



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PARTICIPACIÓN DE LAS SINTASAS DE
PROSTACICLINA Y ÓXIDO NÍTRICO EN LA
FUNCIÓN VASCULAR RENAL EN RATAS CON
DIABETES EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A :**

CYNTHIA GISELA CARRANZA REYES



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular (Lab-3), de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Maximiliano Ibarra Barajas y la asesoría de la Dr. Patricia Castro Moreno.

Al programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica PAPPIT (IN221615) otorgado al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas. UBIMED. FESI-UNAM.

A mis sinodales

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dr. Patricia Castro Moreno

M. en C. Carmen Guadalupe Mondragón Huerta

ÍNDICE

I.ÍNDICE DE FIGURAS

II.ÍNDICE DE TABLAS

III. ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
Definición de la diabetes mellitus	3
Clasificación	3
Complicaciones vasculares de la diabetes	4
Regulación endotelial del tono vascular renal.....	6
Vía del ácido araquidónico	6
Ciclooxigenasas en el riñón.....	8
Prostaglandinas en el riñón	9
Prostaciclina.....	11
Sintasa de prostaciclina.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVO GENERAL	17
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODO	18
Animales	18
Inducción de la diabetes experimental.....	18
Registro de la presión de perfusión del riñón en cámara de órgano aislado	18
Inmunodetección de PGI ₂ en corteza de riñón (Western Blot).....	20
7. RESULTADOS	21
Liberación basal de la PGI ₂ en el tono vascular renal de ratas diabéticas y normoglucémicas.....	23
Participación del NO en el tono vascular basal en riñones aislados de ratas diabéticas.	25

Efecto de la inhibición simultanea de la liberación basal de la PGI ₂ y NO en el tono vascular renal de ratas normales y diabéticas.....	25
Efecto del cloruro de potasio (KCl 80 mM) en riñones aislados de ratas diabéticas. .	27
Curva concentración-respuesta a fenilefrina en riñones perfundidos aislados	27
Participación de las ciclooxigenasas en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.	28
Participación de la PGIS en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.....	29
Participación de las NOS en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.....	30
Participación de la PGI ₂ y NO en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.....	31
8. DISCUSIÓN.....	33
NO y PGI ₂ por la estimulación con agonistas.....	35
Efecto del KCl en riñones aislados de ratas diabéticas	36
Reactividad vascular en el tono vascular renal de ratas diabéticas.....	37
Efecto de la indometacina sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.....	38
Efecto de la tranilcipromina (2-PCPA) en el tono vascular renal en ratas con diabetes.	39
Efecto del L-NAME sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.....	40
Participación del NO en el efecto del 2-PCPA sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.	41
9. CONCLUSIONES	42
10. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS I

Figura 1. Mecanismos patológicos de la hiperglicemia y sustancias derivadas del endotelio vascular	5
Figura 2. Prostanoides derivados de la ruta de la ciclooxigenasa	8
Figura 3. Distribución de las isoformas de la COX en la nefrona	9

Figura 4. Diversas opciones de señalización de PGI ₂ en el riñón	12
Figura 6. Disección y sitio de canalización del riñón derecho.....	18
Figura 5. Rata Wistar macho anestesiada	18
Figura 7. Riñón derecho y aparato de órgano aislado tipo Langendorf	19
Figura 8. Registro de la respuesta a fenilefrina en la vasculatura renal en presencia de los respectivos inhibidores.	19
Figura 9. Índice de masa renal de ratas Wistar del grupo control y diabético de 1 y 4 semanas de tratamiento	23
Figura 10. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas del grupo control y diabético en 1 semana de tratamiento.....	24
Figura 11. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas del grupo control y diabético en 4 semanas de tratamiento.....	24
Figura 12. Efecto de la inhibición de las sintasas de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas del grupo control y diabético en 4 semanas de tratamiento	25
Figura 13. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas del grupo control y diabético en 1 semana de tratamiento	26
Figura 14. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y sintasa de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas del grupo control y diabético en 4 semanas de tratamiento	26
Figura 15. Efecto del KCl 80 Mm en el riñón perfundido aislado de ratas de 1y 4 semanas de diabetes	27
Figura 16. Curva concentración respuesta a la fenilefrina en riñones aislados de ratas Wistar en condiciones normoglucémicas y diabéticas en 1 semana	28
Figura 17. Efecto de la inhibición de las COX's sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas de 1 semana de evolución, del grupo normoglucémico y diabético	29
Figura 18. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 1 semana evolución	30
Figura 19. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución	30

