl de las diferentes muestras, las cuales se colocaron en los carruseles del equipo para cuantificarlos a través de electrodos de sodio, que constan de una membrana sólida de vidrio de silicato de aluminio (LAS). La muestra al entrar al en contacto con el electrodo de medición, los iones del sodio sufren un intercambio iónico en la capa hidratada exterior del electrodo del vidrio LAS. Al realizarse el intercambio, se establece un cambio en el potencial que obedece a la ecuación de Nerst. El electrodo tiene una selectividad de 300 a 1 sobre los iones de potasio.

Para la determinación de creatinina se realizó con el mismo equipo a través del principio de espectrofotometría, que se basa en que cuando una sustancia que tiene la propiedad de absorber luz de una longitud de onda específica, (conocida esta sustancia como cromóforo). Según la Ley de Beer, la cantidad de luz



absorbida al completarse la reacción, es proporcional a la concentración del constituyente que se está midiendo

#### **4.3.- Determinación de Proteínas en orina**

La determinación de proteínas en orina y suero se determinó con el Método modificado de Bradford (Bradford, 1976) (micro método). Para la curva de calibración se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína a partir de una solución madre de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina, completándose con buffer PBS a 160  $\mu\text{l}$ . En el caso de las muestras, se agregan 5  $\mu\text{l}$  de la orina y se adicionaron 155  $\mu\text{l}$  de buffer PBS. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregaron 40  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford, se mezcló cada pozo y se leyó la absorbancia a 595 nm, en un lector para ELISA (Microplate; BIORAD). Se construyó la curva de calibración en Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.



## IV. ESTADÍSTICA

Para todos los grupos se calculó la media  $\pm$  SE. Para analizar los resultados que reproducen el modelo de diabetes se utilizó t de Student; para determinar si existen diferencias en los grupos con diferentes tratamientos se utilizó ANOVA. Las medias se compararon con la prueba de Bonferroni. Se consideró una diferencia significativa si  $p < 0.05$ .



## VI. RESULTADOS

Se estudió la expresión de la COX-2 en la corteza renal en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas macho, se observó como la Diabetes y el NaCl modifica a la alza o la baja dicha expresión por ingesta de una dieta baja en sodio, una dieta alta en sodio, y a través de inhibir la reabsorción de  $\text{Na}^+$  con acetazolamida.

### 1. REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE DIABETES.

Con el modelo que se reprodujo se obtuvieron datos de diferentes parámetros que reflejan la diabetes. Se cuantificó la glucemia de los grupos designados como control (se les administró citrato de sodio) (C) y diabéticas (se les administró estreptozotocina (STZ)) (DM), en el momento de la inducción, a las 48 h de la administración (considerado este como día cero) y a los 7 días al momento del sacrificio; al inicio no hubo diferencia entre la glucemia de las ratas de ambos grupos en valores promedio  $73 \pm 5$  mg/dl para el grupo C y  $70 \pm 9$  mg/dl para el de DM; a las 48 h, se observó diferencia entre ambos grupos para el grupo C fue de  $74 \pm 8$  mg/dl ( $p < 0.05$ ) y para el grupo de DM fue de  $280 \pm 15$  mg/dl y al momento del sacrificio se mantuvo esa diferencia para el grupo C fue  $277 \pm 14$  mg/dl y para el grupo de DM fue de  $290 \pm 12$  mg/dl ( $p < 0.05$ ), (figura 6.1.1, 6.1.2, 6.1.3),



## Inducción

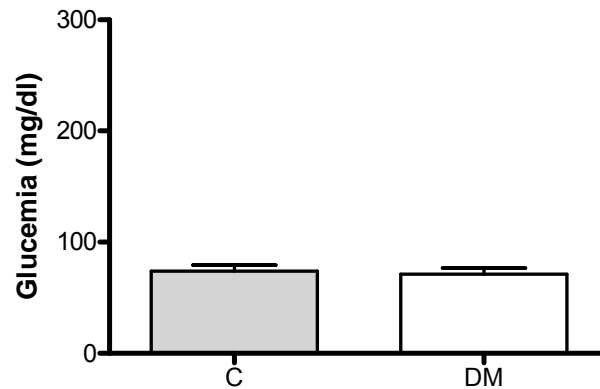


Figura 6.1.1

## 48 h post-inducción

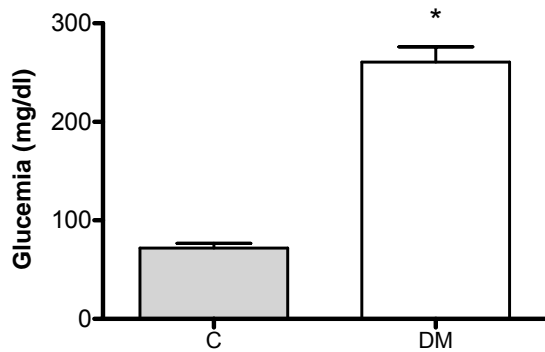


Figura 6.1.2

## Ultimo día de tratamiento

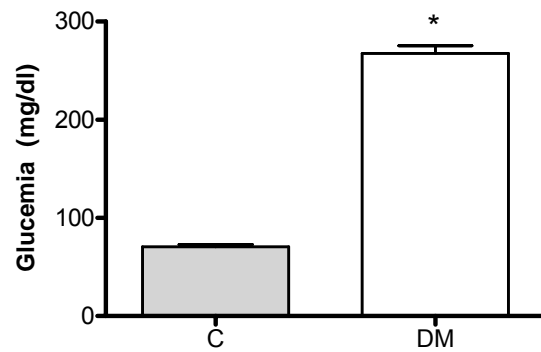
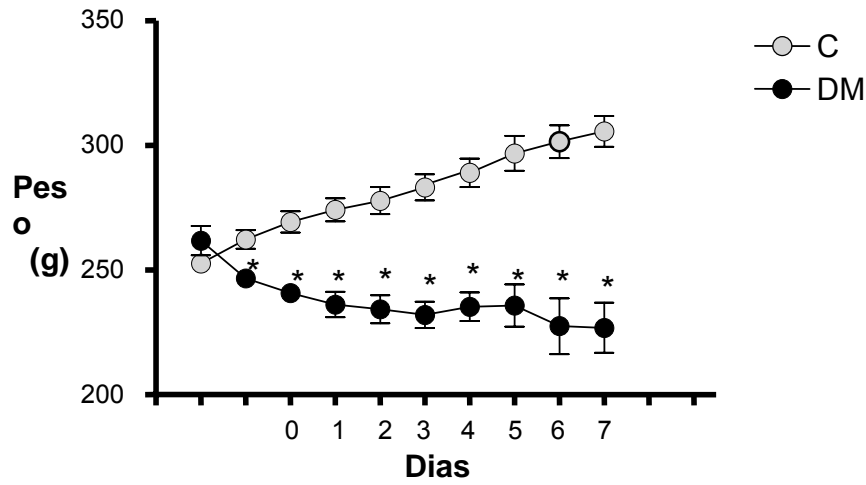


Figura 6.1.3

**Figuras 6.1.1-6.1.3.** Glucemia del grupo control (C) y al cual se le administró STZ (DM), al inicio, a las 48 h y al séptimo día (último día de tratamiento). Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 6 animales, \* $p < 0.05$ .

Los animales se pesaron diariamente y al analizar los datos, se observó que el grupo control (C) aumentó de peso conforme avanzó el experimento y al grupo al cual se le administró estreptozotocina (DM) disminuyó (figura 6.1.4); en cuanto a la ingesta de agua y alimento en 24 h para el grupo control fue de 33.5 ml de agua y 21 g de alimento y para el grupo al cual se le administró estreptozotocina fue de 133 ml y 30 g respectivamente ( $p < 0.05$ ) (figura 6.1.5- 6.1.6).





**Figura 6.1.4.** Peso de ratas del grupo (C) y el grupo (DM), a las 48 h (día cero) de haberles administrado citrato de sodio o estreptozotocina según correspondiera, durante 7 días. n= 6, \*p<0.05.

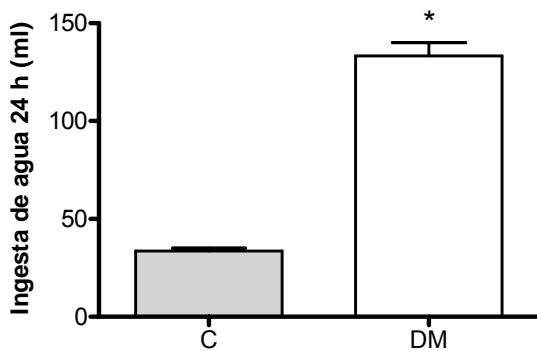


Figura 6.1.5

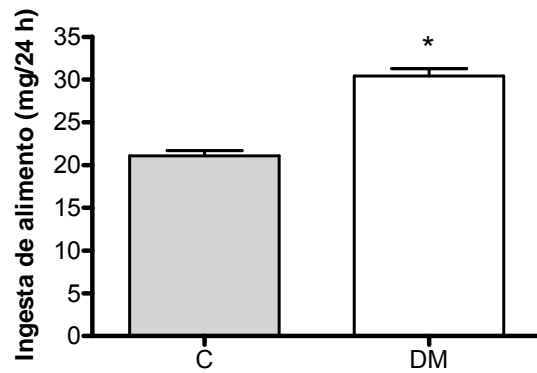
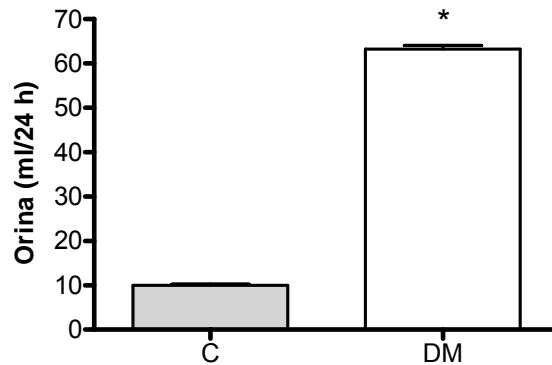


Figura 6.1.6

**Figura 6.1.5 y 6.1.6.** Ingesta de agua y alimento de ratas C y DM, durante un periodo de 7 días después de la administración de citrato de sodio o STZ. n= 6, \*p<0.05.

El volumen de orina en 24 h se incrementó de manera significativa en el grupo de DM con respecto al control. El volumen urinario fue para el grupo C de 10±2 ml y para el de DM de 63±8 ml (figura 6.1.7) (p<0.05).

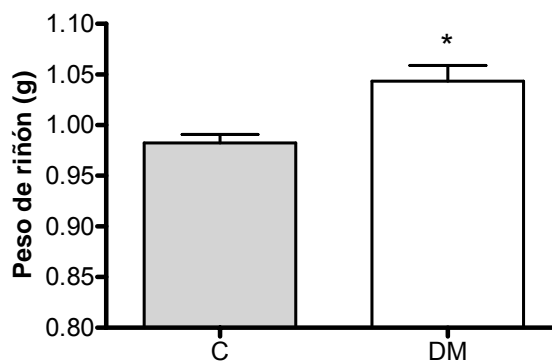


**Figura 6.1.7.** Volumen urinario de ratas C y DM durante 24 h. n=6 \*p<0.05

Se evaluaron otros parámetros para observar el tamaño renal, que nos hablan de hipertrófia.

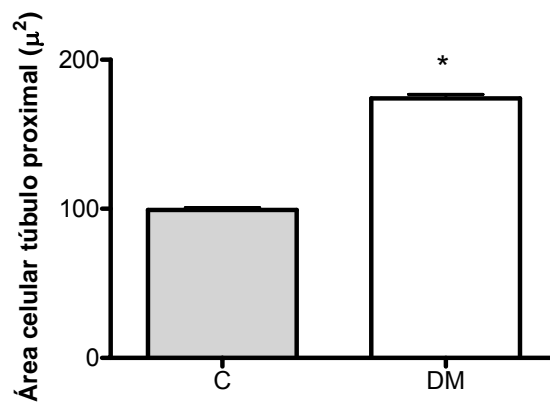
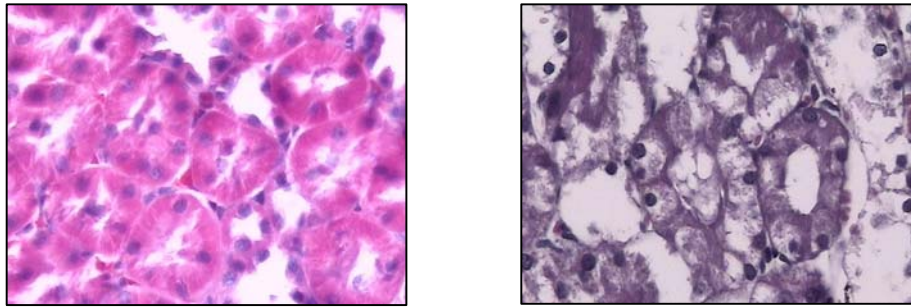
## 2. TAMAÑO RENAL.

Se pesaron los riñones de ambos grupos encontrando diferencia significativa (p<0.05) entre ambos grupos para el grupo C fue  $0.98 \pm 0.008$  g y para DM  $1.04 \pm 0.015$  g (figura 5.2.1).



