



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Evaluación de la expresión de COX-1, COX- 2 y su relación con la activación del sistema renina-angiotensina en diferentes etapas de la evolución de la diabetes mellitus tipo 1”

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Itzel Berenice Cervantes Frias



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por todas las enseñanzas, asesoría, paciencia y apoyo en todo momento.

A mis sinodales: Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dra. Ana Lilia García Hernández, Dra. Leticia Moreno Fierros y Dr. Alonso Antonio Vilches Flores por sus observaciones y críticas para el mejoramiento de este trabajo.

Agradecimiento a la M. en C. Carmen Gpe. Mondragón Huerta, por el apoyo técnico en el desarrollo de la técnica de RT-PCR en Tiempo Real.

Agradecemos a los apoyos recibidos por medio de los proyectos CONACYT 102022 y PAPIIT IN223009 UNAM que hicieron posible el desarrollo de esta investigación y FESI-DIP- PAPCA- 2014-37 FES Iztacala UNAM en la culminación de esta tesis.

Ésta tesis forma parte del proyecto global de la Unidad de Biomedicina titulada “Procesos inflamatorios asociados a enfermedades crónico degenerativas”.

DEDICATORIA

Ésta tesis se la dedico principalmente a mi mamá Helina Frias Hernández y a mi papá Armando Cervantes Ortiz. Gracias por todo el esfuerzo tanto físico, moral así como económico que han hecho como padres por sacarme adelante y para darme todo lo que hasta ahora tengo, les estaré agradecida toda mi vida por su apoyo incondicional, amor, consejos, motivaciones y sobretodo paciencia. Los amo.

Y aunque al principio nadie creyó que podría desempeñarme como Bióloga... Si se pudo!!!!

A mis amigos Erick García Ortiz, Blondie Quintero Sandoval, Elizabeth Zamora Mancera, Roberto Servín Garrido, quienes han estado conmigo en las buenas y en las malas a lo largo de la carrera y algunos desde la prepa. iii Los quiero!!! Gracias por su compañía, risas y por todos esos momentos de diversión que hemos pasado juntos☺.

Muy especialmente agradezco a mis amigas del laboratorio:

- M.C Marian Martínez Cruz por todos tus consejos, enseñanzas, compañía, cariño y amistad incondicional. BFF4evr
- M.C. Carmen Mondragón Huerta compañera de trabajo y amiga. Muchas gracias por todo lo que me enseñaste.

Sin ustedes no hubiera sido lo mismo en el laboratorio, las quiero mucho.

A mi familia en general gracias por el apoyo.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por mi formación profesional.

**“NO ESTUDIO POR SABER MAS, SINO
POR IGNORAR MENOS”**

Sor Juana Inés de la Cruz
(1651-1695)

ÍNDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	3
1.1 Diabetes Mellitus.....	3
1.1.1 Definición.....	3
1.1.2 Insulina.....	3
1.1.3 Receptor de la Insulina.....	6
1.1.4 Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	7
1.1.5 Diabetes Mellitus experimental por estreptozotocina.....	7
1.1.6 Complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.....	8
1.1.7 Nefropatía Diabética.....	10
1.1.8 Filtración Glomerular.....	12
1.1.9 Ciclooxygenasas.....	14
1.2. Regulación de la expresión genética de las isoformas de la COX.....	17
1.2.1 Sistema Renina-Angiotensina.....	18
1.2.2 Efectos de la Angiotensina II.....	19
II. Antecedentes.....	21
III. Justificación.....	23
IV. Hipótesis.....	24
V. Objetivos.....	24
VI. Materiales y Métodos.....	25
6.1 Animales.....	25
6.1.1 Tratamientos con captopril y celecoxib.....	26
6.1.2 Perfusión renal.....	26
6.1.3 Extracción de RNA.....	27
6.1.4 Integridad del RNA.....	28
6.1.5 Eliminación de DNA genómico.....	28
6.1.6 Reverso Transcripción (RT).....	29
6.1.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	

(RT-PCR).....	29
VII. Estadística.....	31
VIII. Resultados.....	32
8.1 Efecto de la diabetes inducida con stz.....	32
8.1.1 Masa renal.....	34
8.1.2 Expresión del mRNA para COX-1 en corteza renal.....	35
8.1.3 Expresión del mRNA para COX-2 en corteza renal.....	37
8.1.4 Expresión del mRNA para renina.....	38
8.1.5 Efecto de los tratamientos con celecoxib y captopril en ratas controles y diabéticas.....	40
8.1.6 Efecto de los tratamientos sobre la glucosa sanguínea.....	41
8.1.7 Efecto de los tratamientos sobre la masa renal.....	42
8.1.8 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de COX-1 en corteza renal.....	43
8.1.9 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de COX-2 en corteza renal.....	44
8.2 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de renina en corteza renal.....	45
IX. Discusión.....	46
X. Conclusiones.....	51
XI. Referencias.....	52

Índice de Tablas y Figuras

	Página
Figura 1 Estructura de la Insulina.....	4
Figura 2 Efectos metabólicos de la Insulina.....	5
Figura 3 Activación de la vía de las MAPK por acción de la Insulina.....	7
Figura 4 Metabolismo de Ácido Araquidónico.....	14
Figura 5 Aparato Yuxtaglomerular.....	18
Figura 6 Esquema de la activación del Sistema Renina- Angiotensina.....	20
Figura 7 Estructura química del fármaco captopril.....	23
Figura 8 Estructura química del fármaco celecoxib.....	24
Figura 9 Niveles de glucosa sanguínea de los grupos control y diabéticos de 1,2 y 4 semanas de hiperglicemia.....	36
Figura 10 Índice de masa renal de los grupos control y diabéticos de 1,2 y 4 semanas de hiperglicemia.....	38
Figura 11 Expresión relativa del mRNA de COX-1 en corteza renal de los grupos control y diabéticos de 1,2 y 4 semanas de hiperglicemia.....	40
Figura 12 Expresión relativa del mRNA de COX-2 en corteza renal de los grupos control y diabéticos de 1,2 y 4 semanas de hiperglicemia.....	42
Figura 13 Expresión relativa del mRNA de renina en corteza renal de los grupos control y diabéticos de 1,2 y 4 semanas de hiperglicemia.....	44
Figura 14 Niveles de glucosa sanguínea en los grupos control y diabéticos con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril.....	46
Figura 15 Índice de masa renal de los grupos control y diabéticos con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril.....	47
Figura 16 Expresión relativa del mRNA de COX-1 en la corteza renal de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril.....	50
Figura 17 Expresión relativa del mRNA de COX-2 en la corteza renal de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril.....	52
Figura 18 Expresión relativa del mRNA de renina en la corteza renal	

de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril.....54

Tabla 132

ABREVIATURAS

DM	Diabetes Mellitus
ND	Nefropatía Diabética
STZ	Estreptozotocina
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante B
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
PKC	Proteína cinasa C
MAPK	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
NO	Óxido Nítrico
COX	Ciclooxigenasa
PGs	Prostanoides
PGI	Prostaglandina
PGH₂	Prostaglandina H ₂
TXB	Tromboxano
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
COX-3	Ciclooxigenasa 3
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
Ang I	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
AT₁	Receptor tipo 1 a Angiotensina
AT₂	Receptor tipo 2 a Angiotensina
STZ	Estreptozotocina
GLUT 2	Transportador de glucosa tipo 2
AA	Ácido Araquidónico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
DEPC	Di-etil pirocarbonato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria
RT	Transcriptasa reversa

RESUMEN

La función de la ciclooxigenasa (COX) es la síntesis de prostanoïdes a partir del ácido araquidónico. La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se encuentra expresada de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la isoforma inducible, aunque en el riñón es expresada constitutivamente, y juega un papel importante en la regulación de la función renal y la estimulación de la liberación de renina. Ambas isoformas de la ciclooxigenasa generan prostaglandinas y tromboxanos.

Durante la diabetes, la hiperglicemia induce un estado pro-inflamatorio que contribuye directamente a la disfunción endotelial al afectar la señalización de insulina y alterar la expresión de genes importantes para la homeostasis vascular y renal, como es el caso de las COXs. En las primeras etapas del desarrollo de la nefropatía diabética, las prostaglandinas E_2 y prostaciclina tienen un papel importante en las alteraciones de la hemodinámica renal en humanos con diabetes tipo 1. También, se ha postulado que el sistema renina-angiotensina (SRA) participa de manera importante en la patogénesis de la nefropatía diabética. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de COX-1 y 2 así como su relación temporal con la expresión genética de renina en diferentes etapas de la evolución de la diabetes mellitus tipo 1 en la rata.

Para ello, en éste estudio se utilizaron ratas macho Wistar de 1,2 y 4 semanas con diabetes inducida con estreptozotocina (STZ) y ratas control administradas con amortiguador de citratos. Posteriormente, se extrajo RNA de corteza renal para evaluar la expresión del mRNA para renina, COX-1 y COX-2 por medio de la técnica de qPCR-RT.

Para evaluar el curso temporal de la expresión renal de las COXs y de renina, se determinó el mRNA para las tres enzimas en corteza renal de ratas diabéticas con diferente tiempo de exposición a la hiperglicemia. Como resultado de la primera semana de hiperglicemia, se presentó una sobreexpresión del mRNA para COX-1, COX-2 y renina en la corteza renal. A la segunda semana se mantuvo el aumento en la expresión de ambas COXs, pero disminuyó la expresión del mRNA para renina. A las cuatro semanas los niveles de mRNA para las ciclooxigenasas y la renina fueron semejantes a los observados a la primera semana de hiperglicemia con un aumento en la expresión para las 3 enzimas.



Interesantemente, el incremento en la expresión de las COXs y renina se asoció con un aumento en el índice de masa renal, sugiriendo que la actividad de estas enzimas está relacionada con alteraciones estructurales renales desde etapas tempranas en el desarrollo de la diabetes tipo 1.

Para determinar si existe una regulación cruzada entre el SRA y la COX-2 en etapas tempranas de la diabetes, se decidió dar tratamiento oral con celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, y captopril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) durante la primera semana de hiperglicemia. Como resultado del tratamiento con captopril disminuyó la expresión de renina y de ambas COXs en el animal diabético. Así mismo, el tratamiento con celecoxib, disminuyó la expresión del mRNA de COX-1, COX-2 y renina provocado por la hiperglicemia. En conclusión nuestros resultados sugirieron que el aumento en la expresión de la COX-2 en la corteza renal, podría estar relacionado con la sobre activación del SRA en la diabetes tipo 1.



I. Introducción

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Definición

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónico degenerativa, que se caracteriza por hiperglicemia, que resulta del déficit en la secreción y/o acción de la insulina (OMS, 2013), debido a la disfunción o a la destrucción de las células β pancreáticas, que se traduce en un déficit absoluto de insulina y dependencia vital a la insulina exógena en este último caso (Lerman and Zimmet, 2005).

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son la hiperglicemia, polifagia, poliuria, polidipsia, pérdida de peso y cansancio (Al-Yaarubi y col., 2014).

1.1.2 Insulina

La insulina es una hormona constituida por 51 residuos de aminoácidos (Fig.1), es sintetizada por las células β de los islotes pancreáticos a partir de un precursor de 110 aminoácidos llamado pre proinsulina (Hunter y Garvey, 1998).



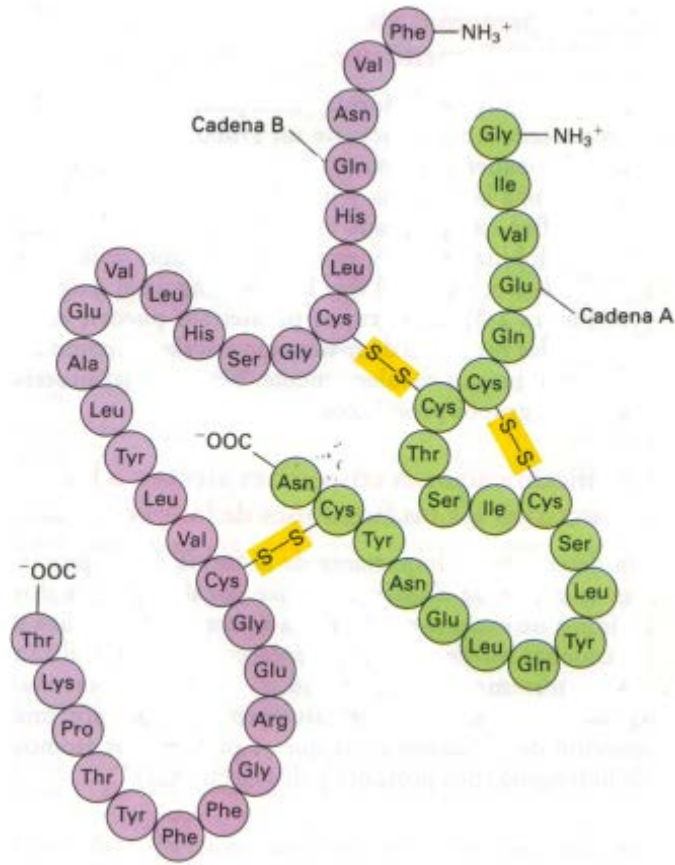


Fig.1 Estructura de la insulina. Compuesta por dos cadenas, la cadena A compuesta por 21 aminoácidos y la cadena B compuesta por 31 aminoácidos estas unidas por puentes de sulfuro.

La glucosa es el principal estímulo para la secreción de insulina. La insulina estimula el almacenamiento de la glucosa en el hígado como glucógeno, en el tejido adiposo como triglicéridos y en los músculos como proteína; también favorece la utilización de glucosa en el músculo para la obtención de energía, bloquea el desdoblamiento de triglicéridos, glucógeno, proteínas y la conversión de aminoácidos en glucosa.

Estas vías están aumentadas durante el ayuno y la diabetes. La conversión de aminoácidos en glucosa y ésta a su vez a ácidos grasos ocurre de manera primaria en el hígado (Goodman y Gilman, 2006; Fig.2).

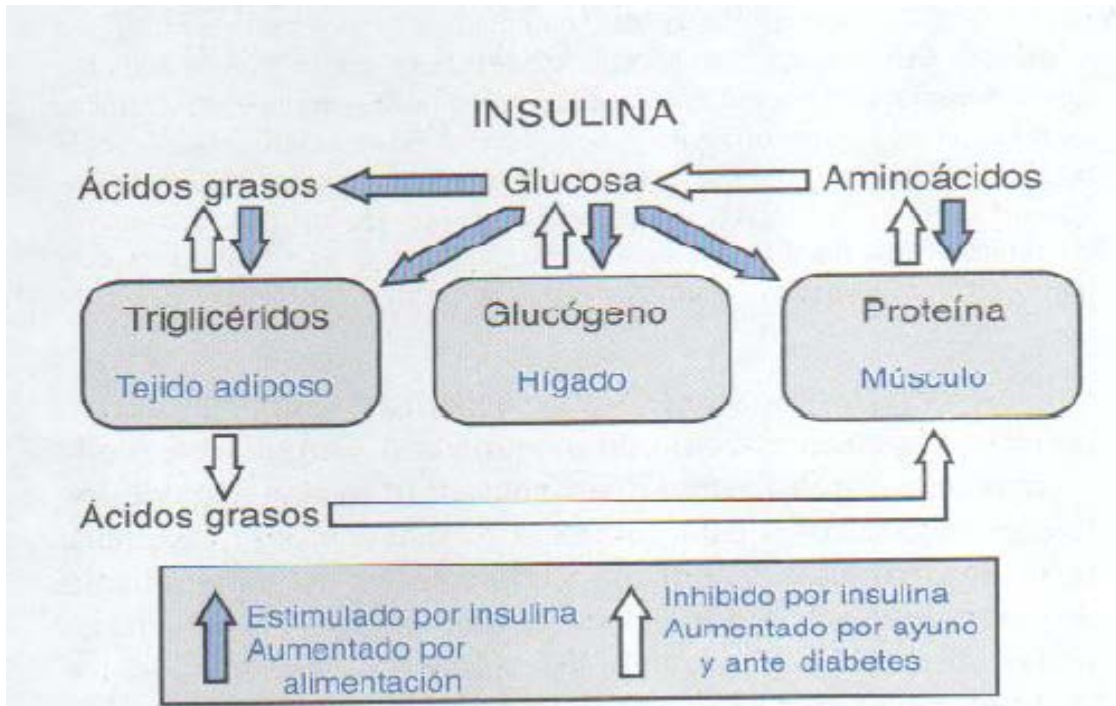


Fig.2 Efectos metabólicos de la insulina. Favorece la entrada y almacenamiento de glucosa en músculo, tejido adiposo e hígado.