**Figura 6.2.1.** Peso de riñón de los grupos C y DM al momento del sacrificio. n=6 \*p<0.05.

Se midió el área celular de del túbulo proximal, demostrando un aumento en el área celular del grupo DM en comparación con el grupo C, las células del grupo C midieron  $99.29 \pm 1.37 \mu^2$  y las del grupo de DM  $174 \pm 2.74 \mu^2$  (figura 6.2.2) (p<0.05)

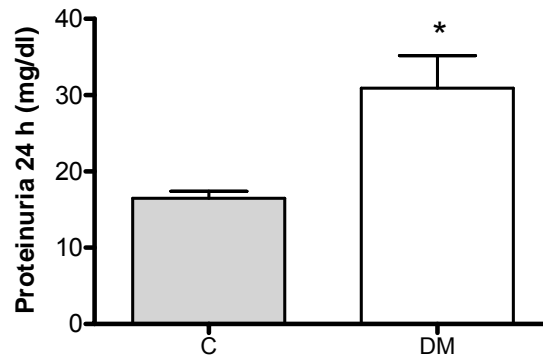


**Figura 6.2.2.** Área celular del túbulo proximal de los riñones de los grupos C y DM. n=100 \*p<0.05.

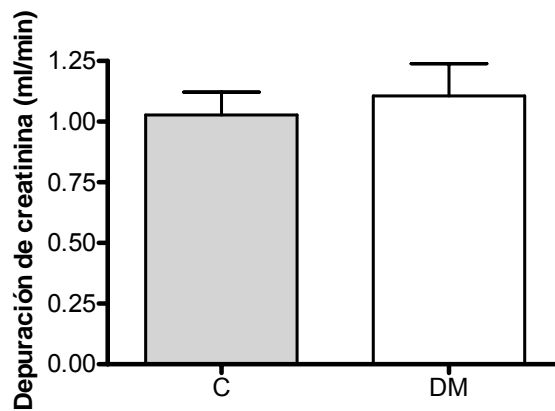
### 3. FUNCIÓN RENAL

Se evaluaron parámetros de función renal, como la proteinuria y depuración de creatinina; además se midió la excreción renal de  $\text{Na}^+$  y la concentración de  $\text{Na}^+$  en sangre.

La proteinuria en orina de 24 h del grupo C fue  $16 \pm 3$  mg/dl y para el grupo de DM fue  $30 \pm 4$  mg/dl (figura 6.3.1) existiendo diferencia significativa entre ambos grupos; y en cuanto a la depuración de creatinina no hubo diferencia entre los dos grupos (figura 6.3.2).



**Figura 6.3.1.** Proteinuria del grupo C y de DM. n=6, \*p<0.05.



**Figura 6.3.2.** Depuración de creatinina urinaria en los grupos C y DM. n=6, \*p<0.05.

Se evaluó el manejo del  $\text{Na}^+$  por del riñón; los valores en  $\text{Na}^+$  en suero para el grupo C fue de  $146 \pm 1.36$  mmol/L y para el grupo de DM fue  $138 \pm 2.1$  mmol/L (figura 6.3.3). En cuanto a el  $\text{Na}^+$  en orina de 24 h hubo diferencia significativa con valores para el grupo C de  $1762 \pm 54$  mmol/L y para el grupo de DM  $699 \pm 50$  mmol/L (figura 6.3.4).

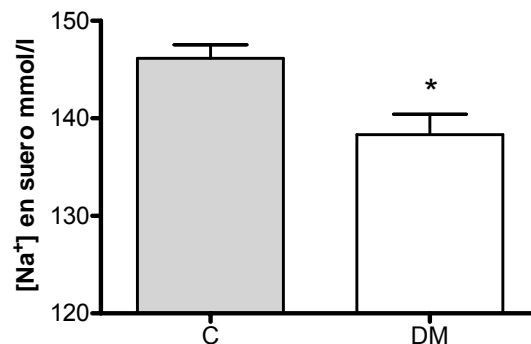


Figura 6.3.3. Sodio en sangre de ambos grupos. n=6, \*p<0.05.

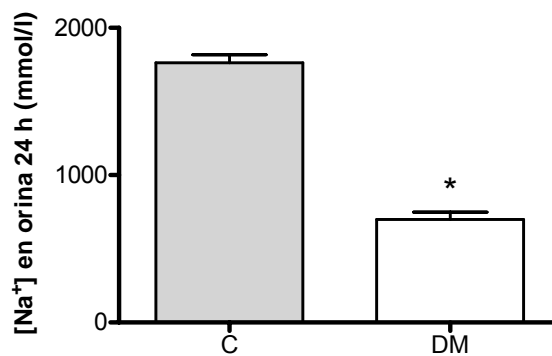
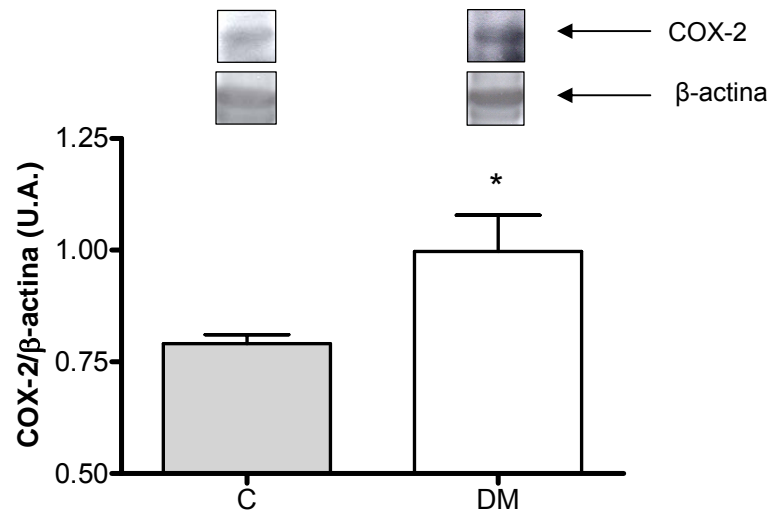


Figura 6.3.4. Excreción urinaria de sodio en 24 h. n=6, \*p<0.05.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE COX-2 EN EL RIÑÓN DE RATAS CONTROL Y DIABÉTICAS.

Después de sacrificar a las ratas se divide al riñón en corteza, médula y papila; se obtiene de este tejido únicamente a la corteza renal, al saber que la mácula densa se encuentra sólo en corteza renal. Para detectar la expresión proteica de la enzima ciclooxigenasa 2 en la corteza renal se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) seguida de una transferencia e inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra la enzima COX-2 y una reacción quimioluminiscente.

La expresión de la COX-2 se expresó en mayor cantidad en la corteza renal de las ratas diabéticas en un 20%, siendo estos cambios diferentes estadísticamente. (figura 5.4.1).



**Figura 6.4.1.** Expresión de la enzima COX-2 en la corteza renal de ratas control y diabéticas. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control ( $\beta$ -actina). Las barras representan al promedio  $\pm$  el error estándar de 3 animales por grupo y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico

## 5. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2.

Basándonos en nuestros resultados anteriores, decidimos iniciar con los diferentes tratamientos, la dieta alta en  $\text{Na}^+$  (0.8%), la dieta baja  $\text{Na}^+$  (0.04%) y con la acetazolamida para poder demostrar nuestra hipótesis. Se midieron los mismos parámetros que para los grupos C y DM.

Se midió la glucemia de los grupos de ratas controles y diabéticas tratados con las dietas y la acetazolamida. Observando que los tratamientos no modifican de ninguna manera la glucemia en los diferentes grupos (figura 6.5.1-6.5.3).

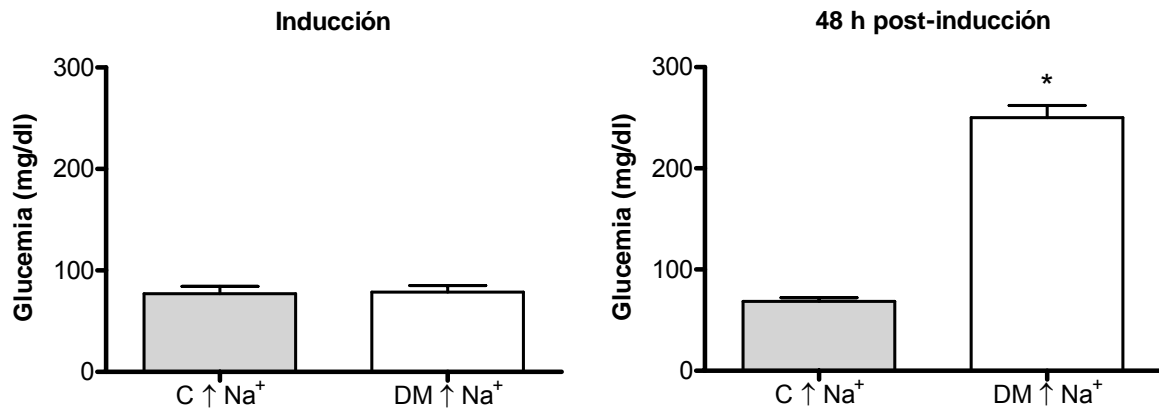


Figura 6.5.1 (a)

Figura 6.5.1 (b)

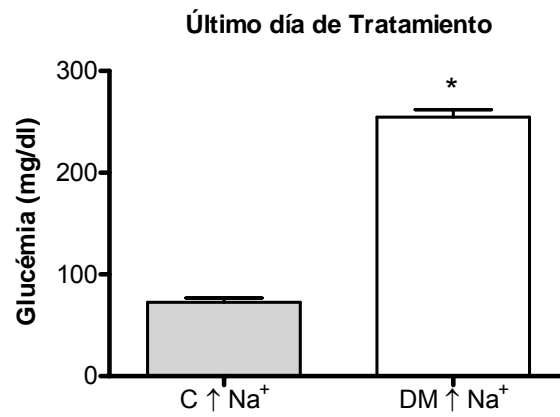


Figura 6.5.1 (c)

**Figuras 6.5.1.** Glucemia del grupo control tratado con dieta alta en sodio (C ↑ Na<sup>+</sup>); a) al inicio, b) a las 48 h y c) al séptimo día (último día de tratamiento). Cada barra representa la media ± el error estándar de 6 animales, \*p<0.05.

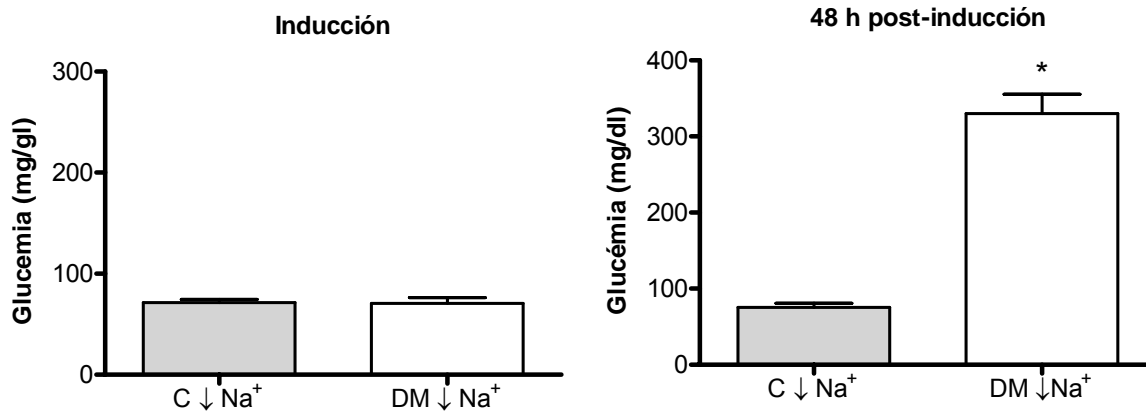


Figura 6.5.2 (a)

Figura 6.5.2 (b)

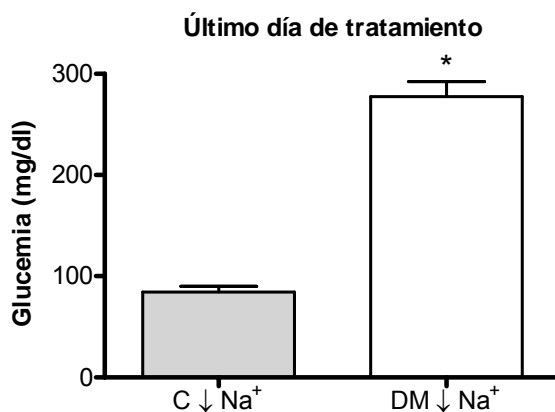


Figura 6.5.2 (c)

**Figuras 6.5.2.** Glucemia del grupo control tratado con dieta baja en sodio (C ↓Na<sup>+</sup>), grupo de ratas diabéticas tratadas con bajo sodio (DM ↓Na<sup>+</sup>); a) al inicio, b) a las 48 h y c) al séptimo día (último día de tratamiento). Cada barra representa la media ± el error estándar de 6 animales, \*p<0.05.



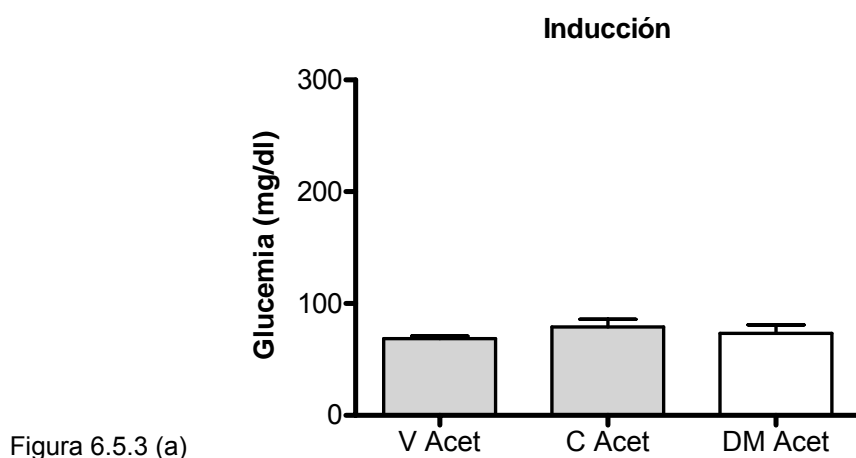


Figura 6.5.3 (a)

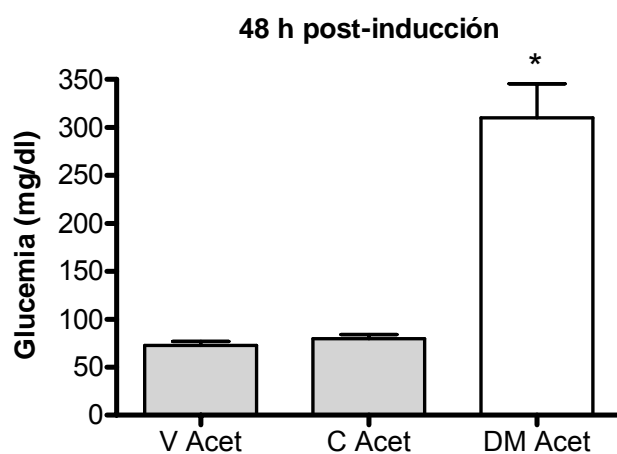


Figura 6.5.3 (b)

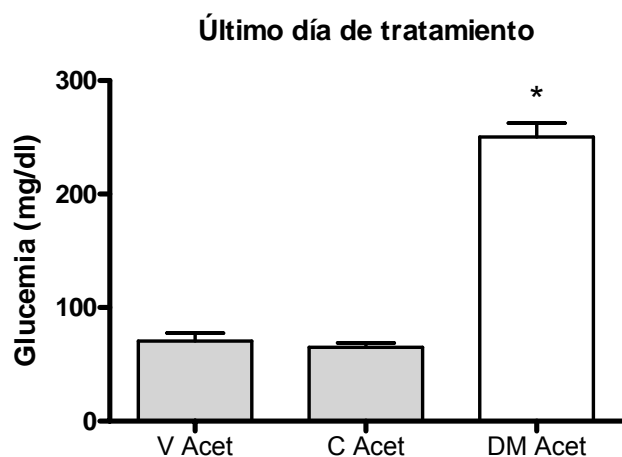


Figura 6.5.3 (c)

**Figuras 6.5.3.** Glucemia del grupo control al cual se le administró el vehículo de la acetazolamida (V Acet) controles tratadas acetazolamida (C Acet) y grupo de ratas diabéticas tratadas acetazolamida (DM Acet); a) al inicio, b) a las 48 h y c) al séptimo día (último día de tratamiento). Cada barra representa la media  $\pm$  el error estándar de 6 animales, \* $p < 0.05$



Se pesaron diariamente los diferentes grupos, donde se observó que los grupos a los cuales se les administro STZ, fueron disminuyendo de peso con el paso del tiempo y los grupos a los cuales se les administró el vehículo, fueron aumentando (figuras 6.5.4-6.5.6)

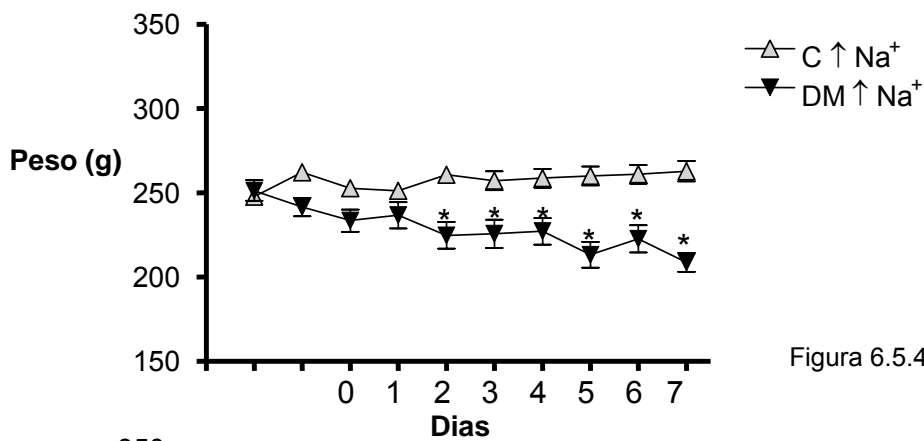


Figura 6.5.4

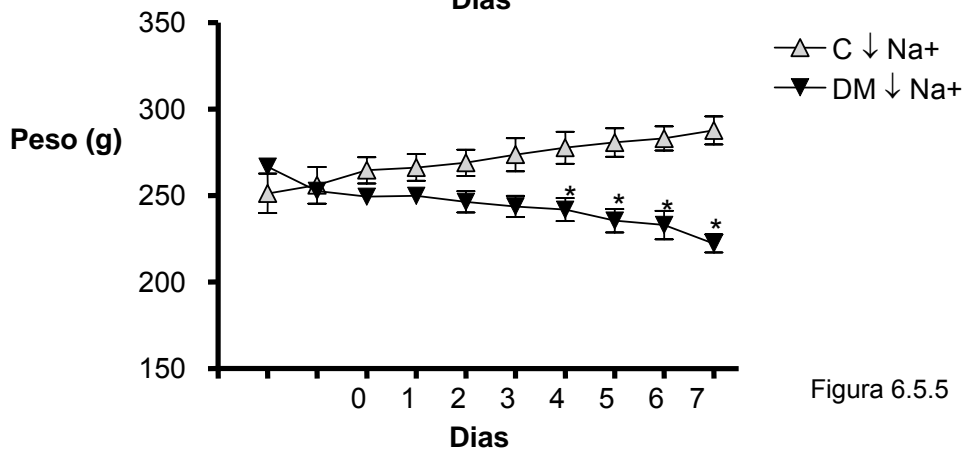


Figura 6.5.5

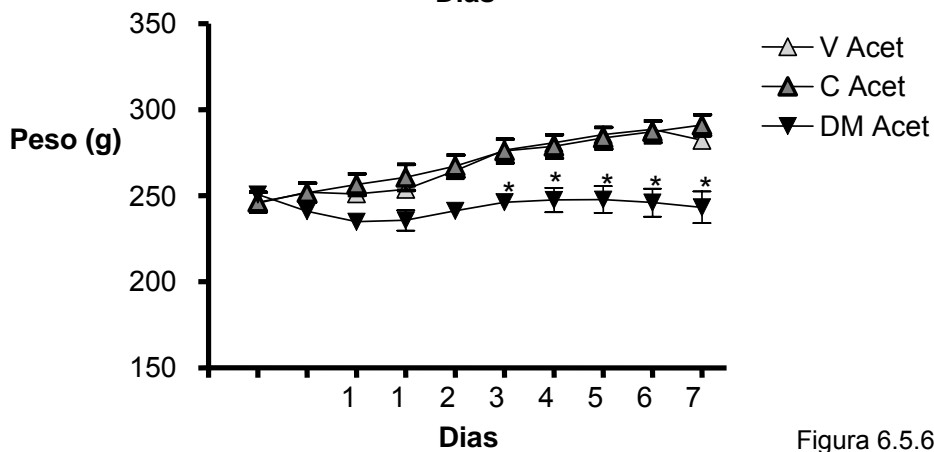
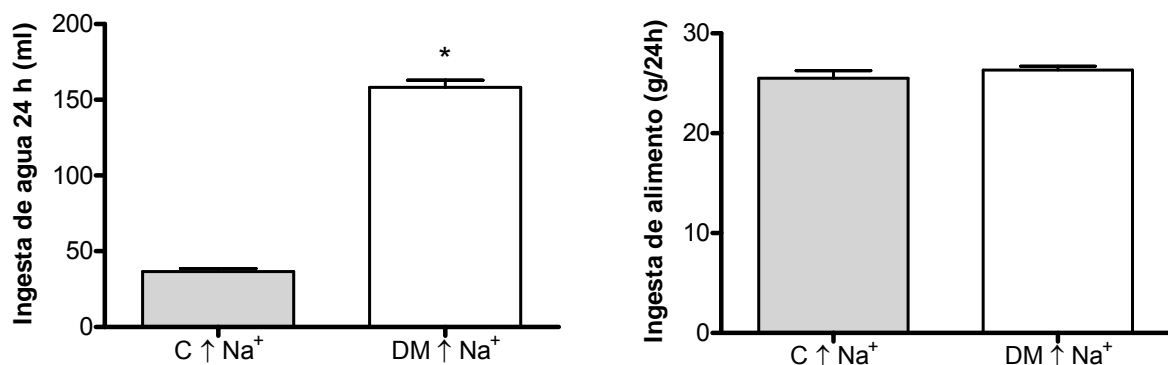


Figura 6.5.6

**Figura 6.5.4-6.5.6** Peso de ratas de los diferentes grupos a las 48 h (día cero) de haberles administrado citrato de sodio o estreptozotocina según correspondiera, durante 7 días. n= 6, \*p<0.05

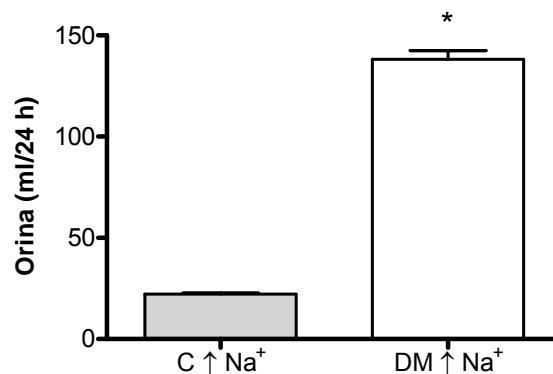


En cuanto a la ingesta de agua y alimento de los grupos tratados con alto sodio: Observamos que para el grupo C alto sodio fue de  $36.5 \pm 3$  ml y para el grupo de DM tratada con alto sodio fue de  $158 \pm 7$  ml en 24 h, resultando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.7). En cuanto a la ingesta de alimento para estos grupos fue para el grupo C alto sodio de  $25 \pm 1$  g y para el grupo DM alto sodio fue de  $26 \pm 4$  g en 24 h, no existiendo diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.8).



**Figuras 6.5.7-6.5.8.** Ingesta de alimento y agua en 24 h del los grupos C y DM tratados con alto sodio. n=6, \*P<0.05)

En cuanto a la excreción de orina en 24 h para estos grupos, fue para el grupo C alto sodio de  $22 \pm 0.5$  ml y para el grupo DM alto sodio fue  $138 \pm 7$  ml en 24 h, existiendo diferencia significativa del grupo de DM alto sodio con respecto al grupo C alto Na<sup>+</sup> (figura 6.5.9)



**Figura 6.5.9** Volumen urinario de ratas C alto sodio y DM alto sodio durante 24 h. n=6 \*p<0.05



Para los grupos que se trataron con dieta baja en sodio, la ingesta de agua en grupo C bajo sodio fue de  $32 \pm 2$  ml y para el de DM bajo sodio fue  $144 \pm 8$  ml observando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.10). Con respecto a la ingesta de alimento, para el grupo C bajo sodio fue de  $22 \pm 1$  g, y para el grupo DM bajo sodio, fue de  $25 \pm 1$  g, observando diferencia significativa en ambos grupos (figura 6.5.11). En cuanto al volumen urinario en 24 h los valores para el grupo de C bajo sodio fueron  $10 \pm 1$  ml y para el de DM bajo sodio fue de  $110 \pm 4$  ml, observando diferencia significativa entre ambas (figura 6.5.12).

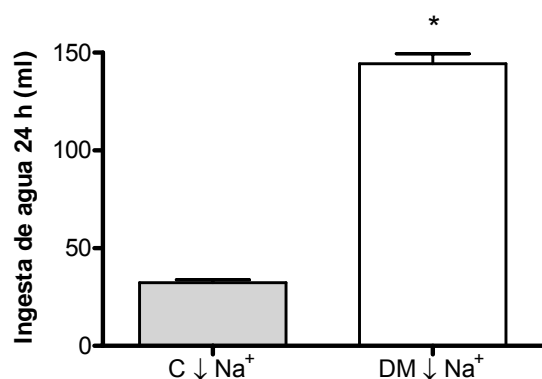


Figura 6.5.10

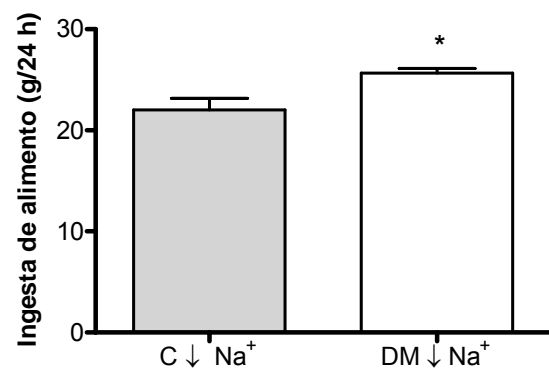


Figura 6.5.12

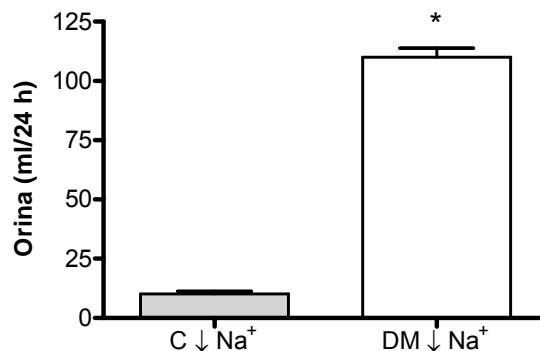


Figura 6.5.13

**Figuras 6.5.10-6.5.12.** Ingesta de agua, alimento y volumen urinario en 24 h de los grupos tratados con dieta baja en sodio.  $n=6$ ,  $*p<0.05$ .