1.1.3 Receptor de la insulina

Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (3). El IR es un está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. Una vez que la insulina interacciona con su receptor, y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Olivares y Arellano, 2008; Fig.3)



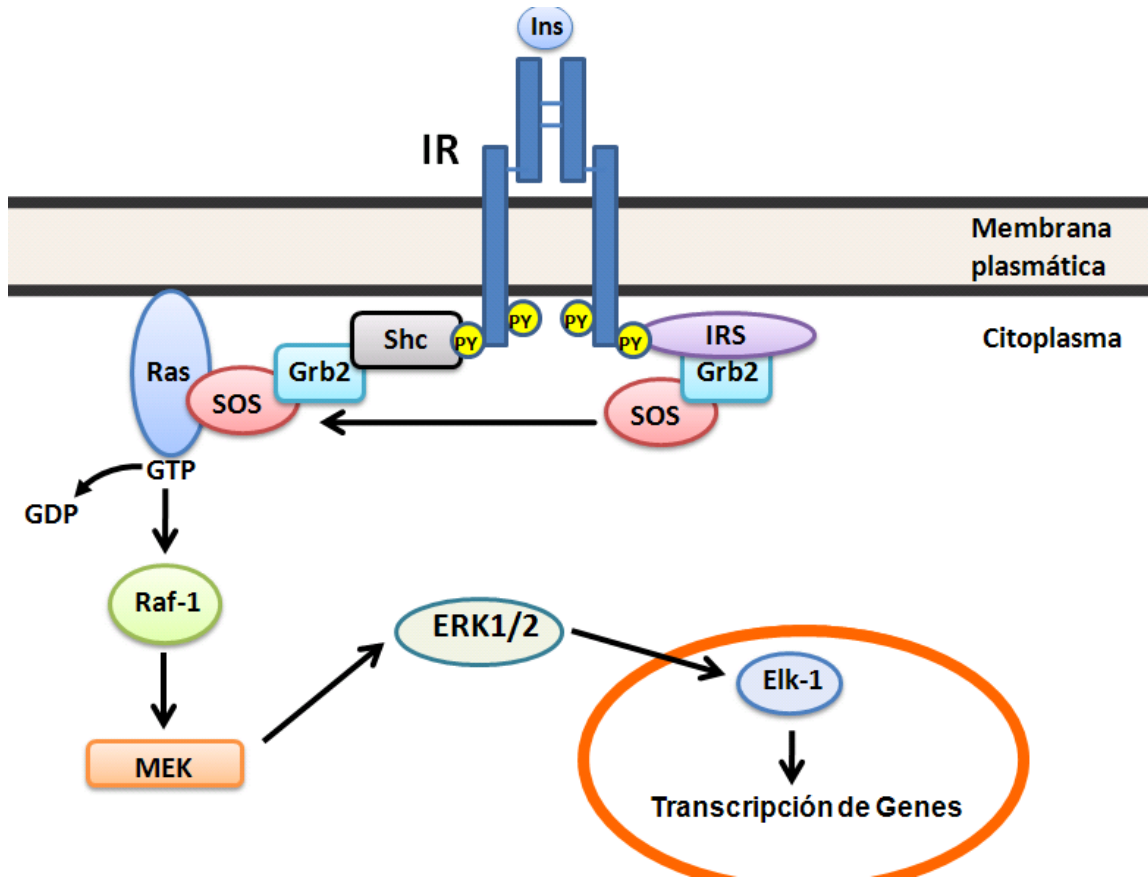


Fig.3 Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Alternativamente existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación del IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPKs. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc.

1.1.4 Clasificación de la Diabetes Mellitus

La DM se puede clasificar en dos grupos; la tipo 1 la cual se caracteriza por la ausencia total de insulina causada por la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos, mientras que la tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina así como por la falla en su secreción, ambos factores influenciados por factores genéticos y ambientales (A.D.A, 2014).

1.1.5 Diabetes Mellitus experimental por estreptozotocina

Al ser la DM una patología de importancia desde el punto de vista clínico, se han desarrollado diversos modelos experimentales para su estudio en los cuales un alto porcentaje de células beta son destruidas, lo que ocasiona una baja producción de insulina endógena provocando hiperglicemia y pérdida de peso. La estreptozotocina (STZ) (2-deoxy-2-3-metil-3-nitrosurea-D-glucopiranos) es sintetizada por *Streptomyces acromogenes*, es un compuesto empleados para desarrollar DM tipo 1 en modelos animales. Después de su administración entra a la célula pancreática por el transportador GLUT 2 y causa alteraciones del DNA y ATP. Además, es una fuente de radicales libres que pueden contribuir al daño del DNA y posteriormente a la muerte celular (King, 2012).

1.1.6 Complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus

En la diabetes la hiperglicemia induce un estado pro-inflamatorio que contribuye directamente a la disfunción endotelial al afectar la señalización de insulina y alterar la expresión de genes importantes para la homeostasis vascular (Nacci y col., 2008).



Las altas concentraciones de glucosa inducen efectos celulares específicos los cuales en el riñón afectan muchos tipos de células incluyendo células endoteliales, células del músculo liso, células mesangiales, podocitos, células del túbulo colector y miofibroblastos. Un fenotipo notable en el riñón diabético es su crecimiento que se lleva a cabo a través de la hiperplasia y la hipertrofia las cuales comienzan al inicio de la diabetes (Vallon y Komers, 2011).

La hiperglucemia estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) ya que se aumenta la síntesis de diacilglicerol que estimula las proteínas cinasas (PKC) las cuales a su vez aumentan la actividad de las MAP cinasas y promueve la transcripción de este factor (Harvey, 2011). Por otra parte se activan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Además, se favorece el incremento en la permeabilidad glomerular y la presión capilar glomerular, facilitando la eliminación de proteínas a través de la orina y la infiltración de macrófagos que promueven la expresión del TGF- β , que finalmente provocan la insuficiencia renal.

La hiperglucemia es responsable del daño en la célula endotelial, al producir un aumento en la secreción de endotelina-1 y una disminución en la síntesis de óxido nítrico (NO) (Parving y Mauer, 2007).



Factores de riesgo como la hiperglicemia alteran la habilidad del endotelio para responder a cualquier estímulo físico o químico apropiadamente (Wong y col., 2013).

El endotelio es una interface dinámica que responde a varios estímulos, sintetiza y libera moléculas vasoactivas y antitrombóticas que regulan la función cardiovascular y actúa como una barrera selectiva de permeabilidad.

El NO, la prostaciclina, el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio y la endotelina, están entre las sustancias vasoactivas producidas y liberadas por el endotelio.

1.1.7 Nefropatía Diabética

El riñón es un órgano blanco en la diabetes mellitus, aproximadamente el 40% de los pacientes llegan a cursar nefropatía diabética (ND) y falla renal (Aguilar y col., 2003).

La ND es una de las complicaciones más graves de la diabetes mellitus se ha convertido en la principal causa de enfermedad renal en etapa terminal (Rossing, 2006). En su etapa inicial es asintomática (A.D.A, 2004).

La ND progresa por etapas, comenzando con el engrosamiento de la membrana basal glomerular, expansión de las células mesangiales y posteriormente la progresión gradual de glomerulosclerosis y fibrosis intersticial, eventualmente culminando en una falla renal (Karihaloo, 2012).



En la DM tipo 1 se han propuesto cinco etapas; la etapa 1-2 es equivalente a una nefropatía pre-clínica, y solo es detectada por una biopsia, la etapa 3 equivale a una nefropatía temprana, la etapa 4 es determinada como nefropatía tardía, por último en la etapa 5 se presenta la progresión de la última etapa del daño renal (Shlipak, 2009).

Etapa 1: Hiperfiltración glomerular y renomegalia.; Etapa 2: Lesiones glomerulares tempranas; Etapa 3: Microalbuminuria definida por una tasa de excreción de albúmina diaria con valores de 20/200 $\mu\text{g}/\text{min}$ lo que predice el deterioro de la función renal. Se asocia con el daño vascular en otros órganos; Etapa 4: Macroalbuminuria y disminución de la tasa de filtración glomerular. La filtración glomerular cae en un rango de 1ml/min/mes; Etapa 5: Falla renal después de 20-30 años de DM en el 30 a 40 % de los pacientes con DM tipo 1, los niveles de creatinina son más altos que en personas normales (Jawa y col., 2004).

En su patogénesis están implicados factores hemodinámicos, los cuales incluyen elevaciones de la presión sistémica y capilar glomerular y la activación de diversas vías de hormonas vasoactivas incluyendo al SRA, la endotelina y urotensina.

Esta alteración hemodinámica actúa de manera independiente y en conjunto con vías metabólicas para activar la proteína cinasa C (PKC) y la MAP cinasa (MAPK), factores de transcripción nucleares como el factor nuclear $\kappa\text{-B}$ y diversos factores de crecimiento. Estos mecanismos moleculares conducen a un incremento en la permeabilidad de albumina renal y su acumulación en la matriz extracelular lo que



resulta en proteinuria, glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial (Forbes y Cooper, 2013).

1.1.8 Filtración glomerular

Uno de los primeros cambios que ocurren durante la DM es el incremento en la tasa de filtración glomerular, denominada hiperfiltración. El volumen de plasma filtrado por unidad de tiempo se conoce como tasa de filtración glomerular (TFG) y depende de la presión hidrostática y de la presión coloidosmótica de las proteínas en la capsula de Bowman. La microvasculatura renal tiene un sitio de regulación de la resistencia en las arteriolas aferentes y eferentes a través de su relajación o constricción (Brenner, 2003). Se ha propuesto que la hiperfiltración es una respuesta apropiada en respuesta a una retroalimentación túbulo glomerular que reacciona a un aumento inadecuado en la reabsorción de sodio (Van buren y Toto, 2013). La glucosa se reabsorbe junto con el Na^+ en la primera porción del túbulo proximal, más adelante a lo largo del túbulo el Na^+ se reabsorbe con el Cl^- , se filtra a una velocidad de aproximadamente 100mg/min. Básicamente toda la glucosa se reabsorbe y sólo algunos miligramos aparecen en la orina. La cantidad reabsorbida es proporcional a la cantidad filtrada y por tanto a la concentración plasmática de la glucosa, sin embargo una vez que se excede el transporte máximo de glucosa, aumenta la cantidad de glucosa en la orina (Ganong, 2002).



1.1.9 Ciclooxygenasas

La prostaglandina sintasa o ciclooxigenasa (COX) es la enzima responsable de la formación de prostanooides vasodilatadores y vasoconstrictores como prostaglandinas (PGs) prostaciclina (PGI_2) y tromboxano (TXA_2) provenientes del ácido araquidónico localizado en la membrana plasmática de las células, incluyendo a las células endoteliales. El primer paso en la biosíntesis de PGs es mediante la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina H_2 (PGH_2). La PGH_2 es transformada rápidamente en una variedad de eicosanoides involucrados en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas (Smith, 1989; Fig.4).



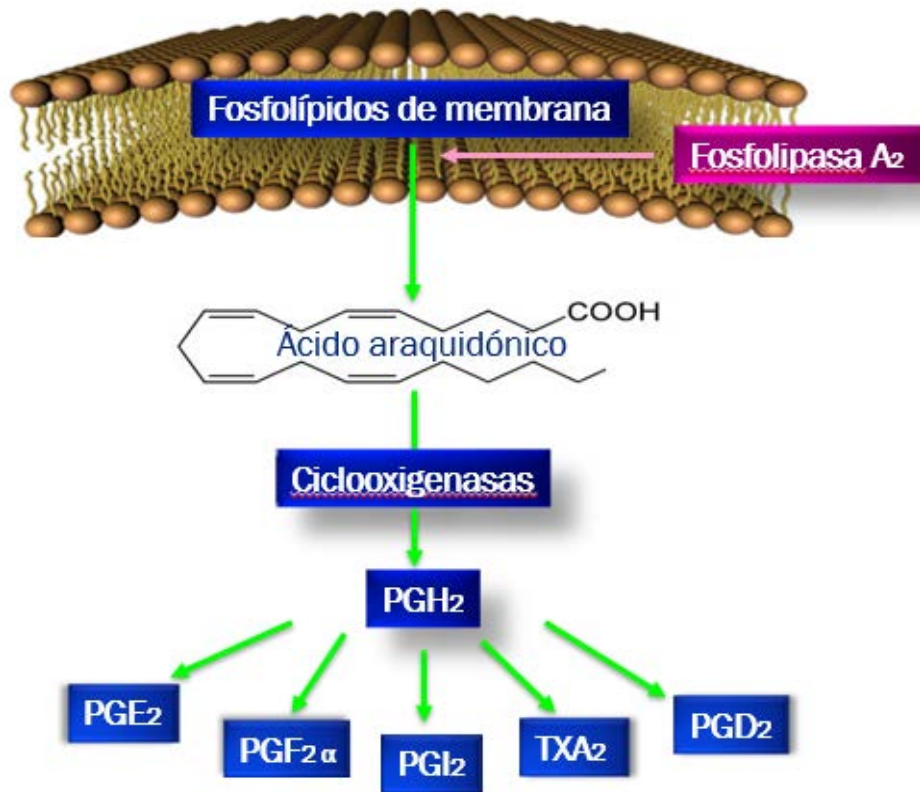


Fig.4 Metabolismo del Ácido Araquidónico. A partir de los fosfolípidos, por la enzima fosfolipasa A₂ se libera el ácido araquidónico. El ácido araquidónico se metaboliza en diferentes formas: ciclooxigenasas o lipooxigenasas, las ciclooxigenasas transforman al ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos (Modificado de Rang y col., 2008).

Tres isoformas de la ciclooxigenasa han sido identificadas: ciclooxigenasa-1 (COX-1), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y ciclooxigenasa-3 (COX-3), esta última encontrada en perros como una variante de la COX-1, se espera que este péptido tenga actividad de ciclooxigenasa, debido a que presenta la mayor parte de la secuencia de aminoácidos idéntica a COX-1 (Perrone y col., 2010)

La COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos. En el riñón adulto normal, COX-1 ha sido localizada en arterias y arteriolas, glomérulos y túbulos colectores. En contraste la COX- 2 es una enzima inducible con niveles bajos o indetectables en la mayoría de los tejidos, y su expresión puede ser marcadamente aumentada por estímulos fisiológicos, inflamatorios, mitogénicos y otros estímulos fisiopatológicos, incluyendo la hiperglicemia (Yar y col., 2010).

Ambas isoformas de la COX metabolizan el ácido araquidónico, generando PGs y tromboxanos (Komers y col., 2007).

Se ha identificado la presencia de COX-2 en la corteza renal, en el asa gruesa ascendente de Henle y en la macula densa (Linton y Fazio, 2002). Aunque se considera que es una enzima inducible, la COX-2 se expresa constitutivamente en el riñón, estando involucrada en la regulación del balance de sodio y agua, el tono vascular renal y la liberación de renina (Komers y col., 2007).

En la mayoría de los tejidos la COX-2 no se encuentra presente o se encuentra en cantidades muy bajas pero es fuertemente inducida por citocinas, factores de crecimiento y promotores tumorales resultando en la síntesis de prostaglandinas asociadas con inflamación (Dixon y col., 2000).



1.2 Regulación de la expresión genética de las isoformas de la COX

El gen humano de la COX-1 se encuentra en el cromosoma 9, es de aproximadamente 22 kb de longitud y contiene 11 exones. El promotor de la COX-1 carece de una caja TATA o CAAT, tiene un alto contenido de GC y contiene varios sitios de inicio de transcripción propiedades características de los genes constitutivos. Aunque su proteína es constitutivamente expresada en muchos tejidos, la COX-1 es regulada positivamente por AMPc en algunos tipos de células incluyendo monocitos, células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y megacariocitos primarios (Kang y col., 2007).

Por otra parte, diferentes factores de transcripción pueden regular COX-2 dependiendo del estímulo y del tipo celular. El promotor del gen de la COX-2 humano contiene una caja TATA clásica, una caja E y varios sitios de unión para factores de transcripción, muy conservados en humano, ratón y rata (Iñiguez y col., 2000; Vila-del Sol y Fresno, 2005).

La expresión de COX-2 en la corteza renal es inhibida por la Ang II. Si la actividad del SRA se ve disminuida o es insuficiente para mantener el equilibrio de electrolitos, se incrementa la expresión de COX-2 y la síntesis de prostanoïdes, lo cual activa la expresión y liberación de renina, que lleva a un incremento en la actividad de la Ang II y aldosterona lo que resulta en un aumento en la reabsorción tubular, facilitando de este modo el restablecimiento de la homeostasis del volumen intravascular (Cheng y Harris, 2004).



La PGE_2 es el principal producto del metabolismo de ácido araquidónico por la COX-2 en el riñón y regula la hemodinámica renal glomerular y la reabsorción tubular de Na^+ y H_2O durante el estrés fisiológico y puede iniciar la producción de renina. La acción biológica de la PGE_2 está mediada por cuatro receptores acoplados a proteínas G designados como EP_1 , EP_2 , EP_3 y EP_4 (Wang y col., 2014).

La renina es una enzima aspartil proteolítica cuyo sustrato es el angiotensinógeno, un péptido formado dentro del hígado y liberado a la circulación. Es la enzima limitante de la velocidad de la formación de Ang II en el SRA. La renina es sintetizada, almacenada y liberada por las células yuxtaglomerulares en el riñón (Wong y col., 2013; Fig.5).



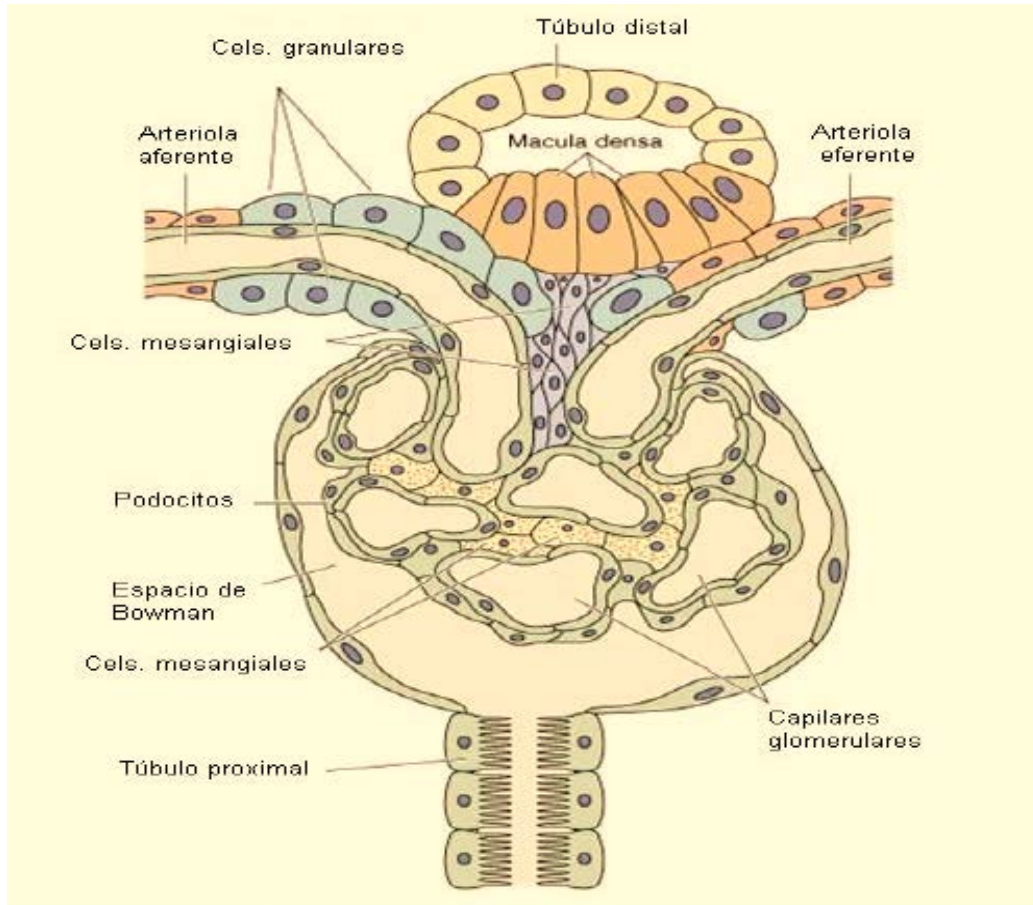


Fig.5 Aparato yuxtaglomerular. Formado por la arteriola aferente, arteriola eferente y el túbulo contorneado distal en la proximidad del glomérulo. Ésta estructura posee células especializadas llamadas células de la mácula densa, que responden ante cambios en el flujo y la composición de líquido tubular y controlan la liberación de renina por las células granulares especializadas de la arteriola aferente. (Boron y Boulpaep, 2005).

1.2.1 Sistema Renina-Angiotensina

El SRA es un sistema hormonal que ayuda a regular la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. La renina cataliza la conversión del angiotensinógeno, proteína secretada por el hígado, en Angiotensina I (Ang I) que, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), secretada por las células endoteliales de los pulmones principalmente, y de los riñones, se convierte en Angiotensina II (Ang II) (Chawla y col., 2010).

Uno de los efectos de la Ang II es la liberación de aldosterona. El mecanismo del SRA en el tejido renal es único porque los componentes necesarios para generar la Ang II están presentes a lo largo de la nefrona en ambos compartimentos tanto intersticiales como intratubulares (Kobori y col., 2013; Fig.6).



Renin-angiotensin-aldosterone system

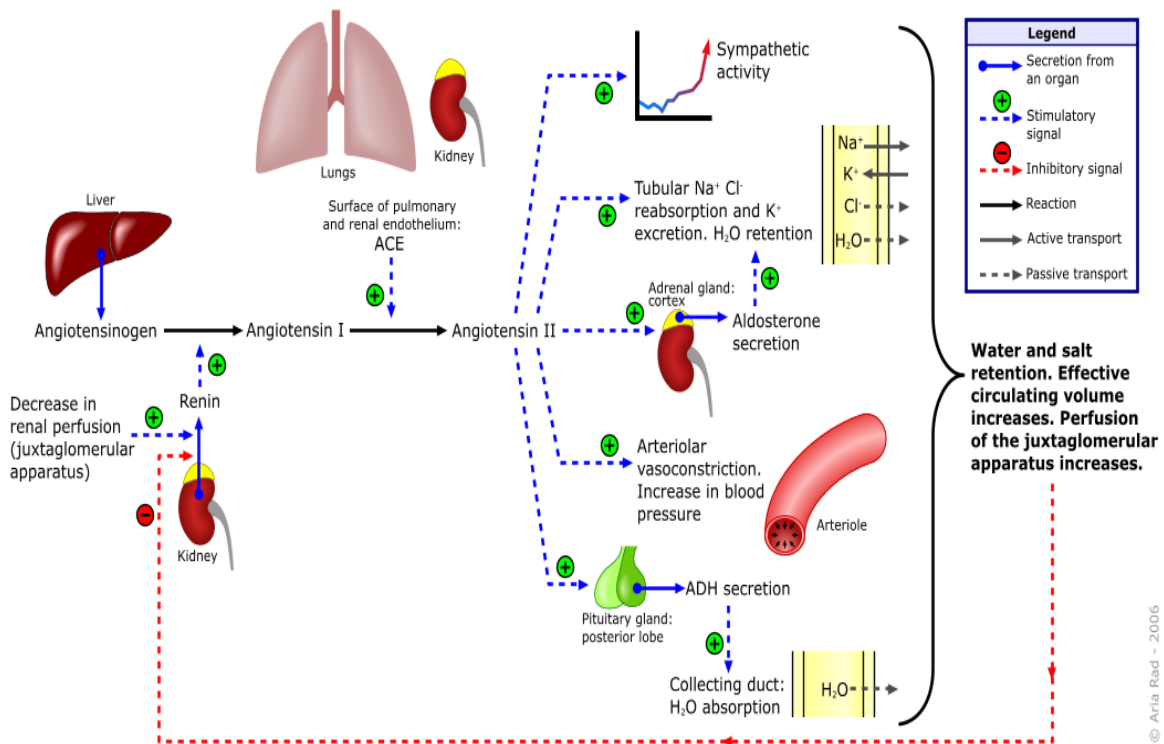


Fig.6 Esquema de la activación del Sistema Renina-Angiotensina. Se muestran los mecanismos de acción de la activación de este sistema y sus componentes así como sus efectos sobre diferentes órganos. Imagen tomada de <http://www.nutricioblog.com>



1.2.2 Efectos de la Angiotensina II

Los efectos biológicos de la Ang II son mediados a través de dos subtipos de receptores específicos, el receptor a angiotensina tipo 1 (AT_1) y el receptor a angiotensina tipo 2 (AT_2). Los efectos de Ang II parecen estar mediado por su unión al receptor AT_1 , incluyendo la vasoconstricción y la activación del sistema nervioso simpático.

A pesar de compartir solo un 34% de homología en su secuencia con el AT_1 , el receptor AT_2 es escasamente expresado en el adulto, pero es abundante en tejidos fetales, donde se cree que tiene un papel importante en el desarrollo de los tejidos donde se encuentra (Forbes y col., 2007).

El incremento en la secreción de renina aumenta la formación de Ang II, misma que estimula a los receptores AT_1 en las células yuxtaglomerulares y en la macula densa para inhibir la expresión y liberación de renina y la expresión de la COX-2 respectivamente, siendo así un mecanismo de retroalimentación negativa (Goodman y Gilman, 2006).

La hiperglicemia crónica que se presenta en la DM, incrementa la Ang II tisular, la cual induce estrés oxidativo, daño endotelial, vasoconstricción, trombosis e inflamación (Giaccetti y col., 2005).



II. Antecedentes

Komers y col. en 2001 encontraron que la COX-2 está involucrada con la producción de prostaglandinas en el riñón y desempeña un papel en el control de la función y la morfología renal. La expresión cortical renal proteica de COX-2 y su función se incrementa en los modelos experimentales de la DM en ratas con cinco semanas de DM. Sin embargo, sugieren, no ha sido completamente aclarado el papel fisiopatológico de este fenómeno en el riñón diabético.

Chen y colaboradores en 2011, observaron que el incremento en la expresión de COX-2 en los riñones de ratas diabéticas con estreptozotocina, se asoció con una mayor liberación de prostaglandinas cuando fueron estimulados por el ácido araquidónico (AA), sugiriendo que el aumento en los prostanoides derivados de la COX-2 están involucrados en el daño renal durante la diabetes, durante cuatro semanas.

Vázquez y col., 2013 demostraron que COX-2, participa en el desarrollo de la hipertrofia renal en ratas diabéticas inducidas con STZ durante siete días, y puede modular la actividad de la Ang II, ya que los tratamientos con inhibidores selectivos de COX-2 pueden tener un efecto renoprotector por la reducción de la expresión de receptores AT₁ y TGF-β1.

Captopril, un inhibidor de la ECA, disminuye los niveles tisulares de Ang II. Posee una potente actividad antioxidante, neutraliza diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno y previene la peroxidación de lípidos.



Además, estudios previos han mostrado que el captopril incrementa la presión sanguínea de los islotes, aumenta la secreción de insulina, provee un mejor control de la glicemia y atenúa la ND en animales y en humanos (Fouad y col., 2013, Fig.7).

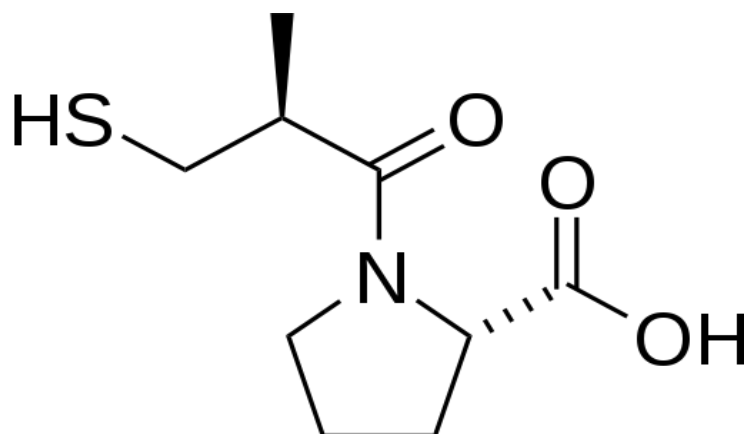


Fig.7 Estructura química del fármaco captopril

El celecoxib es un miembro de la subclase de fármacos conocidos como analgésicos antiinflamatorios no esteroideos(AINE), cuyo efecto resulta de la disminución de la síntesis de prostaglandina (PG) por una inhibición selectiva de la COX-2 (Gong y col., 2012, Fig.8).