El consumo de agua en 24 h de los grupos tratados con acetazolamida fue para el grupo al cual se le administró el vehículo de la acetazolamida (V Acet) de  $26 \pm 2$  ml, al grupo control acetazolamida (C Acet) de  $42 \pm 1$  ml, y el grupo DM Acet de  $114 \pm 6$  ml, entre los tres grupos se observa diferencia significativa; en cuanto a la ingesta de alimento en 24 h, se obtuvieron los siguientes resultados, para el grupo V Acet de  $19 \pm 1$  g, el grupo C Acet de  $23 \pm 1$  g y para el grupo DM Acet de  $25 \pm 1$  g observando diferencia significativa en el grupo DM Acet con respecto al grupo C



Acet; En cuanto al volumen urinario en 24 h fue para el grupo V Acet de  $10 \pm 1$  ml, el grupo C Acet de  $22 \pm 1$  ml y para el grupo DM Acet de  $85 \pm 4$  ml observando diferencia significativa entre los 3 grupos (figuras 6.5.13-6.5.15)

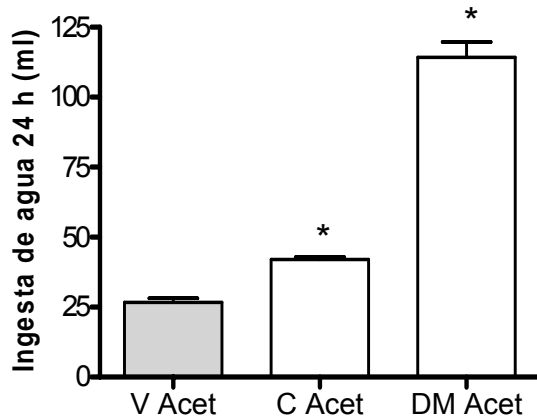


Figura 6.5.13

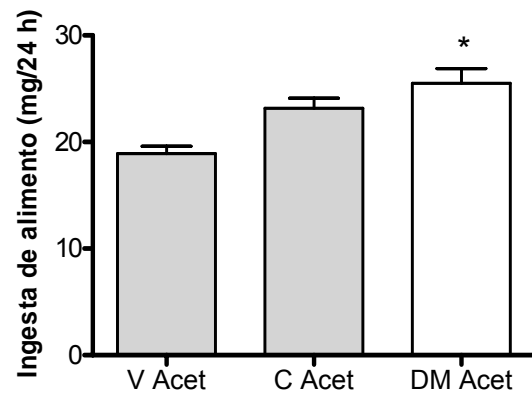


Figura 6.5.14

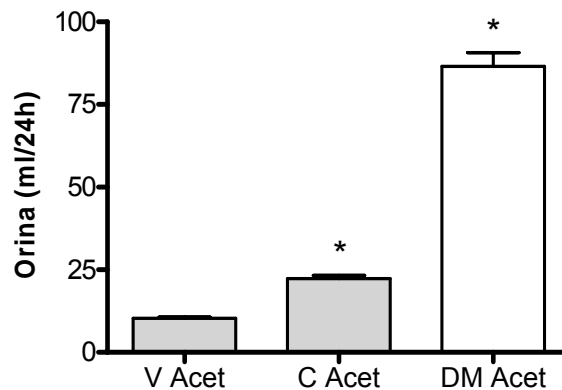


Figura 6.5.15

**Figura 6.5.13-6.5.15.** Ingesta de agua, alimento y volumen urinario en 24 h de los grupos tratados con acetazolamida (V Acet, C Acet y DM Acet).  $n=6$ ,  $*p<0.05$ .

### 5.1 Tamaño renal con los diferentes tratamientos.

Para ver el efecto de los diferentes tratamientos sobre la hipertrofia se pesó el riñón izquierdo; los animales tratados con dieta alta en sodio tuvieron los siguientes pesos: el grupo C alto sodio de  $0.94 \pm 0.01$  g y para el grupo DM alto sodio de  $1.016 \pm 0.012$  g, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.1.1); para los grupos tratados con dieta baja en sodio el grupo C bajo sodio pesó  $0.94 \pm 0.015$  g, y el grupo DM bajo sodio  $1.05 \pm 0.025$  g, observado diferencias significativa entre ambos grupos (figura 6.5.1.2); a los grupos que se



les trató con acetazolamida pesaron, el grupo al cual se le administró el vehiculo de la acetazolamida pesó  $0.98 \pm 0.013$  g, el grupo C acetazolamida  $0.97 \pm 0.013$  g y el grupo DM acetazolamida pesó  $1.07 \pm 0.014$  g, encontrando diferencia significativa del grupo DM acetazolamida con respecto al grupo V Acet y al grupo C Acet, (figura 6.5.1.3).

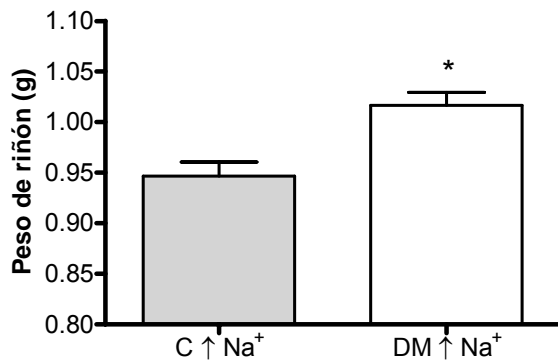


Figura 6.5.1.1

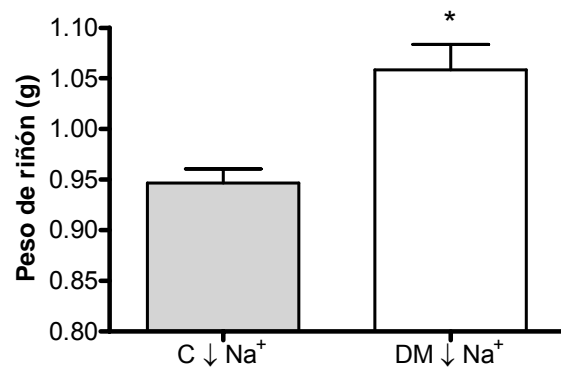


Figura 6.5.1.2

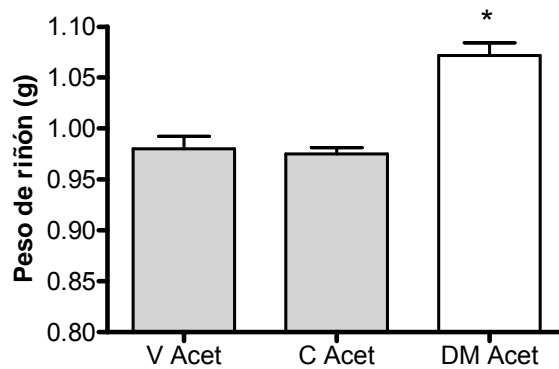


Figura 6.5.1.3

**Figuras 6.5.1.1-6.5.1.3.** Peso de los riñones de los diferentes grupos por tratamientos. n=6, \*p<0.05.



En las mediciones del área de las células del túbulo proximal observamos que en los grupos tratados con dieta alta en sodio, midieron las del grupo C alto sodio  $98.6 \pm 2 \mu^2$ , las del grupo DM alto sodio  $168 \pm 4 \mu^2$ , observado diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.1.4); los grupos a los cuales se trató con dieta baja en sodio, para el grupo C bajo sodio  $91 \pm 2 \mu^2$  y el grupo DM bajo sodio  $162 \pm 3 \mu^2$ , existiendo diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.1.5); a los grupos que se trató con acetazolamida, las del grupo V Acet  $87 \pm 4 \mu^2$ , las del grupo C Acet  $90 \pm 2 \mu^2$  y las del grupo DM Acet  $166 \pm 3 \mu^2$  (figura 6.5.1.6).

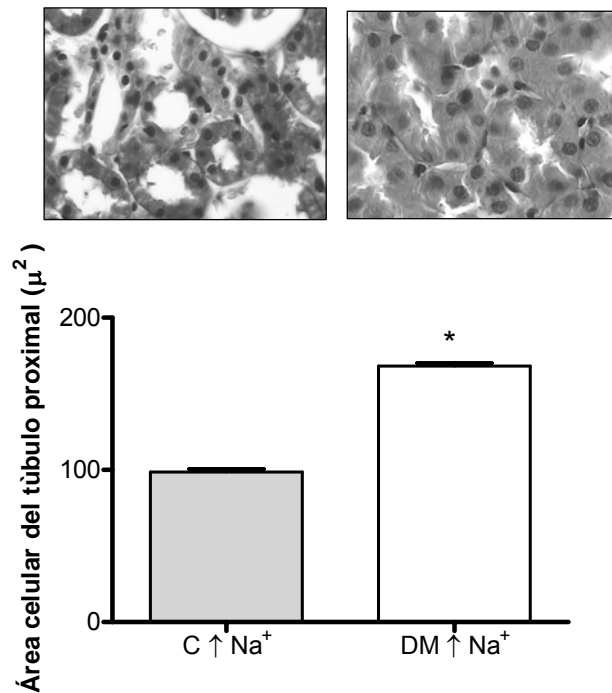


Figura 6.5.1.4

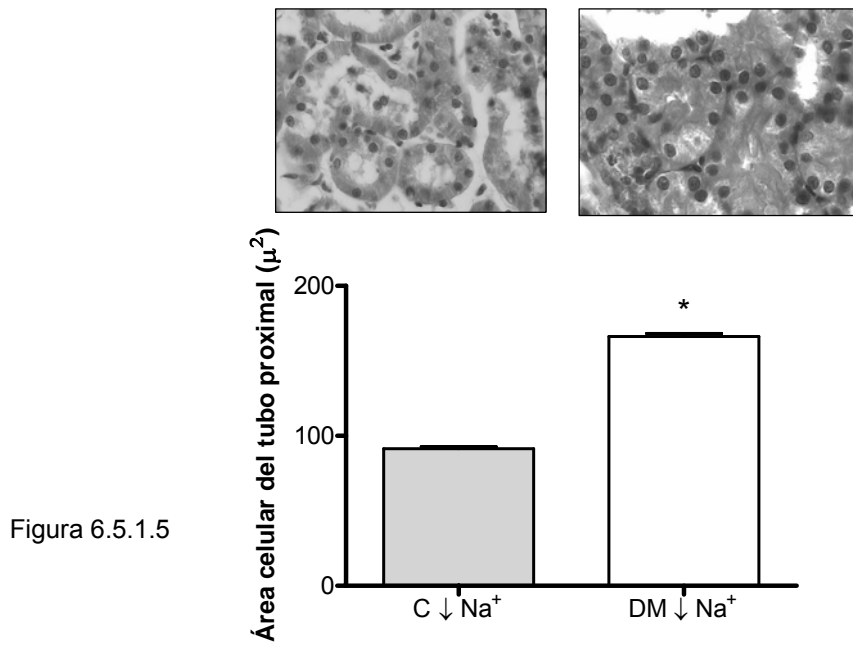


Figura 6.5.1.5

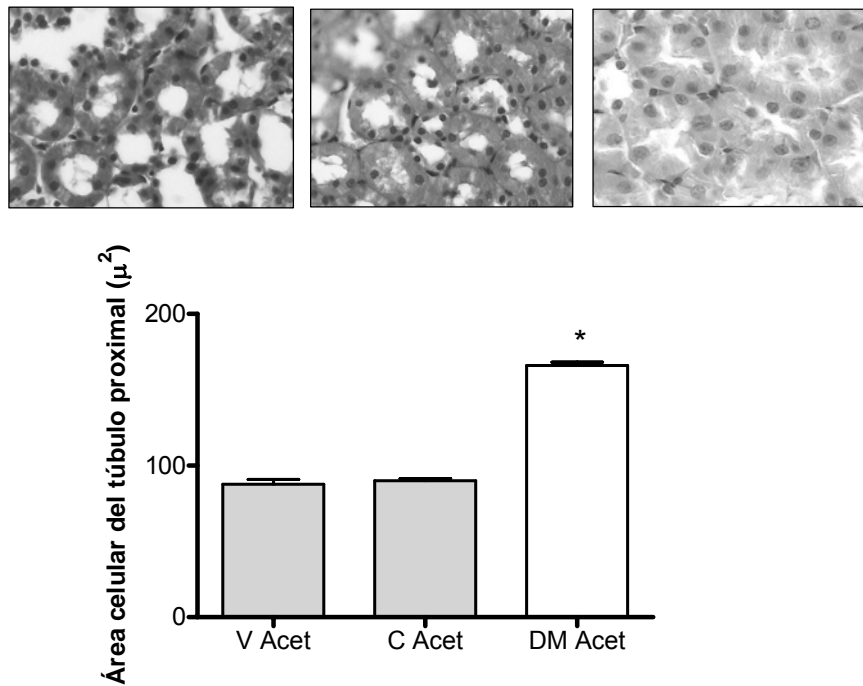


Figura 6.5.1.6

**Figuras 6.5.1.4-6.5.1.6.** Área de las células tubulares proximales, de los grupos con los diferentes tratamientos. n=100, p\* < 0.05





**5.2. Función renal de los grupos con los diferentes tratamientos.**

Medimos los parámetros de función renal que habíamos medido para el grupo C y DM, para observar cual era el efecto que nuestros tratamientos podían tener sobre el riñón.

La proteinuria de los grupos a los cuales se les trató con dieta alta en sodio fue para el grupo C alto sodio  $15.64 \pm 1.16$  mg/dl y para el grupo de DM alto sodio de  $37 \pm 3$  mg/dl, observando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.2.1); los grupos tratados con dieta baja en sodio tuvieron proteinuria de  $17.6 \pm 1.6$  mg/dl para el grupo C bajo  $\text{Na}^+$  y los del grupo DM bajo sodio  $21 \pm 2$  mg/dl, observando diferencia entre ambos grupos (figura 6.5.2.2); el grupo al cual se le administró el vehículo de la acetazolamida tuvo proteinuria de  $20 \pm 4$  mg/dl, el grupo C acetazolamida de  $30 \pm 2$  mg/dl y el grupo DM Acet  $32 \pm 3$  mg/dl, no observando diferencia entre el grupo C Acet y DM Acet pero si con respecto al grupo V Acet (figura 6.5.2.3)

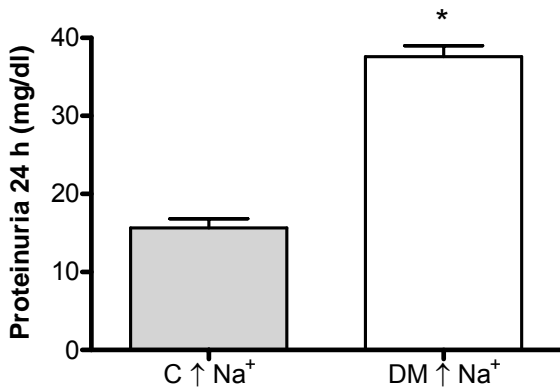


Figura 6.5.2.1

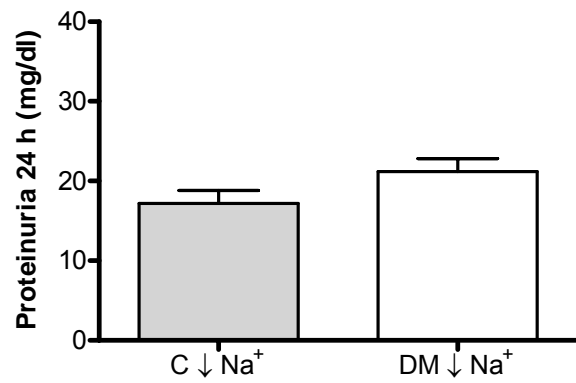


Figura 6.5.2.2

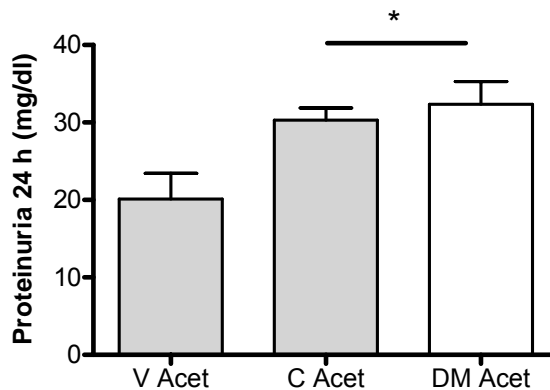


Figura 6.5.2.3

**Figuras 6.5.2.1-6.5.2.3.** Proteinuria de los grupos con diferentes tratamientos. n=6 \*p<0.05



En cuanto a la depuración de creatinina, el grupo tratado con alto sodio tuvo valores de  $1.41 \pm 0.05$  ml/min y el de DM alto sodio  $0.95 \pm 0.13$  ml/min, observando diferencias significativas entre ambos grupos (figura 6.5.2.4); al grupo C bajo sodio  $1.13 \pm 0.11$  ml/min y el de DM bajo sodio  $1.05 \pm 0.07$  ml/min, sin observar diferencias entre estos grupos (figura 6.5.2.5); al grupo V Acet obtuvo  $1.73 \pm 0.06$  ml/min, el grupo C Acet  $2.57 \pm 2.3$ , y el grupo DM Acet  $2.32 \pm 0.19$  observando diferencias significativas de los grupos C Acet y DM Acet con respecto al grupo V Acet (Figura 6.5.2.6)

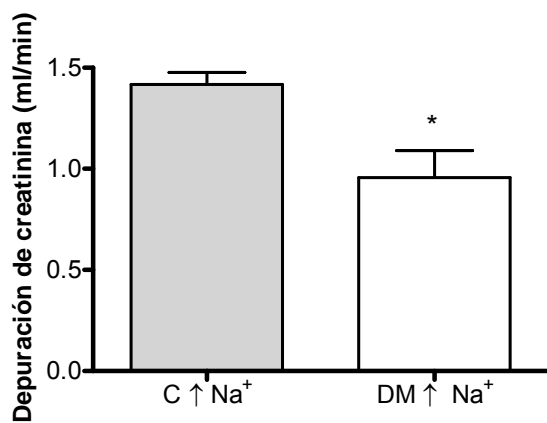


Figura 6.5.2.4

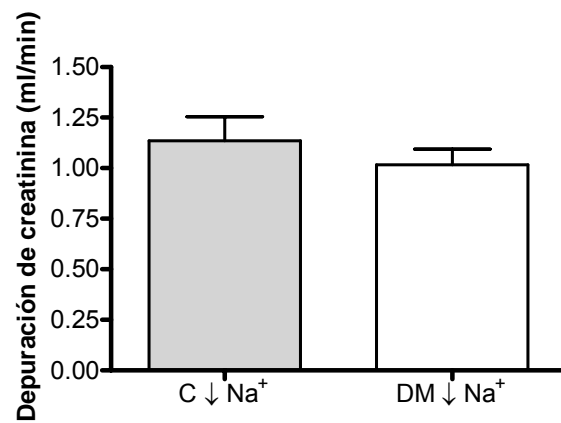
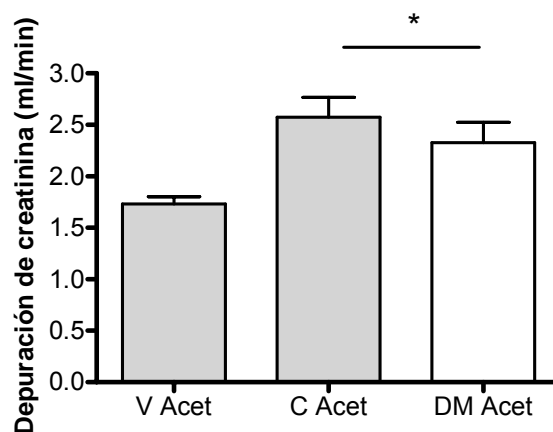


Figura 6.5.2.5



Fu|figura 6.5.2.6

Figuras 6.5.2.4-6.5.2.6. Depuración de creatinina de los grupos con los diferentes tratamientos. n=6, \*p<0.05.



En cuanto a la concentración de sodio en suero de los grupos tratados, se obtuvieron los siguientes resultados: el grupo C alto sodio,  $147 \pm 2$  mmol/l, para el grupo DM alto sodio  $134 \pm 0.92$  mmol/l, observando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.2.7); para el grupo C bajo sodio se obtuvo la concentración de  $138 \pm 3$  mmol/l y para el grupo DM bajo sodio de  $134 \pm 1$  mmol/l, observando diferencia del grupo DM bajo sodio con respecto al grupo C bajo  $\text{Na}^+$  (figura 6.5.2.8); el grupo V Acet se observó la concentración de  $141 \pm 6$  mmol/l, para el grupo C Acet se obtuvo el valor de  $142 \pm 3$  mmol/l, y el DM Acet  $142 \pm 2$  mmol/l, sin observarse diferencia estadística entre los tres (figura 6.5.2.9)

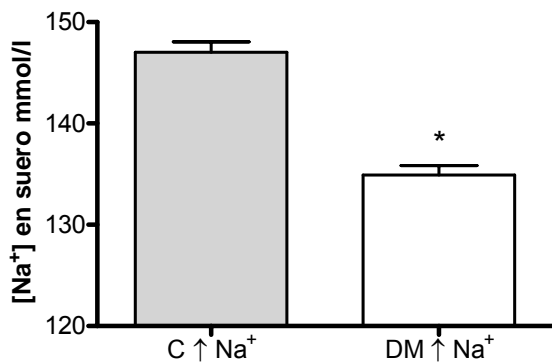


Figura 6.5.2.7

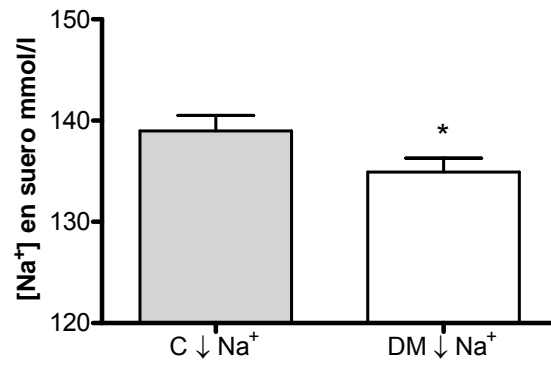


Figura 6.5.2.8

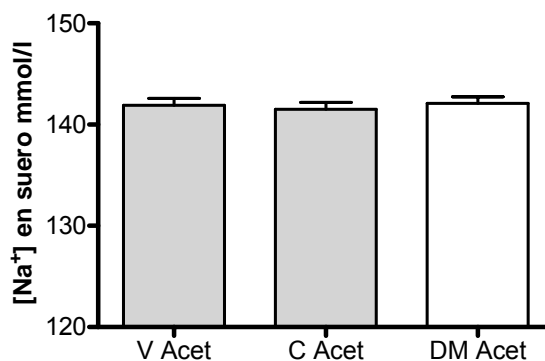


Figura 6.5.2.9

**Figuras 6.5.2.7-6.5.2.9.** Concentración de sodio en suero de los grupos con los diferentes tratamientos. n=6, p\* < 0.05.



Con respecto a la concentración de sodio en la orina de 24 h, se obtuvieron los siguientes resultados: El grupo C alto sodio  $9864 \pm 335$  mmol/l, el grupo DM alto sodio, obtuvo valores de  $14888 \pm 708$  mmol/l, observando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.2.10); el grupo C bajo sodio se cuantificó  $493 \pm 79$  mol/l, el grupo DM bajo sodio de  $363 \pm 77$  mmol/l, observando diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.2.11), en cuanto a los tratados con acetazolamida, el grupo V Acet  $1947 \pm 71$ , el grupo C Acet  $3207 \pm 162$  y el grupo DM Acet  $2610 \pm$ , observando diferencia significativa entre los grupos V Acet y C Acet y entre V Acet y DM Acet (figura 6.5.2.12)

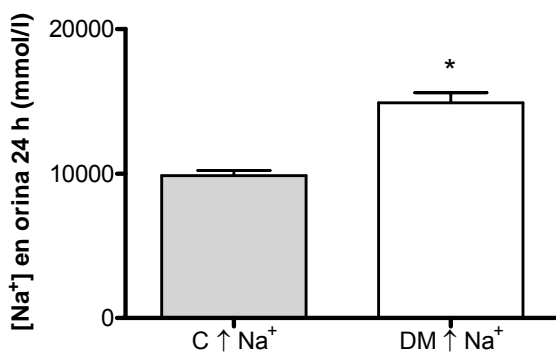


Figura 6.5.2.10

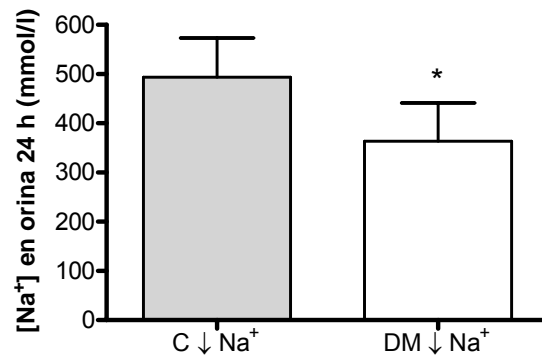


Figura 6.5.2.11

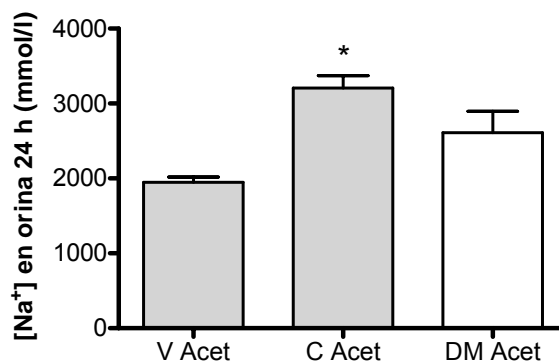


Figura 6.5.2.12

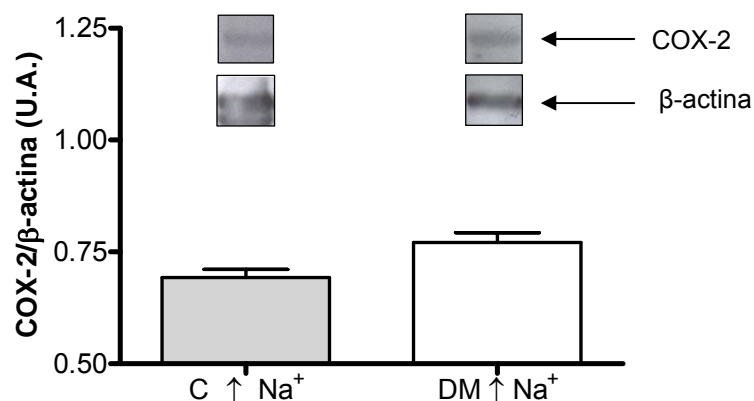
**Figura 6.5.2.10-6.5.2.12.** Concentración de sodio en orina de 24 h de los grupos tratados. n=6, \*p<0.05



### 5.3 Efecto de la DM y los tratamientos sobre la expresión de la COX-2.

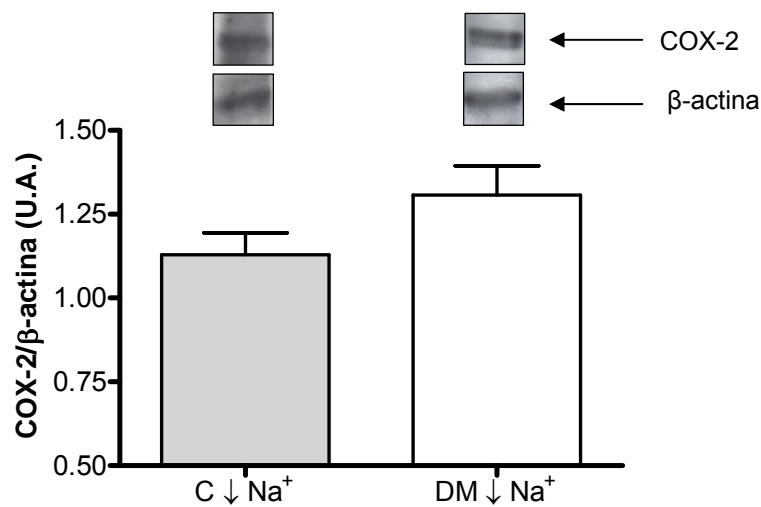
Obtuvimos los siguientes resultados:

Al tratar con la dieta alta en sodio, se trató de contrarrestar la disminución de NaCl que llega a la macula densa durante el modelo experimental de diabetes, y así observar la expresión de esta enzima; los resultados que se obtuvieron en el western blot con respecto a este tratamiento, fue que no observamos diferencia significativa entre ambos. Aumentar la concentración de NaCl en la dieta influye en la expresión de la COX-2 en ratas diabéticas, inhibiendo su sobreexpresión (figura 6.5.3.1)



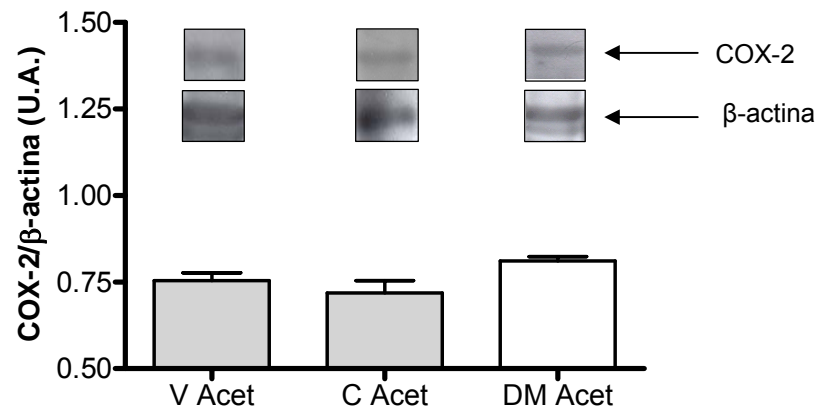
**Figura 6.5.3.1.** Expresión de la enzima COX-2 en la corteza renal de los grupos control alto sodio y diabetes alto sodio. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control ( $\beta$ .actina). Las barras representan al promedio  $\pm$  el error estándar de 3 animales por grupo y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico.