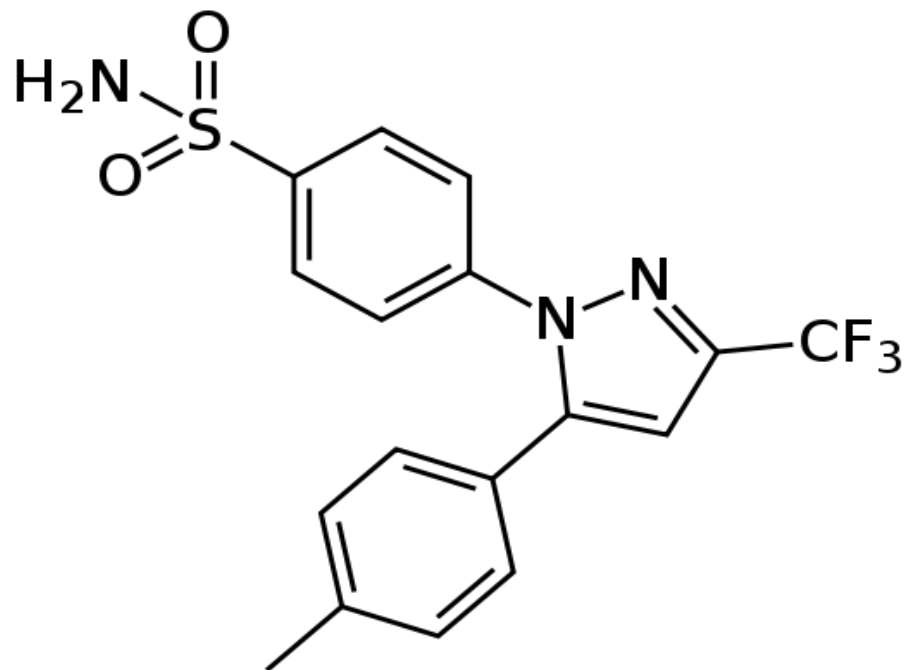


Fig.8 Estructura química del fármaco celecoxib

III. Justificación

Hay diversos estudios que revelan el daño provocado por las COX en animales diabéticos durante etapas cortas, mas no hay estudios donde se haya hecho un curso temporal para ver el comportamiento de éstas enzimas durante la evolución de la DM.

Se conoce desde hace muchos años el crecimiento anormal del riñón poco después de la aparición de la DM en los pacientes diabéticos. Sin embargo, se ha puesto poca atención sobre este fenómeno (Vallon y Komers, 2011).

La identificación temprana de factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad renal podría favorecer el tratamiento oportuno y dirigir una mayor influencia benéfica en la respuesta al tratamiento con medicamentos y dieta.



IV. Hipótesis

La expresión de la enzima COX-1 y COX-2 aumenta con el tiempo de exposición a la hiperglicemia en la corteza renal de ratas con DM tipo 1, este cambio se relaciona con la sobreexpresión de renina y el daño renal durante la diabetes.

V. Objetivos

General:

Evaluar la expresión genética de COX-1 y 2 así como su relación temporal con la expresión de renina en diferentes etapas de la evolución de la DM 1 en la rata.

Particulares:

Determinar si la expresión del mRNA para COX-1, COX-2 y renina se modifican de manera dependiente del tiempo en la corteza renal de ratas con DM tipo 1.

Determinar si la expresión del mRNA de COX-1, COX-2 y renina se modifican con la administración de captopril y celecoxib en la corteza renal de ratas con una semana de DM tipo 1.



VI. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300g de peso que fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Para la primera fase del experimento los animales se dividieron en dos grupos:

Grupo 1

Ratas control: administradas con el vehículo de la STZ, el amortiguador de citratos en una dosis de 1ml/Kg de peso.

Grupo 2

Ratas diabéticas: a las cuales se les aplicó intraperitonealmente, STZ en una dosis de 65mg/Kg de peso. A este grupo se le midió la glucosa en sangre después de 48h para corroborar el establecimiento de la hiperglucemia, con un glucómetro y tiras reactivas Accu-Chek Performa.

Se realizó el sacrificio de los animales a la semana 1, semana 2 y semana 4 de la inducción a la diabetes y se aisló y se perfundió el riñón con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) frio para eliminar restos de sangre.



6.1.1 Tratamientos con captopril y celecoxib

Se formaron dos grupos: un grupo control administrado con amortiguador de citratos y un grupo diabético administrado con STZ; ambos grupos fueron tratados con vehículo (agua potable), o con celecoxib en una dosis de 1mg/kg o con captopril en una dosis de 30mg/kg en el agua de beber durante la primer semana después de inducir la diabetes. Al finalizar los tratamientos se hizo la disección del riñón.

6.1.2 Perfusión renal

Después de anestesiar a los animales con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), se realizó una laparotomía, incidiendo plano por plano hasta llegar a peritoneo y exponer el riñón. El riñón fue descapsulado para eliminar las glándulas suprarrenales y el posible efecto de las hormonas liberadas por ellas. Posteriormente, se disecaron las arterias mesentérica superior, renal derecha y aorta abdominal y mediante 4 suturas se refirió un tramo vascular en cruz: la primera y la segunda suturas se colocaron en la aorta abdominal por arriba y por abajo de la arteria mesentérica y la arteria renal, la tercera sutura en la arteria renal, para sujetar el catéter y la última sutura en la arteria mesentérica proximal a la aorta. Se cateterizó la arteria renal entrando por la arteria mesentérica superior y se extrajo el riñón, el cual se colocó en una cámara para órgano aislado.



El riñón se perfundió con PBS mas 1ml/L de Dietilpirocarbonato (DEPC) y con la ayuda de una bomba peristáltica. La solución PBS se mantuvo fría a un pH 7.4. La velocidad de perfusión renal fue de 10 ml/min y se mantuvo constante hasta que el riñón se limpió completamente de sangre.

6.1.3 Extracción de RNA

Se homogenizaron 50mg de corteza renal con 300µl de Trizol ® reagent, se homogenizó y se agregaron nuevamente 700µl de Trizol hasta llegar a 1ml. Se incubó durante 5min en hielo y se centrifugó a 10000rpm a 4°C durante 10min. Al sobrenadante se le agregaron 200µl de cloroformo (Sigma-ALDRICH) frio y se agitó. Se dejó incubar 3min a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó a 13000rpm a 4°C durante 30 min. Se separó la porción acuosa y se agregaron 300µl de isopropanol (Sigma-ALDRICH) frio, se mezcló por inversión y se dejó precipitar por 10 min. a 4°C. Se centrifugó a 13000rpm a 4°C durante 10min. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se le hizo un lavado al precipitado agregando 1ml de etanol al 80%. Se centrifugó a 7500 rpm a 4°C durante 5 min., se lavó nuevamente, y se desechó el sobrenadante, el precipitado se dejó secar durante 10 min. y se la agregaron 50µl de RNAsecure previamente calentado a 60°C con ayuda de un termociclador hasta disolver por completo el precipitado, el cual después se calentó durante 10 min a una temperatura de 60°C.



6.1.4 Integridad del RNA

Para verificar la integridad del RNA y seguir con el proceso de extracción de mRNA se preparó un gel de agarosa (0.35g) más solución amortiguadora TBE (37ml) y 1.5µl de bromuro de etidio , una vez solidificado se cargaron 2µg de cada una de las muestras, las cuales fueron incubadas a 55°C durante 15min, posteriormente se dejaron correr a 100volts durante 40min, finalmente se reveló el RNA con luz UV para obtener el patrón de bandeo característico del RNA; las bandas 28 s y 18 s y confirmar la integridad del RNA y la ausencia de moléculas de mayor peso molecular , que indicarían contaminación con DNA genómico.

6.1.5 Eliminación de DNA genómico

Una vez que fue comprobada la integridad del RNA. A la solución de RNA se agregan 3µl de amortiguador RT más 1µl de rDNAsa, se incubó a 37°C durante 30min., posteriormente se agregaron 3.3µl de Inactivation reagent (previamente descongelado y agitado por Vortex), se incubó durante 2 min a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente. Por último se centrifuga a 10000rpm durante 2min. y se recupera el sobrenadante. Del sobrenadante se cuantificó la concentración de RNA con la relación 260 y 280nm en un espectrofotómetro. Se evaluó la pureza la cual debió ser mayor a 1.8 para asegurar que no hubiera contaminación por proteínas.



6.1.6 Reverso Transcripcion (RT)

Buffer de reacción 10x..... 5µl (Thermoscientific)

dNTPs..... 4µl (Thermoscientific)

DDT 0.1M..... 1µl (Thermoscientific)

Oligo d(T)18..... 1µl (Thermoscientific)

Inhibidor de RNAsas..... 0.5µl Ribolock (Thermoscientific)

Enzima transcriptasa reversa.....1µl M-MuLV (Thermoscientific)

RNA (2µg).....varia

H₂O DEPC.....varia

Se agregaron los reactivos y se incubaron 1h. a 36°C y 3 min a 4°C.

6.1.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)

A partir del cDNA se usaron oligonucleotidos sintéticos de 21pb que delimitan un fragmento de 130pb diseñados de acuerdo a la secuencia del gen COX-2 de rata. Para COX-1 oligonucleotidos de 21pb que delimitan un fragmento de 108pb. Para renina se utilizaron oligonucleotidos de 20pb que delimitan un fragmento de 211pb y por último se amplificó simultáneamente un fragmento de 106pb del gen β-actina el cual fue usado como control de referencia de expresión endógena. Las secuencias fueron las siguientes:



Tabla 1 Oligonucleótidos y temperaturas de alineación

Gen	Oligo	Tm	Ciclos	Amplicon
β-actina	F: 5'-CGA GTC CGC GTC CACCCG CGA- 3' R:5'-GACGAC GAG CGC AGC GAT ATC -3'	95°C-30 s	40 ciclos	95°C-10 min 58°C-30 s 72°C-30 s
COX-1	F: 5'- GGG AAA CTT AAG TAC CAG GTG - 3' R: 5'- CAT CTG CTT TTC GGG CGG GAC - 3'	95°C-10 min	40 ciclos	95°C- 30 s 54°C-30 s 72°C-30 s
COX-2	F: 5'- CCT TGA ACA CGG ACT TGC TCA-3' R: 5'-TCT CTC TGC TCT GGT CAA TGG -3'	95°C-10 min	40 ciclos	95°-30 s 60°C-30 s 72°C-30 s
renina	F: 5'- TTC TCT CCC AGA GGG TGC TA - 3' R: 5'- CCC TCC TCA CAC AAC AAG GT- 3'	94°C-10 min	40 ciclos	94°C-1 min 64°C-1min 72°C-1min



Cada reacción se realizó por duplicado en el equipo Rotor Gene RG-3000 (CorbettResearch) con las siguientes cantidades:

Master Mix Universal SyBr Green..... 7.5 μ l (Kapa Biosystem)

Primer Forward..... 0.5 μ l

Primer Reversa..... 0.5 μ l

Agua tratada con DEPC..... 5.5 μ l

cDNA..... 1 μ l



VII. Estadística

Los resultados son expresados como la media \pm SE. Para cada grupo. Se utilizó *t* de Student para comparar el grupo diabético y el control, mientras que para determinar si existen diferencias en los grupos con diferentes tratamientos se utilizó ANOVA de una vía, seguido de un análisis TUKEY. Se consideró una diferencia significativa si $p < 0.05$. Estos datos fueron analizados con el programa SigmaPlot versión 11.0.



VIII. Resultados

8.1 Efecto de la diabetes inducida con STZ

Los resultados reflejan el establecimiento de diabetes inducida con la administración de STZ. Se cuantificó la glucemia en los grupos designados como control (administrados con amortiguador de citratos) y en las diabéticas (administradas con STZ). A la semana 1, 2 y 4 se observó un incremento estadísticamente significativo en el nivel de glucosa sanguínea en la animales administrados con STZ comparados con los controles. A la semana 1 el valor de glucemia; para el grupo control fue de 114 ± 5.6 mg/dl, para el grupo de ratas diabéticas fue de 500 ± 64.11 mg/dl $p < 0.001$. A la semana 2 el valor promedio para el grupo control fue 120 ± 3.4 mg/dl, mientras que para el grupo de ratas diabéticas fue 537 ± 46 mg/dl $p < 0.001$. Finalmente, a la semana 4 de manera similar a los grupos anteriores, se encontró un valor de glucemia para el control de 118 ± 2.9 mg/dl así como para el grupo diabético que fue de 516 ± 56 mg/dl (Fig. 9; $p < 0.001$).



Glucemia en ratas Wistar diabéticas inducidas por STZ

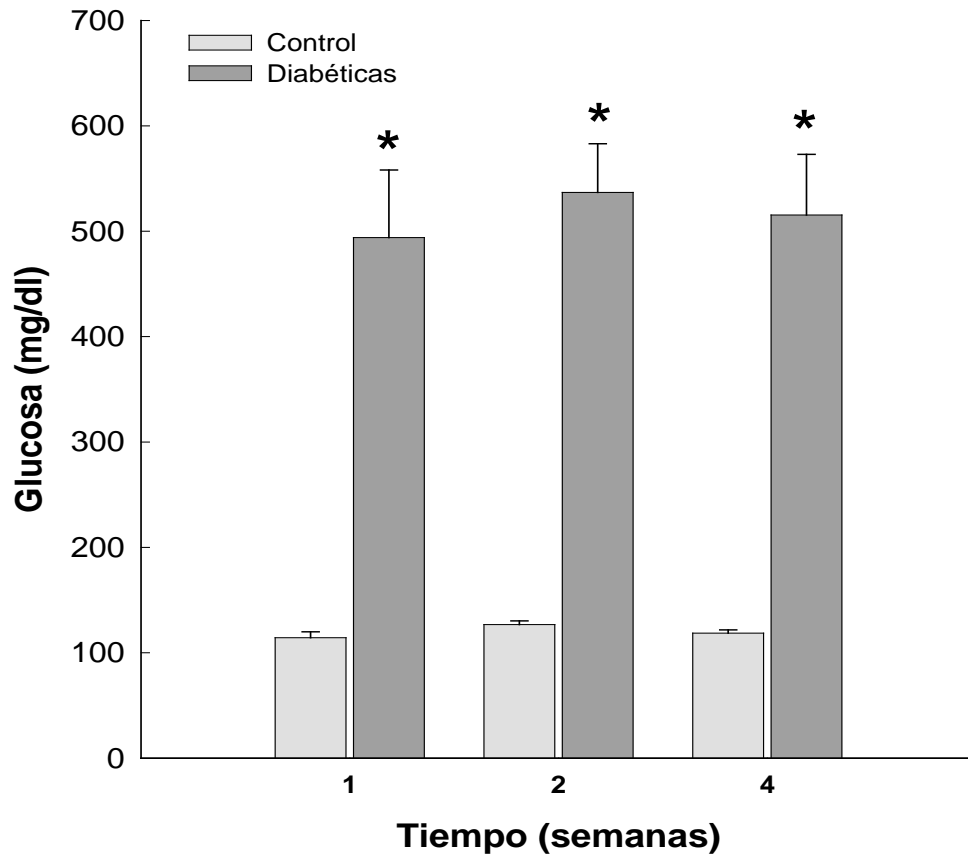


Fig.9 Niveles de glucosa sanguínea de los grupos control y diabéticas. Se midió la glucosa en sangre en ratas control y de 1, 2 y 4 semanas de hiperglicemia. Cada punto representa la media \pm el error estándar, $n=15-19$ por grupo, $*p < 0.001$ vs control.

8.1.1 Índice de masa renal

Se pesaron los riñones de los grupos control y diabéticas de 1, 2 y 4 semanas para calcular la masa renal (peso del riñón/peso de la rata), encontrando un incremento significativo de la masa renal en todos los grupos diabéticos.