Con la dieta baja en sodio, se trató de confirmar que la disminución de la concentración del NaCl en la corteza renal influye en la sobreexpresión de la COX-2. Los resultados que obtuvimos al tratar con esta dieta nos sugieren, que la dieta baja en sodio aumenta la expresión de la COX-2, los resultados que se obtuvieron no demuestran diferencia significativa entre ambos grupos (figura 6.5.3.2)



**Figura 6.5.3.2.** Expresión de la enzima COX-2 en la corteza renal de ratas los grupos control bajo sodio y diabetes bajo sodio. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control ( $\beta$ .actina). Las barras representan al promedio  $\pm$  el error estándar de 3 animales por grupo y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico.

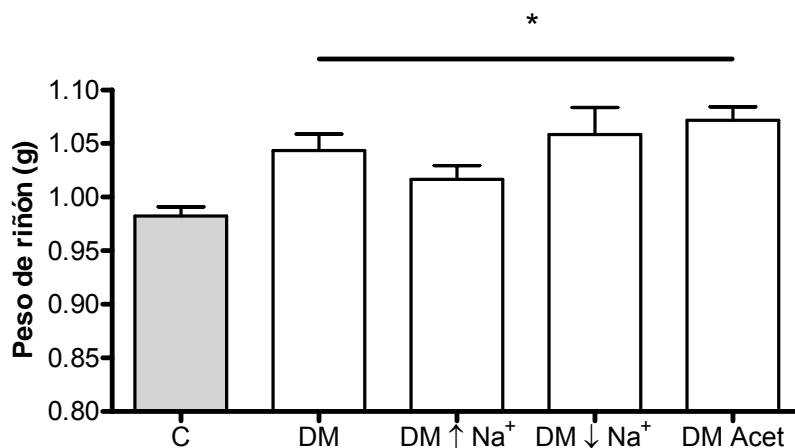
Con la acetazolamida, tratamos de disminuir la reabsorción del NaCl que se reabsorbe en el túbulo proximal, simulando farmacológicamente una dieta alta en sodio, y de esta forma aumentar la concentración de NaCl que llega a la mácula densa, se buscó la expresión en el grupo tratado con el vehículo de la acetazolamida (dimetilsulfóxido), demostrando que este no influye en la expresión de la COX-2; no hubo diferencia significativa entre el grupo control y de diabéticas, a las cuales se les administró acetazolamida; lo que nos hace sugerir nuevamente, que el aumento de la concentración de NaCl, durante el modelo experimental de diabetes inhibe la sobreexpresión de la COX-2 que se aprecia sin dicho tratamiento (figura 6.5.3.3)



**Figura 6.5.3.3.** Expresión de la enzima COX-2 en la corteza renal de los grupos vehículo de la acetazolamida, el grupo control tratado con acetazolamida y el grupo de diabéticas tratadas con acetazolamida. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control ( $\beta$ -actina). Las barras representan al promedio  $\pm$  el error estándar de 3 animales por grupo y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico.

## 6. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE RATAS DIABÉTICAS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

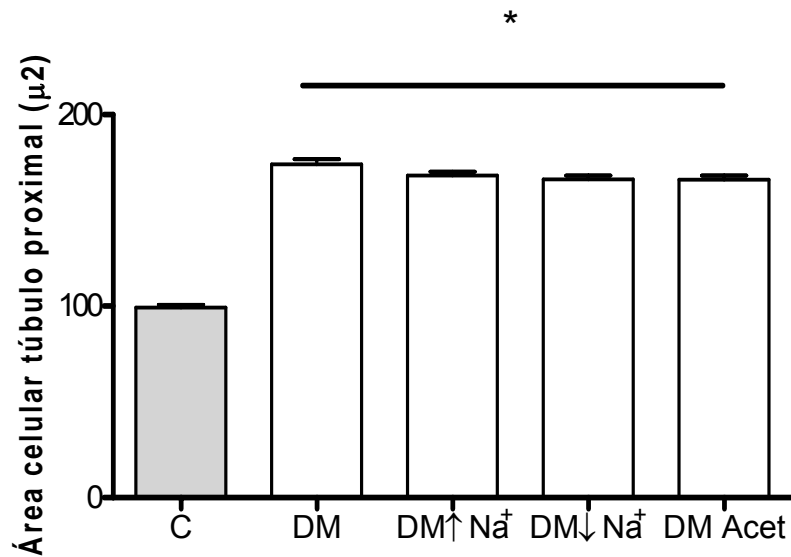
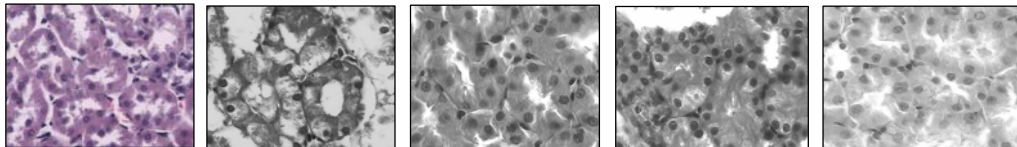
El peso de los riñones de las ratas diabéticas tratadas con los diferentes tratamientos no difirió significativamente por los diferentes tratamientos pero si con respecto al grupo de ratas normales (C) (figura 6.6.1)



**Figura 6.6.1.** Peso renal de los grupos de ratas diabéticas y las diabéticas tratadas con respecto a las ratas control (C). n=6.  $p < 0.05$



En cuanto al área de las células del túbulo proximal de los grupos de diabéticas, se observó que no existe diferencia por los tratamientos pero si con respecto a las ratas normales (C) (figura 6.6.2)

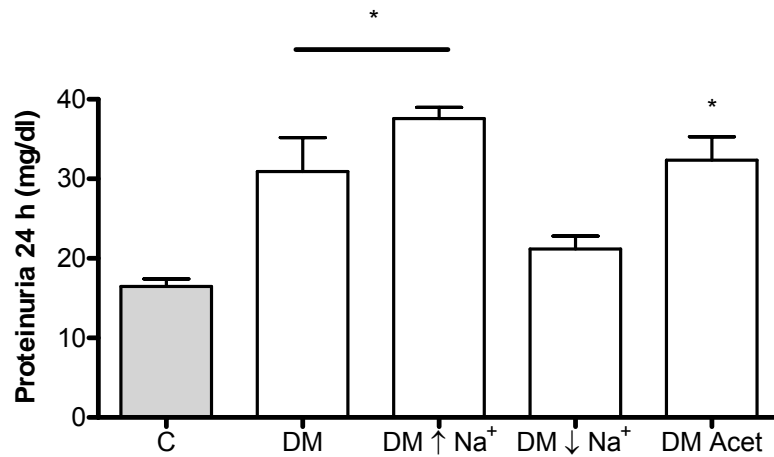


**Figura 6.6.2.** Área celular del túbulo proximal de los grupos de ratas diabéticas y las diabéticas tratadas con respecto a las ratas control (C). n=6.p<0.05.



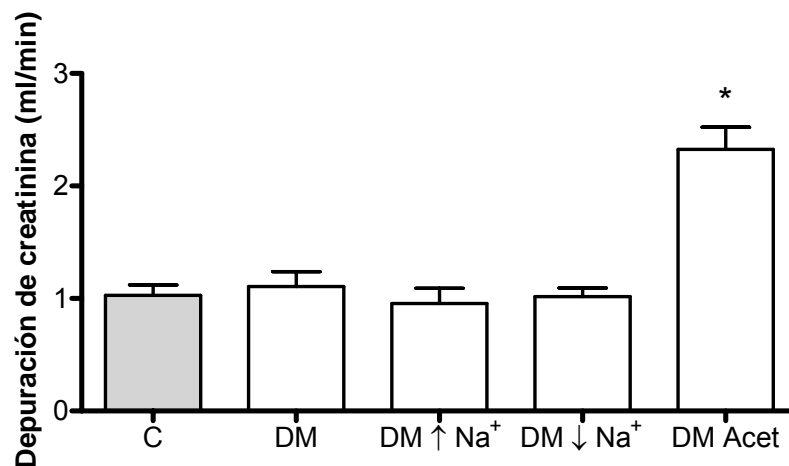


En cuanto a la proteinuria de los grupos de diabéticas, se observó que sólo el grupo al cual se le administró la dieta baja en sodio es la que difiere significativamente a la baja con respecto al resto de los grupos de diabéticas.



**Figura 6.6.3.** Proteinuria los grupos de ratas diabéticas y las diabéticas tratadas con respecto a las ratas normales (C). n=6, \*p<0.05.

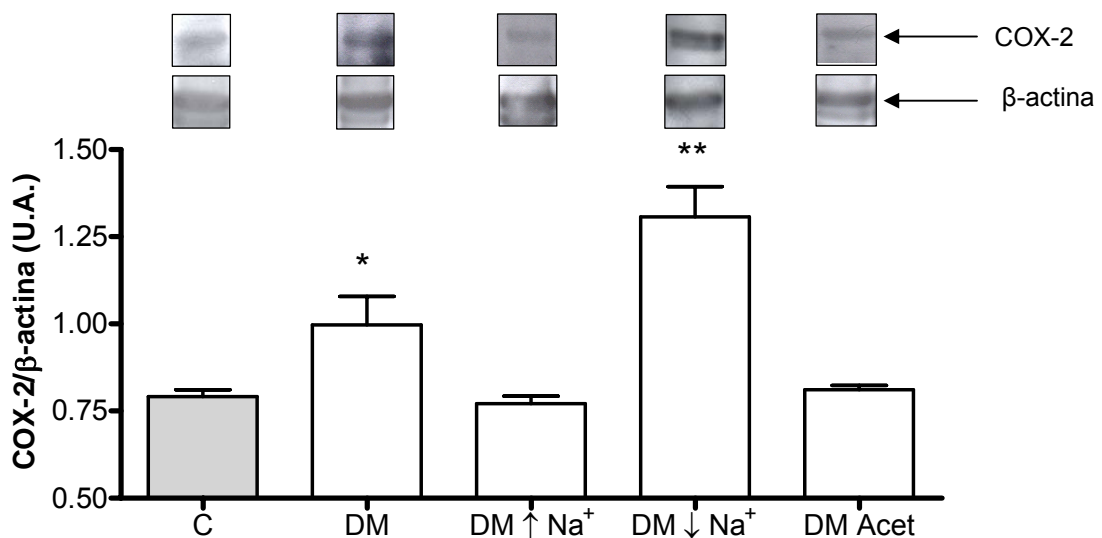
De acuerdo a la depuración de creatinina, se observó que el grupo que se le trató con acetazolamida aumentó significativamente la creatinina probablemente por aumento en la secreción, con respecto al resto de los grupos (figura 6.6.4)



**Figura 6.6.4.** Depuración de creatinina de los grupos de ratas diabéticas y las tratadas con respecto a las ratas control. n=6, \*p<0.05.



En cuanto a la expresión de la COX-2, se observa que comparando con el grupo de DM, al grupo al cual se le administró dieta alta en sodio, disminuyó la sobre expresión de la COX-2 pero no con respecto al grupo de ratas normales (C), al grupo tratado con dieta baja en sodio aumento la expresión de COX-2 con respecto al grupo DM y normales (C); y que con el tratamiento de la acetazolamida, también se inhibe la sobre expresión siendo diferente significativamente con respecto al las diabéticas pero no con respecto a las normales (C) (figura 6.6.5)



**Figura 6.6.5.** Expresión de la COX-2 de los grupos de ratas control, diabéticas, y diabéticas tratadas. n=3, \*p<0.05.



## VII DISCUSIÓN

### 1.- REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE DIABETES.

Hay diversos tipos de modelos para estudiar la diabetes experimentalmente (Szkudelski T, 2001). En este trabajo usamos el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina, el cual se caracteriza por hiperglucemia a las 24 h de su administración y disminución de niveles de insulina por destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas (Agarwal MK, 1980). Este modelo fue descrito en el año 1976 (Ganda et al., 1976). En nuestro trabajo obtuvimos datos que nos permiten considerarlo como un modelo de diabetes experimental que mimetiza una DM tipo 1, similares a los encontrados en la literatura como son hiperglucemia, poliuria, polidipsia, polifagia y disminución de peso que se diferencia de los modelos de DM2 por presentar como característica aumento de peso (Michael et al., 1999).