El valor de masa renal promedio para el grupo de 1 semana fue: grupo control 0.004 ± 0.0001 g y para el grupo diabético 0.006 ± 0.0005 g, $p < 0.014$. A la segunda semana los valores del grupo control fueron 0.004 ± 0.002 g mientras que para el grupo diabético fue de 0.006 ± 0.0004 g, $p < 0.016$ y por último a las 4 semanas los valores para el grupo control fueron 0.003 ± 0.0002 g, y para el grupo diabético fueron 0.005 ± 0.0003 g, $p < 0.002$ (Fig. 10).



Peso relativo del riñón de ratas diabetizada con STZ

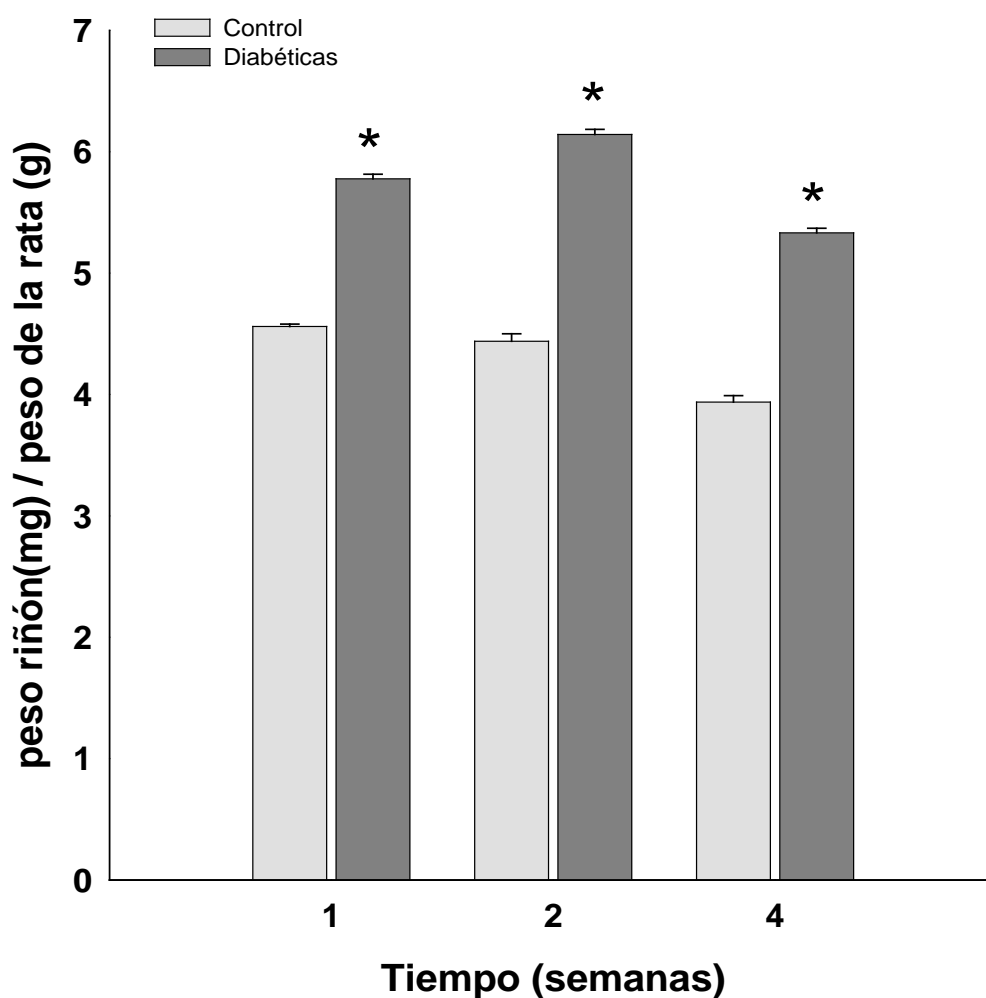


Fig.10 Índice de masa renal de los grupos control y diabéticas. Se pesaron los riñones de ratas control y de 1, 2 y 4 semanas de hiperglicemia. La masa renal es la relación del peso del riñón y el peso corporal. Cada punto representa la media \pm SE, n=16-19 por grupo, *p< 0.001 vs control.

8.1.2 Expresión del mRNA para COX-1 en corteza renal

La hiperglicemia provocó un aumento significativo del mRNA para COX-1 en corteza renal de ratas con 1, 2 y 4 semanas de la inducción a diabetes. A la semana 1 la expresión genética del mRNA en el grupo diabético fue 3.9 ± 0.8 veces más grande, $p < 0.008$ que el control, mientras que para la semana 2 la expresión de mRNA para COX-1 en el grupo diabético se incrementó aún más, siendo 5 ± 1 veces mayor, $p < 0.026$. Finalmente a la cuarta semana de hiperglicemia el valor del grupo diabético fue 3.6 ± 0.6 más elevado, $p < 0.001$ que el control (Fig.11).



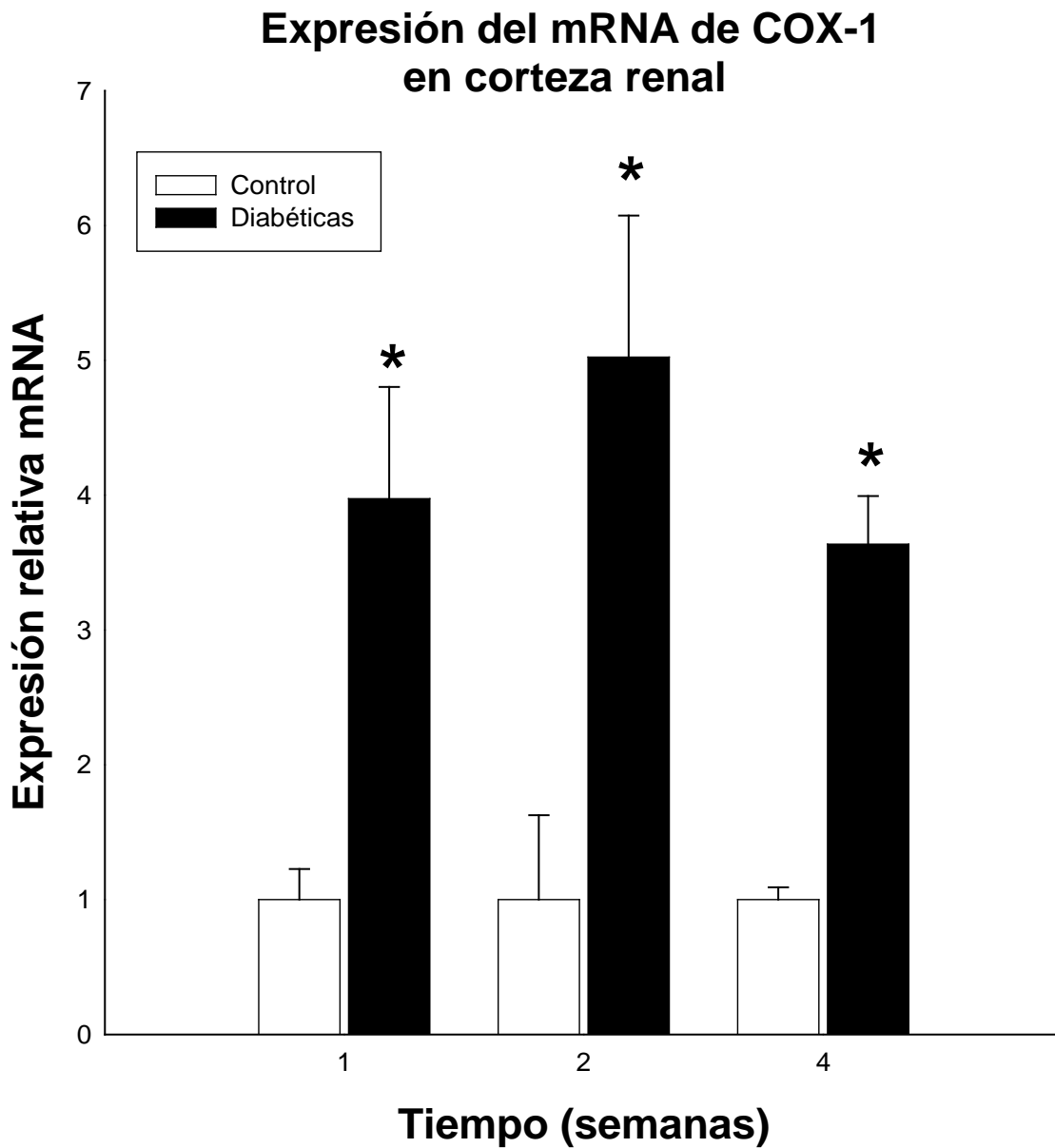


Fig.11 Expresión relativa del mRNA de COX-1 en corteza renal de los grupos control y diabéticas de 1, 2 y 4 semanas de hiperglicemia. Los datos fueron normalizados con la expresión de un gen control (β -actina). Cada punto representa la media \pm SE, $n=20-28$ por grupo, $*p < 0.02$ vs control.

8.1.3 Expresión del mRNA para COX-2 en corteza renal

Semejante a lo que sucede con el mRNA para COX-1, la hiperglicemia aumento significativamente el mRNA para COX-2 en las cortezas renales de ratas con 1, 2 y 4 semanas de diabetes. A la semana 1 el valor del mRNA para COX-2 en el grupo diabético aumento 3.1 ± 0.9 veces, $p < 0.042$ con respecto al control. De la misma manera, a la semana 2 de diabetes el valor del mRNA para COX-2 se incrementó 2.4 ± 0.5 veces, $p < 0.024$ con respecto al grupo control. Finalmente, a las 4 semanas el valor del grupo diabético fue 3.7 ± 1 veces más grande, $p < 0.007$ que el control (Fig.12).



Expresión del mRNA de COX-2 en corteza renal

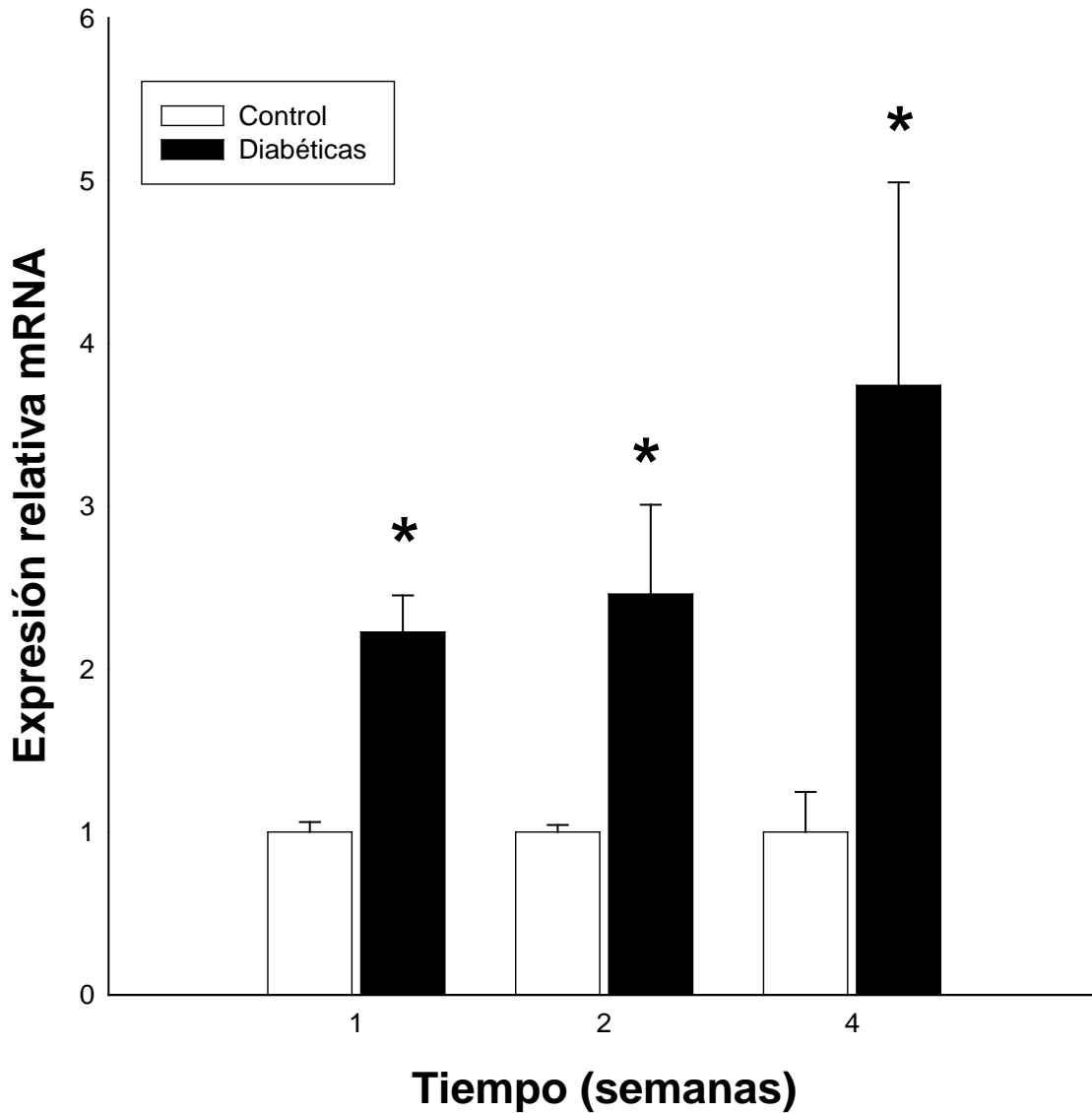


Fig.12 Expresión relativa del mRNA de COX-2 en corteza renal de los grupos control y diabéticas de 1, 2 y 4 semanas de hiperglicemia. Para normalizar los datos se utilizó β -actina. Cada punto representa la media \pm SE n=22-28 por grupo,*p< 0.04 vs control.



8.1.4 Expresión del mRNA para renina

Como podemos observar en la Fig.13, la hiperglicemia produjo un cambio significativo en la expresión del mRNA para renina en la corteza renal en el grupo diabético comparado con el grupo control. A la semana 1 el valor del mRNA para renina en el grupo diabético fue incrementado 7 ± 1.9 veces $p < 0.01$ comparado con el grupo control. En contraste, a la semana 2 el valor del grupo diabético disminuyó a la mitad 0.5 ± 0.1 , $p < 0.005$) del valor observado en el control. Para la semana 4 el valor del grupo diabético fue 2 veces mayor $p < 0.009$ comparado con el control.



Expresión del mRNA de renina en corteza renal

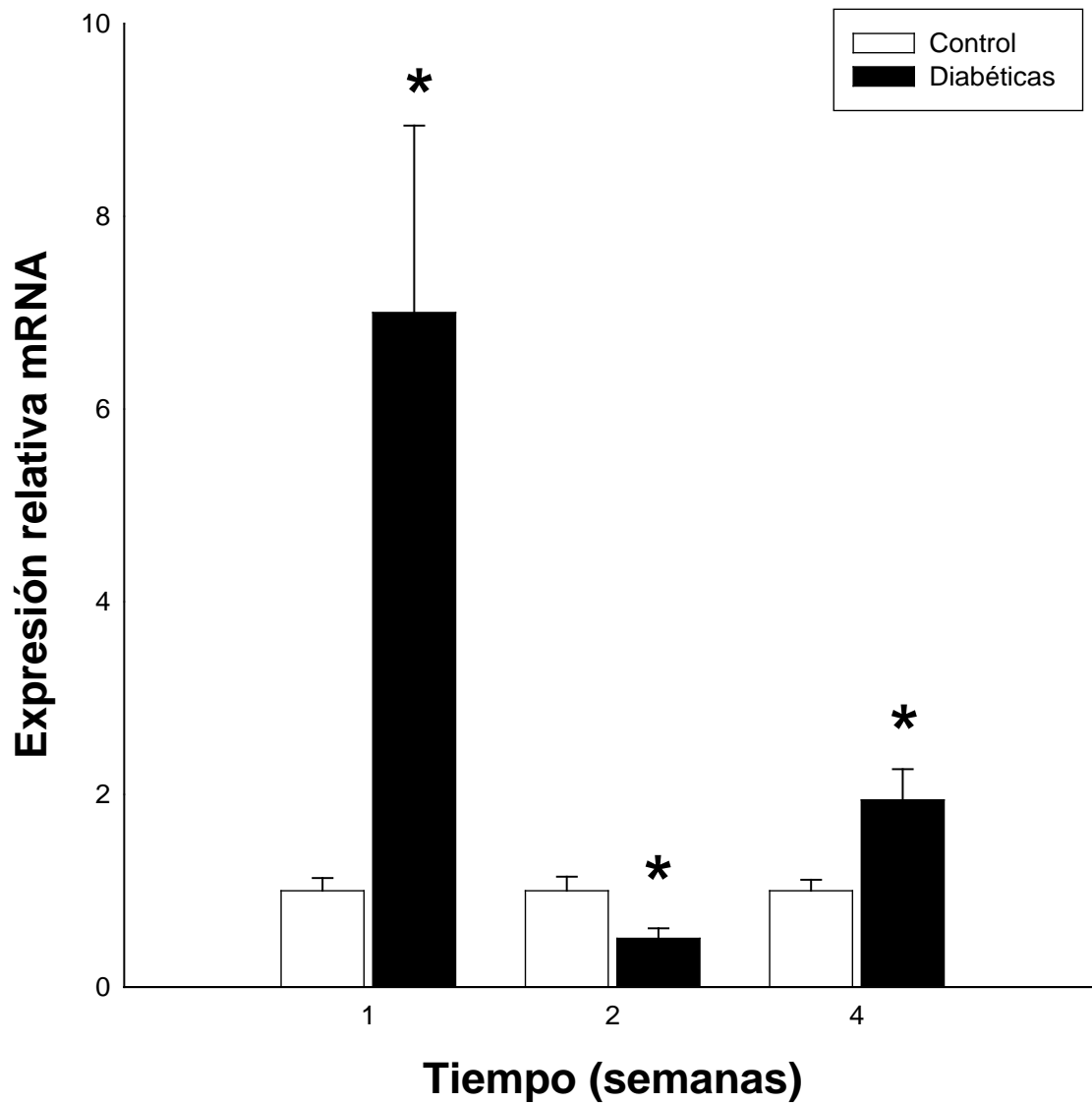


Fig.13 Expresión relativa del mRNA de renina en corteza renal de los grupos control y diabéticas de 1, 2 y 4 semanas de hiperglicemia. Cada punto representa la media \pm SE, n=20-32 por grupo, *p< 0.005 vs control.

8.1.5 Efecto de los tratamientos con celecoxib y captopril en ratas controles y diabéticas

Con base en los resultados anteriores en donde se mostró que la expresión de mRNA para COX-1, COX-2 y renina aumento de manera significativa a la semana de la inducción de la hiperglucemia, se decidió dar tratamiento con celecoxib y captopril durante la primera semana de diabetes.

8.1.6 Efecto de los tratamientos sobre la glucosa sanguínea

La glucosa se midió en sangre de ratas controles y diabéticas observando que los tratamientos no modificaron la glucemia en los diferentes grupos. Las ratas diabéticas sin tratamiento así como las tratadas con celecoxib y captopril mostraron un incremento en los niveles de glucosa comparadas con el grupo control (Fig.14). Los tratamientos con captopril o celecoxib no modificaron los niveles de glucosa en el grupo control ni en el diabético.



Glucemia en ratas Wistar macho tratadas con celecoxib y captopril durante 1 semana

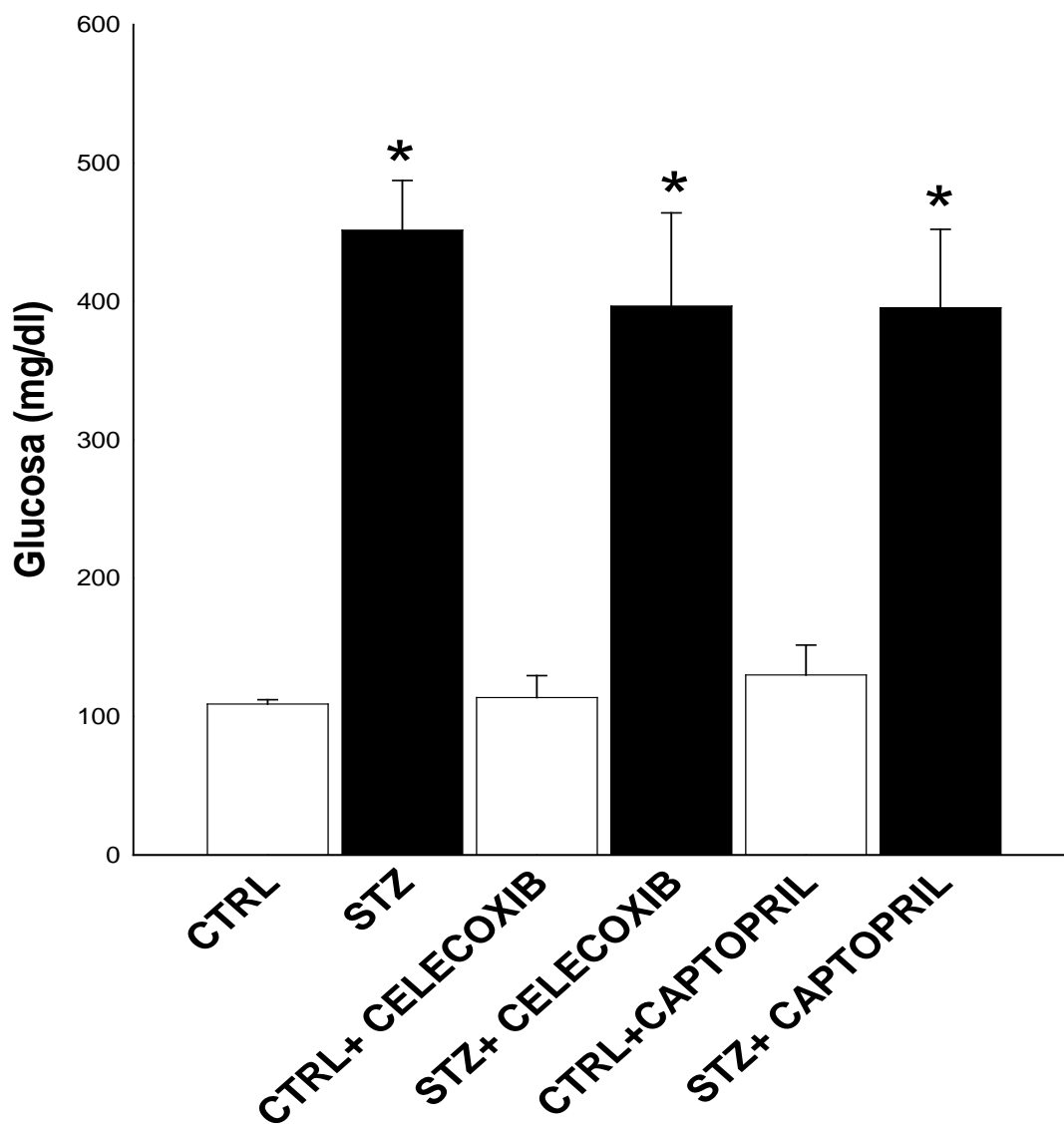


Fig.14 Niveles de glucosa sanguínea en los grupos control y diabéticas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril. Cada punto representa la media \pm SE n=8-12 por grupo, *p< 0.001 vs control.

8.1.7 Efecto de los tratamientos sobre el índice masa renal

Para ver el efecto de los tratamientos sobre el peso del riñón se calculó la masa renal, obteniendo los siguientes resultados: Grupo control 0.0042 ± 0.000 , Grupo diabéticas 0.0058 ± 0.000 , $p < 0.001$, Grupo control + celecoxib 0.004 ± 0.0003 , Grupo diabéticas + celecoxib 0.005 ± 0.0006 , Grupo Control + captopril 0.0045 ± 0.0001 , Grupo Diabéticas + captopril 0.0059 ± 0.0003 . Los tratamientos con captopril y celecoxib no modificaron la masa renal en el grupo control y en el diabético (Fig.15).



Peso relativo del riñon de ratas diabetizadas con STZ

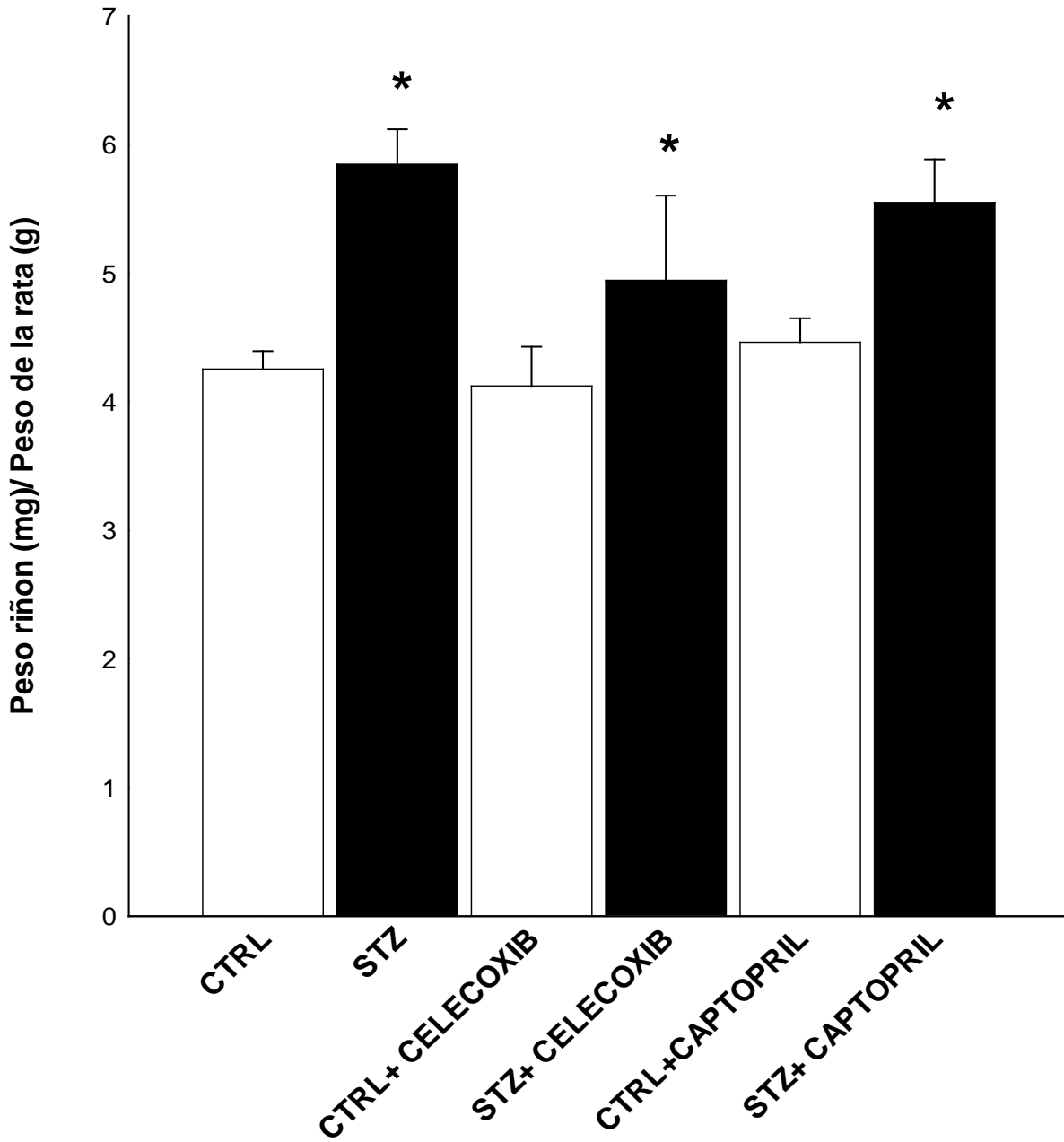


Fig.15 Índice de masa renal de los grupos control y diabéticas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril. Cada punto representa la media \pm el error estándar n=8-12 por grupo, *p< 0.001 vs control.



8.1.8 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de COX-1 en corteza renal

En cuanto a la expresión del mRNA para la COX-1 en corteza renal se observó diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de diabéticos con 1 semana de libre evolución de la hiperglucemia, mostrando una sobreexpresión en el caso del grupo diabético. Por otro lado, en los grupos control y diabéticos tratados con celecoxib así como en aquellos grupos tratados con captopril mostraron una notable disminución de la expresión de la COX-1 pudiendo inferir que los tratamientos ayudaron a disminuir la expresión del mRNA (Fig.16).