El tiempo en el que se dejó evolucionar el modelo, nos permite caracterizarlo como un modelo de diabetes en estadios tempranos (7 días) (Thomson et al. 2003); en nuestro trabajo medimos los valores de depuración creatinina como un indicador del daño renal, observando que entre los grupos control y diabetes no hay diferencia significativas, lo cual nos indica que el daño al glomérulo aún no se ha instalado en este periodo de tiempo demostrando por lo tanto una filtración glomerular aparentemente normal; nuestros resultados mostraron que a pesar de no existir cambios en la depuración de creatinina se observa una proteinuria mayor en las ratas diabéticas, en condiciones normales se sabe que existe proteinuria en ratas y el aumento en las diabéticas responde principalmente a catabolismo muscular como lo reporta Bardoux en el año 1999 (Bardoux et al., 1999).

La diabetes es la principal causa de falla renal crónica, sin embargo, en los estadios tempranos de la diabetes mellitus antes de las complicaciones, hay una hiperfiltración glomerular (Brenner et al., 1981; Brenner et al., 2003), que se ha tratado de explicar a través de factores metabólicos (Veldman et al., 2002) y factores hemodinámicos (O'Bryan et al., 1997). Thomson y col. en el año 2001 propusieron que la hiperfiltración glomerular resulta principalmente por hipertrofia



del túbulo proximal (Thomson et al., 2001). Se ha estudiado que esta hipertrofia tubular en la diabetes es mediada por la sobre expresión de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), enzima limitante de la biosíntesis de poliaminas, encargada de convertir la ornitina en putrescina que es necesaria para la división celular y para producir la hipertrofia (Pedersen et al., 1993). Esto se corroboró al tratar a las ratas diabéticas con difluorometilornitina (DFMO) un inhibidor de la ODC, el cual al ser administrado evitó la hipertrofia del túbulo proximal en las ratas diabéticas, así como la hiperfiltración glomerular (Thomson et al., 2001). Aihua y col. en el 2003 observaron que las concentraciones de poliaminas tienen su pico máximo a las 24 h de la inducción de diabetes y la hipertrofia de las células proximales fue detectada in vivo al tercer día (Aihua et al., 2003). Para confirmar la hipertrofia en la diabetes temprana, pesamos el riñón y lo teñimos con hematoxilina-eosina; demostrando que el peso renal fue mayor en el grupo de ratas diabéticas a pesar de la disminución de peso corporal observable en el curso temporal en que duró el estudio y un aumento del área de las células del túbulo proximal con respecto a los controles, con esto apoyamos lo descrito en la literatura por Komers en el 2001.

## **2. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN LOS GRUPOS CONTROL Y DIABÉTICAS**

La COX-2 se localiza de manera constitutiva en el riñón en la mácula densa (MD) (Harris et al., 1994; Nantel et al., 1999), y se le asocia con la regulación de la secreción de renina y en la regulación del tono arteriolar aferente (a través de la retroalimentación tubuloglomerular) (Person et al., 1991). El incremento de la COX-2 en esta zona se debe a cambios en el NaCl luminal (Schnermann et al., 1998), esto se ha demostrado a través de cultivo de células, en donde se cultivó una línea celular derivada de la mácula densa, se incubaron estas en un medio con bajo NaCl y dentro de esas condiciones se incremento la expresión de la COX-2 en forma significativa fenómeno que no ocurrió en un medio isoosmolar (Yang et al., 2000). Quien media el transporte del NaCl del lumen a la mácula densa es el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (Harris et al., 1994; Cheng et al., 2000;



Schnermann J, 2001). La señalización intracelular que lleva al aumento en la expresión de la COX-2 en respuesta a una disminución de NaCl es iniciado por la fosforilación de las cinasas p/38 y Erk1/2 y la estimulación de la MAP cinasa; esto se demostró al inhibir a p/38 con SB203580 y a Erk1/Erk/2 con PD98059, observando que no se incrementaba en la expresión de la COX-2 con tales inhibidores (Cheng et al., 2000; Yang et al., 2000). Se ha demostrado que las MAP cinasas regulan la expresión de la COX-2 en respuesta a citocinas o activación de factores de crecimiento (Xie et al., 1996).

Komers y col. reportan en el 2001 que en la diabetes experimental hay un incremento en la expresión proteica de la COX-2 en la corteza renal, comparada con ratas controles no diabéticas (Komers et al., 2001). Como ya se comento en estadios tempranos de la diabetes hay una hipertrofia tubular proximal (Thomson et al., 2001), que provoca un aumento el transporte tubular proximal aumentando la reabsorción por la misma hipertrofia y por la hiperglucemia que estimula la reabsorción de Na<sup>+</sup> a través del cotransportador Sodio-Glucosa (Vallon et al., 2003) disminuyendo de esta manera el NaCl luminal que llega a la mácula densa activando de esta forma la retroalimentación tubuloglomerular, el resultado de esto es un incremento de la tasa de filtración glomerular, para tratar de restaurar la entrega de fluido y electrolitos en la nefrona distal a través de la disminución de la resistencia arteriolar aferente (Hostetter et al. 1981; Zats et al. 1986; Ohishi et al.1995). Breyer y col. en el 2001 reportan que quien media el cambio en los vasos arteriulares es la PGE<sub>2</sub> sintetizada a través de la COX-2 que se localiza constitutivamente en la macula densa (Breyer et al., 2000 y 2001).

En nuestro trabajo encontramos que la expresión proteica de la COX-2 en la corteza renal de ratas control y en ratas diabéticas es diferente lo cual va de acuerdo con lo reportado por Komers en el 2001. Observamos un aumento significativo en el grupo de ratas diabéticas con respecto al grupo control, que nos sugiere que hay una disminución de NaCl que llega a la mácula densa por la hiperglucemia y la hipertrofia proximal que aumenta la reabsorción, y esto se traduce en un aumento de la expresión de la enzima.



En nuestros resultados, se observó que existe menor concentración de  $\text{Na}^+$  en orina de 24 h en las ratas diabéticas esto posiblemente se deba a que se excreto una mayor cantidad de orina.

Con base en estos resultados, en donde la expresión de COX-2 aumentó en los grupos de ratas diabéticas con respecto al grupo control, sugerimos que sea debido a la hipertrofia del túbulo proximal, la cual disminuye el NaCl que se detecta en la macula densa. Por esta razón, se decidió modificar las concentraciones del NaCl a través de una dieta con alto NaCl (aumentando así el NaCl que llega a la macula densa), con una dieta con bajo NaCl (disminuyendo concentración de NaCl que llegue a la mácula densa) y al administrar acetazolamida (provocando indirectamente disminuir la reabsorción de NaCl y de esta forma un aumento en el NaCl que llega a la mácula densa) en busca de la expresión proteica de la COX-2.

### **3. MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 POR LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

Volker Vallon y col. en el 2002, reportaron experimentos en donde trataron a ratas diabéticas con una dieta alta en sodio, observando a través de micropunción que este tratamiento provoca una disminución en la reabsorción del túbulo proximal (Vallon et al., 2002), esto también fue reportado por Bank en 1990 (Bank et al., 1990) el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno no esta bien descrito. Los cambios del NaCl en la mácula densa son el resultado del aumento o la disminución de la reabsorción proximal a lo que responde la retroalimentación tubuloglomerular (Schnermann 1992). En el caso del tratamiento con dieta alta en sodio provoca un aumento en el NaCl luminal que llega a la macula densa, así como provoca una disminución en la reabsorción, de esta manera aumenta el NaCl detectado en la mácula densa, lo que disminuye la TFG a través de la retroalimentación tubuloglomerular (Brigs et al., 1984), esto también se ha reportado por Yang y col. en 1998.

Por tal motivo evaluamos la expresión de la COX-2 en la corteza renal de ratas diabéticas tratadas con dieta alta en sodio, para ver el efecto del NaCl sobre la



expresión de la enzima durante la diabetes. Nuestros resultados nos permitieron observar que con el alto NaCl no aumenta la expresión de la COX-2 en las ratas diabéticas, como sucedió en el grupo de diabéticas a las cuales se les administró dieta normal, esto sugiere que el aumento en la concentración de NaCl por la dieta, provoca que en la MD se detecte este cambio y no aumente la expresión de la COX-2 por lo que la retroalimentación tubuloglomerular no induce vasodilatación arteriolar durante la diabetes temprana.

La dieta alta en sodio no produce cambios en cuanto al peso, a la hiperglucemia, en la ingesta de alimento, en la depuración de creatinina, lo cual nos indica que no modifica el estado de la diabetes como lo reporta Vallon en el 2002, y resulta evidente que la concentración de Na<sup>+</sup> en la orina aumenta por la dieta. A pesar de que hubo inhibición de la COX-2, la hipertrofia no fue totalmente abolida por el alto NaCl.

Evaluamos la expresión de la COX-2 en ratas diabéticas tratadas con una dieta baja en sodio. Harris y col. en el año 1994 iniciaron con las investigaciones concernientes a la regulación de la COX-2 renal en ratas normales, en donde demostraron la localización de la expresión de esta enzima en la mácula densa y en las células corticales adyacentes al asa de Henle, sugiriendo que esa regulación respondía a la restricción de NaCl (Harris et al., 1994). De esta aportación se derivaron una serie de estudios realizados entre otros por Schnermann y Yang en 1998, que se encaminaron en estudiar la regulación de la COX-2, demostrando que la COX-2 influye sobre el tono arteriolar aferente a través de la PE<sub>2</sub> para aumentar la TFG en estados de restricción de NaCl (Breyer et al., 2000 y 2001). De esta manera se demostró que al disminuir la concentración de NaCl en la macula densa hay un aumento de la expresión de COX-2 en ratas normales (Harris et al., 2001).

Nuestros resultados nos permiten demostrar que al administrar una dieta baja en sodio en ratas diabéticas, aumenta en forma significativa la expresión de la COX-2 en la corteza renal con respecto al grupo de ratas diabéticas tratadas con dieta normal, debido a la restricción de NaCl por la dieta y aún mas por la hipertrofia de



las células del túbulo proximal provocada por la diabetes; lo que nos permite sugerir que a mayor restricción de NaCl hay un mayor aumento de la COX-2.

La dieta baja en sodio no modifica a la hiperglucemia, la ingesta de alimento, la depuración de creatinina y obviamente la concentración de Na<sup>+</sup> en orina es menor. El peso renal y el área celular de las células proximales de las ratas diabéticas tratadas con bajo sodio aumentaron en forma significativa, lo que significa que la disminución del NaCl no influye en el proceso de la hipertrofia.

El tercer tratamiento que administramos fue un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica (acetazolamida). Este diurético disminuye la reabsorción del túbulo proximal, lo cual favorece el aumento de la carga de NaCl que llega a la zona de la MD, disminuyendo de esta forma la retroalimentación tubuloglomerular en ratas normales y por tanto disminuye la tasa de filtración glomerular, esto fue reportado en 1978 por Tucker, mas tarde en 1982 por Persson y col. y recientemente Aihua y col. en el año 2004 corrobora este conocimiento (Aihua et al., 2004).

Lo que buscamos con este tratamiento fue disminuir la mayor reabsorción causada por la hipertrofia de las células proximales en la diabetes o dicho de otra forma, tratamos de una manera farmacológica aumentar la concentración de NaCl que llega a la MD, en este caso por disminución de la reabsorción proximal del NaCl. Al tratar a las ratas diabéticas con acetazolamida, y buscar la expresión de la COX-2 observamos que esta expresión no aumentó como sucedió en las ratas diabéticas sin tratamiento, demostrando con esto que al aumentar la concentración de NaCl, evita el aumento de la expresión de la enzima.

La acetazolamida no produce cambios en cuanto al peso, a la hiperglucemia, en la ingesta de alimento y en cuanto a la depuración de creatinina se observó un aumento. En cuanto al peso renal y al área celular de las células proximales hubo hipertrofia, lo cual nos indica que a pesar de la hipertrofia causada por la diabetes, la acetazolamida al disminuir la reabsorción de NaCl, evita el aumento de la expresión de la COX-2 en la mácula densa.





De esta manera en este trabajo tratamos de demostrar que durante la DM ocurren cambios en la reabsorción proximal y que el NaCl es un factor que regula la expresión de la COX-2 en esta patología inducida experimentalmente.

## VIII CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos decir que:

- 1) Se reproduce el modelo de diabetes, observando poliuria, polidipsia, polifagia y disminución de peso
- 2) El aumento en el peso de los riñones de las ratas diabéticas así como el diámetro de las células del túbulo proximal demuestra hipertrofia en ratas diabéticas.
- 3) No parece haber daño renal en este periodo de tiempo en los grupos diabéticos.
- 4) Se confirma un aumento en la expresión de la COX-2. en ratas diabéticas
- 5) Sugerimos que la concentración de sodio regula la expresión de COX-2 en la mácula densa de ratas diabéticas.
- 6) El NaCl no afecta el proceso de hipertrofia inducido por la DM



## REFERENCIAS.

- Agarwal MK: Streptozotocin: Mechanism of action. *Febs Letters* 120 (1): 1-3, 1980.
- Aihua Deng, Karen A. Munger, Jose M. Valdivielso, Joseph Satriano, Mark Lortie, Roland C. Blantz, and Scott C. Thomson: Increased expression of ornithine decarboxylase in distal tubules of early diabetic rat kidneys: are polyamines paracrine hypertrophic factors? *Diabetes* 52(5):1235-9, 2003.
- Aihua Deng, Lucinda MW and Roland C Blantz: Temporal adaption of tubuloglomerular feedback: Effects of COX-2. *Kidney International* 66: 2348-2353, 2004.
- Alexandria, VA: American Diabetes Association: Diabetes 2205 Vital Statics. *Diabetes Care* 27: (Suppl. 1):S15-S35, 2004.
- Alpen RJ, Howlin KJ, Preising P: Active and passive components of chloride transport in the proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 76: 1360-1366, 1985.
- An S, Yang J, So S, Zeng L, and Goetzi E: Isoforms of the EP3 subtype of human prostaglandin E2 receptor transduce both intracellular calcium and cAMP signals. *Biochemistry* 33: 14496–14502, 1994.
- Atkinson MA, Maclaren NK: The patogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 331:1428–1436, 1994.
- Bank N, Aynedjian HS: Progressive increases in luminal glucosa stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 86: 309–316, 1990.
- Bardoux P, Martin H, Ahloulay M et al. Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, andrenal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 10397–10402,1999.
- Båtshake B, Nilsson C, Sudelin J: Molecular characterization of the mouse prostanoid EP<sub>1</sub> receptor gene. *Eur J Biochem* 231:809-814, 1995.