Expresión del mRNA de COX-1 en corteza renal

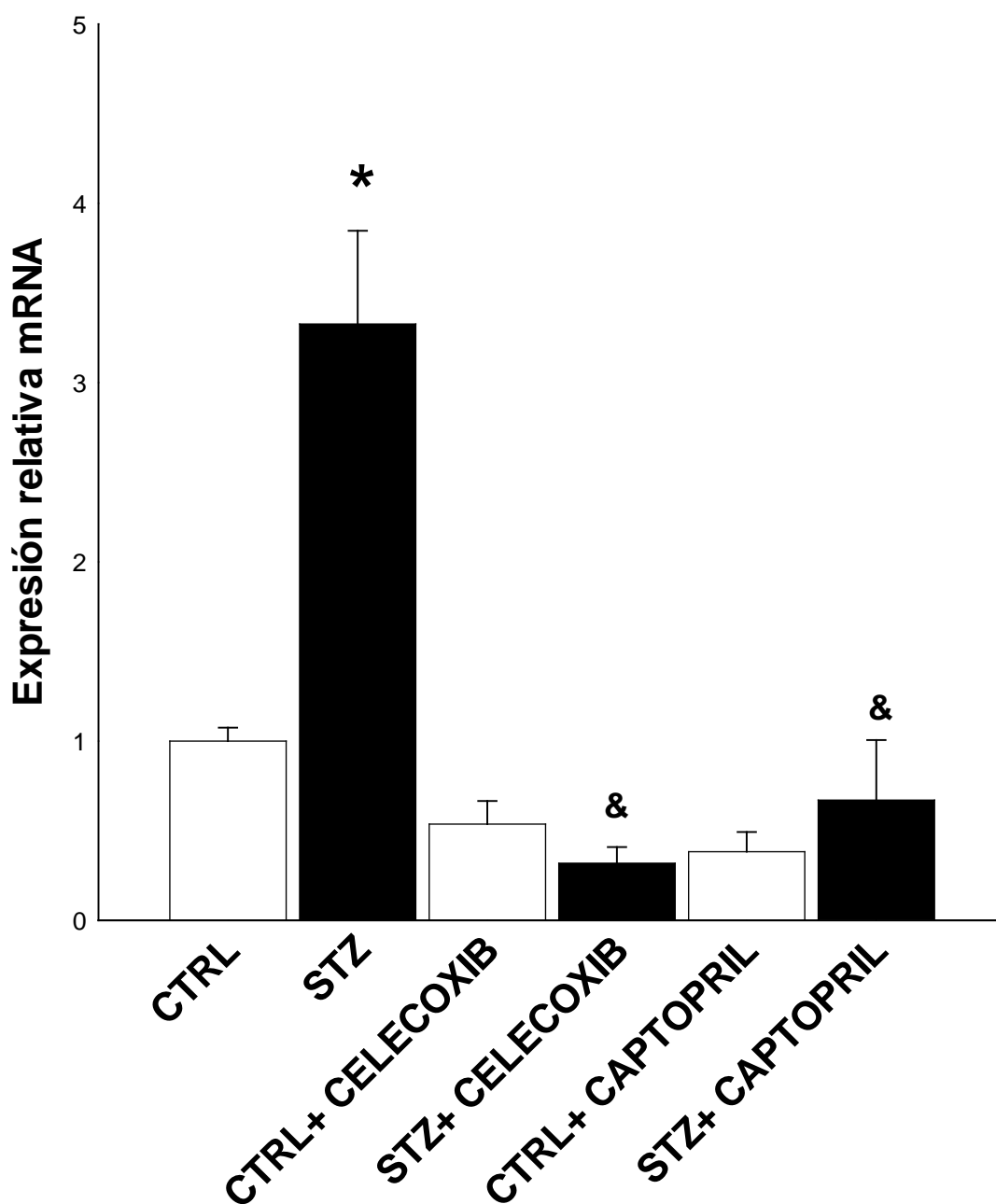


Fig.16 Expresión relativa del mRNA de COX-1 en la corteza renal de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril. Se midió el mRNA de los grupos control, diabéticas; control + tratamiento con celecoxib, diabéticas + tratamiento con celecoxib; control + tratamiento con captopril y diabéticas + tratamiento con captopril, usando como control β -actina. Cada punto representa la media \pm SE n=7-12 por grupo, * p <0.001. vs control, & p <0.005 vs diabéticas.

8.1.9 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de COX-2 en corteza renal

Con relación a la expresión del mRNA de COX-2, se observó una sobreexpresión en el caso del grupo diabético. Por otro lado, en los grupos diabéticos tratados con celecoxib y captopril mostraron una caída muy significativa en la expresión de mRNA para COX-2 con respecto al diabético sin tratamiento. Esta disminución fue menor en los grupos tratados con captopril (Fig.17).



Expresión del mRNA de COX-2 en corteza renal

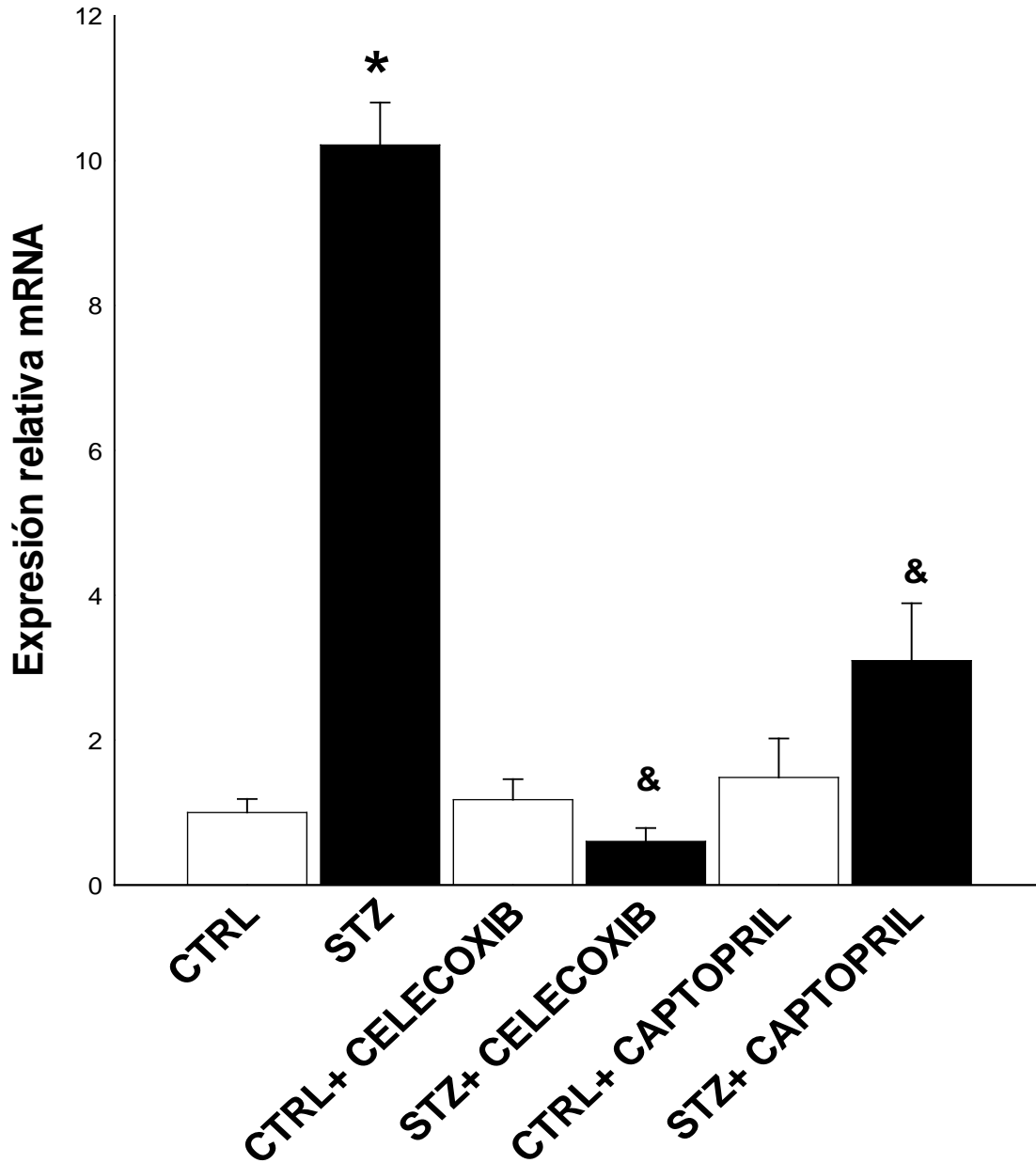


Fig.17 Expresión relativa del mRNA de COX-2 en la corteza renal de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril. Se midió el mRNA de los grupos control, diabéticas; control + tratamiento con celecoxib, diabéticas + tratamiento con celecoxib; control + tratamiento con captopril y diabéticas + tratamiento con captopril, usando como control β -actina. Cada punto representa la media \pm SE n=7-12 por grupo, * $p < 0.001$ vs control, & $p < 0.005$ vs diabéticas.

8.2 Efecto de los tratamientos sobre la expresión del mRNA de renina en corteza renal

En el caso del mRNA para Renina los datos mostraron un comportamiento similar a la COX-2, ya que la expresión de gen de renina se incrementó significativamente en el grupo diabético y el tratamiento con celecoxib y captopril disminuyeron notablemente la expresión de renina en la rata diabética, siendo más importante este efecto en el grupo con celecoxib (Fig.18).



Expresión del mRNA de renina en corteza renal

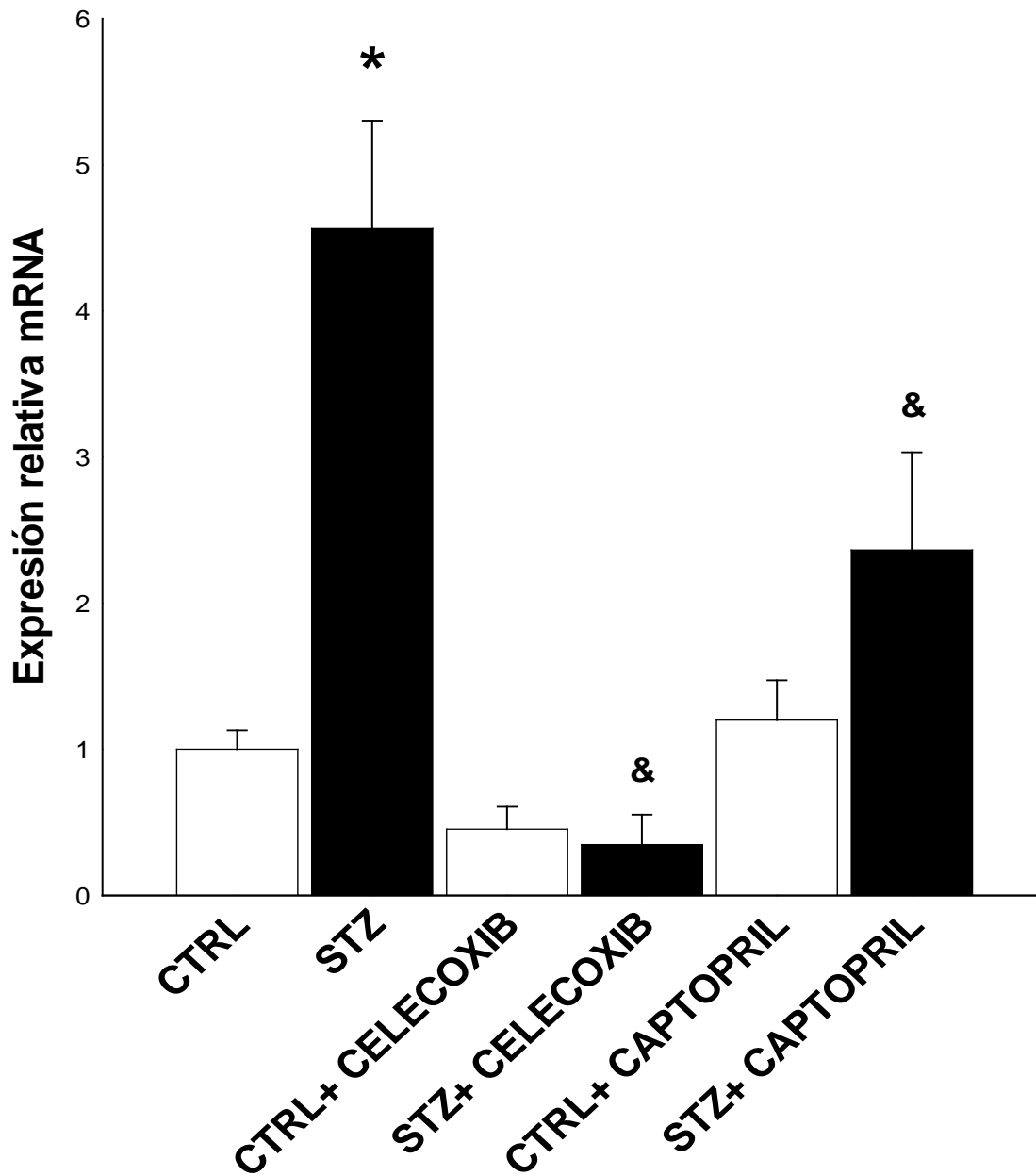


Fig.18 Expresión relativa del mRNA de Renina en la corteza renal de ratas con 1 semana de tratamiento con celecoxib y captopril. Se midió el mRNA de los grupos control, diabéticas; control + tratamiento con celecoxib, diabéticas + tratamiento con celecoxib; control + tratamiento con captopril y diabéticas + tratamiento con captopril, usando como control β -actina. Cada punto representa la media \pm SE n=8-11, *p< 0.001 vs control, &p<0.005 vs diabéticas.

IX. Discusión

En este trabajo se encontró que los riñones de ratas diabéticas fueron dos veces más pesados comparados con los de ratas normales, sugiriendo la presencia de alteraciones estructurales renales a partir de etapas tempranas de la hiperglicemia. Nuestros resultados coinciden con los de Thomson y col., 2001 quienes encontraron que en estadíos tempranos de la diabetes, se produce hipertrofia tubular proximal. Vallon y Thomson en 2012, reportaron que la reabsorción de iones y metabolitos en el túbulo proximal aumenta con la hiperglicemia debido a la una mayor filtración de la glucosa, lo que aumenta la reabsorción de glucosa y Na^+ a través del co-transportador sodio-glucosa. En conjunto, estos resultados sugieren que desde etapas muy tempranas de la diabetes se presentan alteraciones funcionales y estructurales en el riñón por efecto de la hiperglucemia.

En este sentido nosotros encontramos que en la primera semana con hiperglicemia se presentó una sobreexpresión del mRNA para COX-1, COX-2 y renina, indicando que dichas vías enzimáticas podrían estar actuando en conjunto en el desarrollo del daño renal en etapas tempranas de la diabetes. Se ha demostrado que las MAP cinasas regulan la expresión de la COX-2 en respuesta a citocinas o a la activación de factores de crecimiento las cuales son moléculas liberadas en la diabetes mellitus.



La sobreexpresión de la COX-2 en ratas con diabetes, sugiere que se podría estar produciendo una mayor cantidad de prostaglandinas como la prostaciclina y como consecuencia la activación del SRA, que puede ocasionar daños a largo plazo a la microvasculatura del riñón y desencadenar ND.

La sobreexpresión de COX-1 puede ser explicada con el trabajo de Perrone en 2010 donde menciona que bajo condiciones fisiológicas, PGI₂ es el prostanoides que se produce y libera en mayor cantidad por las células endoteliales mediando algunos efectos protectores en la pared vascular incluyendo la relajación y la inhibición de la agregación plaquetaria y su adhesión.

Bajo condiciones patológicas como la diabetes, la cual se asocia con inflamación, se ha visto que la PGI₂ disminuye y aumenta la liberación de sustancias vasoconstrictoras derivadas de las COXs como el TXA₂, provocando un desbalance en la regulación del tono vascular conocido como disfunción endotelial.

Los cambios en la expresión renal de estas enzimas, dependen del tiempo de exposición a la hiperglicemia ya que a la segunda semana disminuye la expresión de renina mientras que ambas COXs se mantienen aumentadas. Por último en la cuarta semana de hiperglicemia, vuelve a aumentar la expresión de ambas COXs así como de renina, sugiriendo que diferentes mecanismos regulan la expresión renal de las COXs y renina en la diabetes mellitus.



Por ejemplo, en el caso de la renina su secreción a partir de las células yuxtaglomerulares está controlada por tres vías: a nivel local por la mácula densa y la adenosina, la primera por un cambio en la reabsorción de NaCl resultando en la transmisión de señales químicas hacia las células yuxtaglomerulares es decir a mayor cantidad de NaCl menor liberación de renina y viceversa; ahora bien, la adenosina al aumentar su actividad por el aumento de NaCl disminuye la liberación de renina y una tercera que funciona en todo el sistema nervioso central y que esta mediada por la liberación de noradrenalina a partir de nervios noradrenergicos renales.

Esta enzima, limitante en la activación del sistema renina angiotensina, y los cambios en su liberación están frecuentemente acompañados por fluctuaciones paralelas de las concentraciones de Ang II circulantes (Castrop, 2013). Es por ello que un aumento en la expresión de la renina ocasiona una mayor liberación de la Ang II y por lo tanto un aumento en los efectos negativos de este autacoide.

En el riñón las prostaglandinas influyen en la excreción de sodio y agua, al alterar el flujo sanguíneo que reciben y por efecto directo en los túbulos renales. Por otro lado la PGE_2 y la PGI_2 aumentan el flujo de sangre por las arterias renales, estimulan la diuresis, la natriuresis y la caliuresis. Por su parte el tromboxano disminuye el paso de sangre por los riñones y la filtración glomerular, también participa en la retroalimentación tubuloglomerular, la PGE_2 inhibe la reabsorción de agua inducida por la hormona antidiurética (ADH), la reabsorción de cloruro en la porción ascendente del asa gruesa de Henle.



Por último las PGs I₂, E₂ y D₂ estimulan la secreción de renina por la corteza renal, por efecto directo en las células yuxtaglomerulares.

Este trabajo se apoya con lo reportado por Komers en 2001, quien menciona que en etapas tempranas de la nefropatía diabética, prostaglandinas vasodilatadoras como la PGE₂ y la prostaciclina (PGI₂) participan en las alteraciones de la hemodinámica renal en humanos con diabetes tipo 1.

Chen y colaboradores, en 2009 también demostraron que los niveles de COX-2 se incrementaron significativamente en ratas diabéticas comparadas con el grupo control y que la cantidad de PGE₂ plasmática se incrementó significativamente en sujetos diabéticos.

Por otra parte, los tratamientos no influyeron en el establecimiento de la diabetes mellitus con STZ al mostrarse un aumento en los niveles de glucosa en sangre de los animales diabéticos.

Muchos estudios han demostrado que la expresión de COX-2 se incrementa durante el daño renal. Durante la ND se han descrito muchos cambios intrarrenales, incluyendo un aumento en la producción de Ang II, hipertensión glomerular e inflamación tubular renal. Muchos de estos mecanismos pueden ser los responsables de la regulación a la alza de la expresión del mRNA de COX-2 (Rios y col., 2012).



De acuerdo a los resultados que se presentaron con los tratamientos, durante una semana, se demostró que hay una relación entre las cicloxigenasa-2 y la activación del sistema renina angiotensina en las primeras etapas de la evolución de la DM ya que al utilizar inhibidores selectivos de la actividad de COX-2 disminuyó el mRNA de renina. De acuerdo con los resultados de Fogo, 2007, la inhibición selectiva de COX-2 disminuye la actividad plasmática de renina en un 65% sugiriendo una interacción de regulación de COX-2 y Ang II en el control de la liberación de renina.

El tratamiento con celecoxib disminuyó la expresión del mRNA tanto de COX-1 como de COX-2, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación negativa de los metabolitos de la COX-2 sobre la expresión de la COX-1 y COX-2. Rimon y col., 2010 hicieron estudios en los cuales demostraron que celecoxib es un inhibidor competitivo reversible, selectivo para COX-2.

Al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con el fármaco captopril, se observó una disminución significativa en el mRNA de COX-1, COX-2 y renina en ratas diabéticas comparadas con su control, sugiriendo que este tratamiento tiene un efecto protector ya que disminuyó la expresión de estas tres enzimas durante etapas tempranas de la evolución de la DM tipo 1 al disminuir los daños provocados por las COXs y Ang II.

Sabemos que esta enzima es responsable de la formación de Ang II la cual puede modular la producción de renina, por la inhibición directa de la expresión de esta enzima (Zhang y col., 2006) así pues, al inhibir a la Ang II, se disminuyen los efectos que provoca, que incluyen diferenciación celular y proliferación, hipertrofia



renal y apoptosis, vasoconstricción y mayor reabsorción tubular renal de sodio y reabsorción de agua, lo que explica los efectos reno protectores en diferentes patologías de este grupo de fármaco.



X. Conclusiones

1.- De acuerdo a los datos obtenidos, el índice de masa renal se ve incrementado por la hiperglicemia a partir de la primera semana de la diabetes mellitus tipo 1, sugiriendo que este parámetro podría ser un marcador temprano de daño a nivel renal.

2.- La hiperglicemia produce la sobreexpresión de COX-1 y COX-2 en corteza renal a partir de la primer semana lo que podría contribuir con el daño a nivel renal provocado por la diabetes mellitus tipo1. La expresión de renina depende del tiempo a la exposición de la hiperglicemia ya que se encontró aumentada o disminuida.

3.- El tratamiento con celecoxib o captopril disminuyeron la expresión para COX-1, COX-2 y renina en el animal diabético, mientras, que en el animal normal los tratamientos no modificaron la expresión del mRNA para estas enzimas.

4.- De acuerdo con los resultados obtenidos con el tratamiento con celecoxib, la COX-2 está relacionada con la activación del sistema renina angiotensina en ratas con una semana de Diabetes mellitus tipo 1.

5.- El tratamiento con captopril previno la sobreexpresión de COX-1, COX-2 y renina en la rata diabética.



XI. Referencias

1. **Aguilar-Salinas, C.A., Velázquez, M.O., Gómez-Pérez, F.J., González, C.A., Esqueda, A.L., Molina, C.V, Rull-Rodrigo, J.A.,Tapia, C. R.** “Characteristics of Patients with Type 2 Diabetes in México”.Results from a large population based nationwide survey. *Diab Care*, 2003, 26: 2021-2026.
2. **Al-Yaarubi, S., Ullah, I., Sharef, S.W., Al Shidhani, A., Al Hanai, S., Al Kalbani, R., Al Jamoodi, S.** “ Demographic and clinical characteristics of type 1 diabetes mellitus in omani children -single center experience”.*Oman Med J.* 2014, 29(2):119-122.
3. **American Diabetes Association.** Nephropathy in diabetes. “Clinical Practice Recommendations”. *Diab Care*, 2004, 27(Suppl 1): S79–S83.
4. **American Diabetes Association.** “Diabetes ADA”. Búsqueda en línea: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/datos-sobre-la-diabetes/?loc=db-es-slabnav>.16.Jun, 2014.
5. **Boron, W.F.,Boulpaep, E.L.** “Medical Physiology”. Elsevier Saunders. 2005, (33): 757 and 773.
6. **Brenner, B.M.** “The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 1 diabetes and nephropathy: the renal study”. *Kidney Int.*2003, 63 (4):505-507.



7. **Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., Wagner, C.** "Physiology of kidney renin". *Physiol Rev.* 2010, 90(2):607-73.
8. **Castrop, H.** "Angiotensin receptor-associated proteins: local modulators of the renin–angiotensin system". *Pflugers Arch.* 2013, 465(1):111-9.
9. **Chawla, T., Sharma, D., Singh, A.** "Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy". *World J Diabetes*, 2010, 5: 141-145.
10. **Chen, S.S., Jenkins, A.J., Majewski, H.** "Elevated plasma prostaglandins and acetylated histone in monocytes in Type 1 diabetes patients". *Diabet Med.* 2009, 26(2):182-186.
11. **Chen, Y.J., Santos, M., Quilley, J.** "Treatment of diabetic rats with a peroxynitrite decomposition catalyst prevents induction of renal COX-2". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011, 300(3):H1125-32.
12. **Cheng, H.F., Harris, R.C.** "Cyclooxygenases, the Kidney, and Hypertension". *Hypertension.* 2004, 3:525-30.
13. **Dixon, D.A., Kaplan, C.D., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M.** "Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region" *J Biol Chem.* 2000, 275(16):11750-7.
14. **Fogo, A.B.** "Mechanisms of progression of Chronic Kidney Disease". *Pediatr Nephrol*, 2007,22:2011-2022.



15. **Fouad, A.A., AlMulhim, A.S., Jresat, I., Morsy, M.A.** "Protective effects of captopril in diabetic rats exposed to ischemia/reperfusion renal injury". *J Pharm Pharmacol.* 2013, (2):243-252.
16. **Forbes, J.M. and Cooper, M.E.** "Mechanisms of diabetic complications." *Physiol Rev*, 2013 93(1): 137.
17. **Forbes, J.M., Fukami, K., Cooper, M.E.** "Diabetic Nephropathy: Where the hemodynamics meets metabolism". *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007, 115(2):69-84.
18. **Ganong, W.F.** "Fisiología médica". *El manual moderno*, 18 ed.2002, Cap 38 pp.795-796.
19. **Giacchetti, G., Sechi, L.A., Rilli, S., Carey, R.M.T.** "The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes". *Endocrinol Metab.* 2005, 16(3):120-6.
20. **Goodman, L.S. y Gilman, J.H.** "Las bases farmacológicas de la Terapéutica". *McGraw-Hill Interamericana.* 11 ed.2006, Cap 30 pp.791.
21. **Gong, L., Thorn, C.F., Bertagnolli, M.M., Grosser, T., Altman, R.B., Klein, T.E.** "Celecoxib Pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics" *Pharma Gen.* 2012, 22(4):310-8.
22. **Harvey, J.N.** "The influence of sex and puberty on the progression of diabetic nephropathy and retinopathy". *Diabet.* 2011, 54(8):1943-5.



23. **Hunter, S.J., Garvey, W.T.** "Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system". American Journal Med, 1998, 105:331-345.
24. **Iñiguez, M.A., Martinez, M. S., Punzón, C., Redondo, J.M., Fresno, M.** "An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes". J. Biol Chem. 2000, 4; 275(31):23627-35.
25. **Jawa, A., Kcomt, J., Fonseca, V.A.** "Diabetic nephropathy and retinopathy". Med Clin North Am. 2004, 88(4):1001-1036.
26. **Jimenez, C.M.E.** "Panorama epidemiológico de enfermedades no transmisibles: obesidad y diabetes". D.G.E. 2013. pp. 10-12.
27. **Kanasaki, K., Taduri, G., Koya, D.** "Diabetic Nephropathy: The role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis". Front Endocrinol. 2013, 4:72.
28. **Kang, Y.J., Mbonye, U.R., DeLong, C.J., Wada, M., Smith, W.L.** "Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation". Prog Lipid Res. 2007, 46(2):108-125.
29. **Karihaloo, A.** "Anti-Fibrosis Therapy and Diabetic Nephropathy". Section of Nephrology. Curr Diab Rep, 2012, pp.1-9.
30. **King, A.J.** "The use of animal models in diabetes research". Br J Pharmacol, 2012, 166: 877-894.



31. **Kobori, H., Kamiyama, M., Harrison-Bernard, L.M., Navar, L.G.** "Cardinal role of intrarenal Renin-Angiotensin System in the pathogenesis of Diabetic Nephropathy". *J Investig Med*, 2013,61: 256-264.
32. **Komers, R., Lindsley, J.N., Oyama, T.T., Schutzer, W.E., Reed, J.F., Mader, S.L. Anderson, S.J.** "Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes". *Clin Invest.* 2001,107(7):889-898.
33. **Komers, R., Lindsley, J.N., Oyama, T.T., Anderson, S.** "Cyclo-oxygenase-2 inhibition attenuates the progression of nephropathy in uninephrectomized diabetic rats". *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 1-2: 36-41.
34. **Lerman, G.I. and Zimmet, P.** "Current Trends in Diabetes". *ArchMed Research*, 2005, (3): 187-307.
35. **Linton, M.F. and Fazio, S.** "Cyclooxygenase-2 and Atherosclerosis". *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13: 497-504.
36. **Nacci, C., Tarquinio, M., De Benedictis, L., Mauro, A., Zigrino, A., Carratù, M.R., Quon, M.J., Montagnani, M.** "Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature". *Endocrinol*, 2008, 2:849-861.
37. **Olivares, R.J.A. y Arellano, P.A.** "Bases moleculares de las acciones de la Insulina". *Rev.de Educ. Bioq.*, 2008,27 (1) 9-18.



38. **Organización Mundial de la Salud.** “OMS diabetes”. Búsqueda en línea: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/. Mayo, 2013.
39. **Parving, H., Mauer M., Ritz, E.** “Diabetic Nephropathy”. In: Brenner BM. *The Kidney*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2007, chap 36.
40. **Perrone, M.G., Scilimati, A., Simone, L., Vitale, P.** “Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be reconsidered”. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 3769-3805.
41. **Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J.** “Farmacología”. España S.L. Elsevier Limited. 6^a ed. 2008. Cap. 13, pp 215.
42. **Rimon, G., Sidhu, R.S., Lauver, D.A., Lee, J.Y., Sharma, N.P., Yuan, C., Frieler, R.A., Trievel, R.C., Lucchesi, B.R., Smith, W.L.** “Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1”. *Proc Natl Acad Sci, U S A*. 2010, 5; 107(1):28-33.
43. **Rios, A., Vargas-Robles, H., Gámez-Méndez, A.M., Escalante, B.** “Cyclooxygenase-2 and Kidney Failure”. *Prostaglandins other Lipid Mediators*, 2012, pp.86-90.
44. **Rossing, P.** “Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history”, *Curr. Diab. Rep.* 6, 2006, pp. 479–483.
45. **Shlipak, M.** “Diabetic Nephropathy”. *Clin Evid (Online)*. 2009, pii: 0606.
46. **Smith, W.L.** “The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action”. *Biochem, J*, 1989, 259: 315-324.



47. **Thomson, S.C., Deng, A., Bao, D., Satriano, J., Blantz, R.C., Vallon, V.** “Ornithine decarboxylase kidney size , and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes”. *J Clin Invest.* 2001, 107(2):217-24.
48. **Vallon, V. and Komers, R.** “Pathophysiology of the Diabetic Kidney”. *American Physiological Society. Compr Physiol*, 2011,1:1175-1232.
49. **Vallon, V., Thomson, S.C.** “Renal Function in Diabetic Disease Models: The tubular system in the pathophysiology of the Diabetic Kidney”. *Annu. Rev. Physiol*, 2012,74:351–75.
50. **Van Buren, P.N, Toto, R.D.** “The pathogenesis and management of hypertension in diabetic kidney disease”. *Med Clin North Am.* 2013,97(1):31-51.
51. **Vazquez, C.B., Rangel, V.J., Segura, C.D., Lopez, S.P., Ibarra, B.M., Amato, D.** “Effect of cyclooxygenase-2 blockade on renal hypertrophy development during early diabetes mellitus”. *Pharmacol & Pharma.* 2013,4:288-295.
52. **Vila-del Sol, V., Fresno, M.J.** “Involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages”. *Immunol.* 2005, 174(5):2825-33.
53. **Yar, A.S., Menevse, S., Alp, E., Helvacioğlu, F., Take, G.** “The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels”. *Mol Biol Rep*, 2010,37:2323–2331.



54. **Wang, F., Lu, X., Peng, K., Zhou, L., Li, C., Wang, W., Yu, X., Kohan, D.E., Zhou, S.F., Yang, T.** "COX-2 Mediates Angiotensin II-Induced (Pro)Renin Receptor Expression in the Rat Renal Medulla". *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014, pp.16.
55. **Wong, W.T., Tian, X.Y, Huang, Y.** "Endothelial Dysfunction in Diabetes and Hypertension:cross talk in RAS,BMP4,and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids".*J Cardiovas Pharmacol.* 2013,61:91-92.
56. **Zhang, M.Z., Yao, B., Cheng, H.F., Wang, S.W., Inagami, T., Harris, R.C.** "Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT (1) and AT (2) receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(43):16045-50.