- Baynes J, Thorpe S. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
- Lopes-Virella M, Virella G. Cytokines, modified lipo-proteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes*; 45 (Suppl 3): S40-4, 1996.
- Bodansky HJ, Cudworth AG, Drury PL, Kohner EM. Risk factors associated with severe proliferative retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*; 5: 97-100, 1982.
- Boel E, Selmer J, Flodgaard H, Jensen T. Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J Diabetes Compl*; 9: 104-29, 1995.
- Bojestig M, Arnqvist HJ, Hermansson G, Karlberg BE, Ludvigsson J: Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus [published erratum in *N Engl J Med* 1994;330:584]. *N Engl J Med*, 330:15-8, 1994.
- Boron WF, Boulpaep EL: *Medical Physiology. Elsevier Saunders* chapter 33: 757-773, 2005.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976.
- Briggs JP, Schubert G, Schnermann J: Quantitative characterization of the tubuloglomerular feedback response: effect of growth. *Am. J. Physiol.* 247 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol* 16: F808–F815, 1984.
- Brochner-Mortensen J, Stockel M, Sorensen PJ, Nielsen AH, Ditzel J: Proximal glomerulo-tubular balance in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 27: 189 –92, 1984.
- Brownlee M. Advanced products of non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. In: Rifkin HPDJ ed. *Diabetes mellitus: theory and practice*. New York: *Elsevier*, 279-91, 1990.



- Brenner BM, Hostetter TH, Olson JL, Rennke: The role of glomerular hyperfiltration in the initiation and progression of diabetic nephropathy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 242 (Suppl.):7-10, 1981.
- Brenner BM: The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. *Kidney Int.* Apr;63(4):1499-507, 2003.
- Breyer MD, Breyer RM: G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Ann Rev Physiol* 63: 579-605, 2001.
- Breyer MD, Breyer RM: Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F12-F23, 2000.
- Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK: Age and family relationship accentuate the risk of IDDM in relatives of patients with insulin dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3739–3743, 1995.
- Caramori ML, Kim Y, Huang C, et al: Cellular basis of diabetic nephropathy: Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes* 51:506-13, 2002.
- Ceolotto G, Gallo A, Miola M, et al. Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes* 48:1316-22, 1999.
- Chen G, Kamal M, Hannon, Daniel L. Simmons, Regina M. Botting, and Timothy HLA: Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387–437, 2004.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Mckanna JA, Harris RC: Role of p38 in the regulation of cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J Clin Invest* 106: 681-688, 2000.
- Cowley A. Evolution of the medullipin concept of blood pressure control: a tribute to Eric Muirhead. *J Hypertension* 12: S25–S34, 1994.



- Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S: Internacional union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205–229, 1994.
- Cowley A, Mattson D, Lu S, and Roman R: The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 25: 663–673, 1995.
- DeWitt DL and Smith WL: Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1412–1416, 1988.
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, American Diabetes Association *Diabetes Care* 2006 29: S43-48, 2006.
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, and Prescott SM: Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 39-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750–11757, 2000.
- Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. *BMJ* 2000; 320(7241): 1062-6.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB y Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 26 Suppl : S 5-20. 2005.
- Eizirik DL, Dipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerstrom C, Anderson A: Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9253-9256, 1994.
- Engelgau MM, Herman WH, Smith PJ, German RR, Aubert RE: The epidemiology of diabetes and pregnancy in the U.S., 1988. *Diabetes Care* 18:1029–1033, 1995



- Gale EAM: Perspectives in diabetes. The discovery of type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 217-227, 2001.
- Ganda OP, Rossi AA, Like AA: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 25: 595-603, 1976.
- Garavito RM and DeWitt DL: The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1441:278–287, 1999.
- Glaser KB, Sung A, Bauer J, Weuchman B: Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. *Biochem Pharmacol* 45:711-721.
- Greger R: How does the macula densa sense tubule function?. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2215-2217, 1997.
- Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, and Breyer M. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol* 273:F18-26, 1997.
- Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, Nicolls MR: Type 2 Diabetes Mellitus as a Conformational Disease. *J Pancreas* 6(4):287-30, 2005.
- Hamada Y, Odagaki Y, Sakakibara F, Naruse K, Koh N, Hotta N. Effects of an aldose reductase inhibitor on erythro-cyte fructose 3-phosphate and sorbitol 3-phosphate levels in diabetic patients. *Life Sci*, 57: 23-9, 1995.
- Hamberg M and Samuelsson B: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:899–903, 1973.
- Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 46:847-53, 1997.
- Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial



- cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int.* 60 (suppl): S66-S9, 1997.
- Hannedouche TP, Delgado AG, Gnoinsahe DA, Boitard C, Gruenfeld JP: Renal hemodynamics and segmental tubular sodium reabsorption in early type 1 diabetes. *Kidney Int* 37: 1126–1133, 1990.
  - Hao CM, Yull F, Blackwell T, Kömhoff M, Davis LS, and Breyer MD: Dehydration activates an NF- $\kappa$ B-driven, COX-2 dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *J Clin Invest* 106: 973–982, 2000
  - Hardman JG, Lee EL, Perry BM, Raymond W. Ruddon, Goodman & Gilman A: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Panamericana, Novena edición, , México D.F. pp 743-744 1996.
  - Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH, and Carretero OA: Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension* 29: 297–302, 1997.
  - Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, and Breyer MD: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94: 2504–2510, 1994.
  - Harris RC, Wang JI, Cheng HF, Zhamg MZ, Mackanna JA: Prostaglandins in macula densa function. *Kidney Int* 67: S49-S52. 2000.
  - Harris RC, Breyer MD: Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am Physiol Renal physiol* 281: F1-F11, 2001.
  - Harrison JR, Kelly PL, and Pilbeam CC: Involvement of CCAAT enhancer binding protein transcription factors in the regulation of prostaglandin G/H synthase 2 expression by interleukin-1 in osteoblastic MC3T3–E1 cells. *J Bone Miner Res* 15: 1138–1146, 2000.
  - Herschman HR: Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv Exp Med Biol* 469: 3–8, 1999.
  - Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, and Trifan OC: Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 551–557, 1999.



- Hoet JJ, Tripathy BB, Rao RH, Yajnik CS: Malnutrition and diabetes in the tropics. *Diabetes Care* 19:1014–1017, 1996.
- Hostetter, T.H., Troy, J.L., and Brenner, B.M: Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 19:410–415, 1981.
- Hostetter, T.H: Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 57:263–278, 1995.
- Inoue H and Tanabe T: Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 143–148, 1998.
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, and Tanabe T: Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxidase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 270: 24965–24971, 1995.
- Iso K, Tada H, Kuboki K, Inokuchi T. Long-term effect of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on the development of incipient diabetic nephropathy in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 15:241-4, 2001.
- Ito T et al: p38 MAP Kinase es required for vasopressin-stimulated HSP24 induction in aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 35: 673-678.
- Jensen B, Schmid C, and Kurtz A: Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271: F659–F669, 1996.
- Jurgen Schnermann: Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J. Physiol.* 274: R263, R279, 1998.
- Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, and Alden CL: Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 26: 612–620, 1998.





- Kozaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, and Tanabe T: Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221:889-897.
- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al: Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101:676-81, 2000.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Herschman HR: TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872, 1991.
- Kummer JL, Rao PK, Heindereich KA: Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 20490-20494.
- Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, Mauer SM. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*;43:661-7, 1993.
- Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*;13:23-30, 1999.
- Lenzen S, Munday R: Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42: 1385-1391, 1991.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329:1456-62, 1993.
- Lopes-Virella M, Virella G. Cytokines, modified lipo-proteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes*; 45 (Suppl 3): S40-4, 1996
- Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skøtt O, and Briggs JP: Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 259: F186–F193, 1990.



- Lucci MS, Wamok DG, Hector FC: Carbonic anhydrase-dependent bicarbonate reabsorption in the rat proximal tubule. *Am J Physiol.* Jan;236(1):F58-65, 1979.
- Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, and Browner MF: Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 3: 927–933, 1996.
- Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL, and Garavito RM: The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 289:1933–1937. 2000.
- Masiello P, Cubeddu TL, Frosina G, Bergamini E: Protective effect of 3-aminobenzamida, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetasa, against STZ-induced DM. *Diabetología* 28:683-686, 1985.
- Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest*;74:1143-55, 1984.
- Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Tanabe T, and Daly JM: Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem.* In press, 1993,
- Mogensen CE: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 28:91-100, 1971.
- Mogensen CE, Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 311:89-93, 1984.
- Mogensen CE: Early glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 46: 201-206, 1986.
- Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, and Babbedge RC: Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 110: 219–224, 1993.



- Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters K, and Giaid A: Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett* 457: 475–477, 1999.
- National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039–1057, 1979.
- Nemeth JF, Hochensang P, Marnett LJ, and Caprioli RM: Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry* 40:3109–3116. 2001.
- Nishigaki N, Negishi M, Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S, and Ichikawa A: Identification of prostaglandin E receptor EP2 cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Letters* 364: 339–341, 1995.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J: Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 127: 161-165, 1990.
- Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus. 2001.
- O'bryan G. Thomas. The renal hemodynamic basis of Diabetic Nephropathy. *Sem Nephrol* 17, No. 2: pp 93-100, 1997.
- Ohishi, K., and Carmines, P.K: Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1559–1566,1995.
- Pedersen SB, Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hypertrophy in experimental diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, Jul;86:(1-2):67-72 1992.
- Persson AEG, Wright FS: Evidence for feedback mediated reduction of glomerular filtration rate during infusion of acetazolamide. *Acta Physiol Scand* 117: 1-7 , 2004.
- Persson AEG, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, and Gonzalez E: Macula densa function. *Kidney Int* 32: S39–S44, 1991.



- Pollock CA, Lawrence JR, Field MJ: Tubular Sodium handling and tubuloglomerular feedback in experimental diabetes mellitus. *Am J Physiol* 260; f946-f952, 1991.
- Roth GJ, Siok CJ, and Ozols J: Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands. *J Biol Chem* 255:1301–1304. 1980.
- Sandler S, Swenne I: Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 25: 444-447, 1983.
- Schnermann J: COX-2 and macula densa control of renin secretion. *Nefrol Dial Transplant* 16:1735-1738, 2001.
- Schnermann J, Traynor T, Yang T, et al: Tubuloglomerular feedback: New concepts and developments. *Kidney Int* 54: S40-S45, 1998.
- Schnermann J, Briggs J P: The function of the juxtaglomerular apparatus: control of glomerular hemodynamics and renin secretion. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology (2nd ed.)*, edited by D. W. Seldin and G. Giebisch. New York: Raven, vol. 1, p. 1249–1289, 1992.
- Schaefer M, Hofmann T, Schultz G, Gudermann T. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3008–3013, 1998.
- Schaefer HJ, Weber MJ: Mitogen-activated protein kinases: messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19: 2435-2444, 2000.
- Sheetz, M. J: Molecular understanding of hyperglycemia adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, Vol 288(20):2579-88.2002.
- Simmons DL, Botting RL, Hla T: Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387–437, 2004.
- Simmons DL, Xie W, Chipman JG, and Evett GE: Multiple cyclooxygenases: Cloning of an inducible form, in *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins and PAF (Bailey JM ed)*: 67–78, 1991.



- Smith WL and Bell TG: Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 235: F451-F457, 1978.
- Soulis-Liparota T, Cooper M, Dunlop M, Jerums G. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*; 38: 387-94, 1995.
- Szkudelski T: The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50:536-546, 2001.
- Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC, Vallon V: Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 217–224, 2001.
- Tooke JE. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes* 44:721-6, 1995.
- Tucker BJ, Steine RW, Guswa LC, Blantz RC: Studies on the tubuloglomerular feedback system in the rat: The mechanism of reduction in filtration rats with benzolamide. *J Clin Invest* 62:993-1004, 1978.
- Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML: Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1458-1464, 1993.
- Vallon V, Blantz RC, Thomson SC: Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol* 269: F876-F883, 1995.
- Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H: Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 10: 2569–2576, 1999.
- Vallon V, Blantz RC, y Thomson S: Glomerular Hyperfiltration and the Salt Paradox in Early Type 1 Diabetes Mellitus: A Tubulo-Centric View. *J Am Soc Nephrol* 14: 530-537, 2003.



- Veldman B.A.J., Vervoort G: Pathogenesis of renal microvascular complications in diabetes mellitus. *Neth J Med*, 60(10):390-6, 2002.
- Vernier RL, Steffes MW, Sisson RS, Mauer SM: Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int*;41:1070-80, 1992.
- Weinstein AM, Osmotic diuresis in mathematical model of the rat proximal tubule. *Am J Physiol* 250: f874-f884, 1986
- Wellsknecht M, Thorpe S, Baynes J. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*, 34: 15134-41, 1995.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL: Mitogen-activated protein kinase: conservation of three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180.
- Wojtaszek PA, Heasley LE, and Berl T: In vivo regulation of MAP kinases in *Ratus norvegicus* renal papilla by water loading and restriction. *J Clin Invest* 102: 1874–1881, 1998.
- Wolf G and Ziyadeh FN: Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56: 393–405, 1999.
- Xie W and Herschman HR: Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 271: 31742–31748, 1996.
- Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, and Yamamoto S: Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor- interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 270: 31315–31320, 1995.
- Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, and Schnermann JB: Low chloride stimulation of PGE2 release and COX-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem* 275: 37922–37929, 2000.



- Yang T, Schnermann JB, and Briggs JP: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 277: F1-9, 1999.
- Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, and Briggs JP: Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol* 274:F481-9, 1998.
- Yokoyama C and Tanabe T: Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 165:888-894, 1989.
- Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:1925-30, 1986.
- Ziyadeh F. Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 21: 292-302, 1995.