Figura 20. Efecto de la inhibición de las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución	31
Figura 21. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 1 semana evolución	31
Figura 22. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución	32
Figura 23. Expresión de la PGIS a nivel de proteína en corteza renal del grupo control y diabético de 1 y 4 semanas	33

ÍNDICE DE TABLAS II

Tabla 1. Valores de peso y glucosa de ratas normoglucémicas y diabéticas después de 1 y 4 semanas de evolución	22
Tabla 2. Peso del riñón de ratas diabéticas con 1 y 4 semanas de evolución	22

ABREVIATURAS III

AGES	Productos finales de glicación avanzada (por sus siglas en inglés)
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CE	Células endoteliales
CLM	cadena ligera de la miosina
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CYP450	Citocromo monooxigenasa P450
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
EET	epoxieicosatrienoico
HETE	Hidroieicosatetraenoicos
IP3	Inositol trifosfato
LO	Lipooxigenasa
LT	Leucotrienos
NO	Óxido nítrico
PG	Prostaglandina

PGD₂ Prostaglandina D₂
PGDS Sintasa de prostagladina D₂
PGE₂, Postaglandina E₂
PGES Sintasa de prostaglandina E₂
PGF_{2α} Prostaglandina F_{2α}
PGFS Sintasa de prostaglandina F_{2α}
PGG₂ Prostaglandina G₂
PGH₂ Prostaglandina H₂
PGI₂ Prostaciclina
PGIS Sintasa de prostaciclina
PIP2 Fosfatidilinositol difosfato
PKA Proteína cinasa A
PKC Proteina cinasa C
PLA2 fosfolipasa A₂
PPARβ/δ Receptor activado por el proliferador de peroxisomas beta/delta (por sus siglas en inglés)
PPARγ Receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (por sus siglas en inglés)
ROOC Canal de calcio operado por receptor (por sus siglas en inglés)
ROS Especies reactivas oxigeno (por sus siglas en inglés)
RS Retículo sarcoplasmático
TFG Tasa de filtración glomerular
TGF-β Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α Factor de necrosis tumoral alfa
TxA₂ Tromboxano A₂
TXAS Sintasa de tromboxano A₂
VOOC Canal de calcio operado por voltaje

RESUMEN

La diabetes es una enfermedad importante debido a que afecta a millones de personas en el mundo. Entre las complicaciones asociadas a esta enfermedad, las de tipo vascular son de gran relevancia. Durante el desarrollo de la diabetes se presentan alteraciones en la síntesis de sustancias vasoactivas como la prostaciclina y el óxido nítrico, que contribuyen al daño en diferentes órganos, entre los más importantes se encuentra el riñón.

La prostaciclina (PGI_2) está implicada en la evolución de las complicaciones vasculares de la diabetes debido a que el progreso de la enfermedad deteriora la síntesis de vasodilatadores y favorece la producción de vasoconstrictores contribuyendo al daño renal, por lo tanto, resulta de interés estudiar la participación de las sintasas de prostaciclina y óxido nítrico en la regulación del tono vascular renal en un modelo de diabetes experimental. En este estudio se utilizó un modelo de diabetes experimental en ratas Wistar macho, a las cuales se les indujo diabetes mediante la administración con estreptozotocina (STZ), después de 1 y 4 semanas de evolución de la enfermedad, se aisló y perfundió el riñón derecho, y se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina, en ausencia y presencia de indometacina inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, (COX), L-NAME inhibidor no selectivo de las sintasas de óxido nítrico, (NOS) y 2-PCPA o tranilcipromina inhibidor selectivo de la sintasa de prostaciclina (PGIS). Se realizó la cuantificación de la proteína PGIS mediante la técnica de Western Blot.

Las ratas diabéticas de 1 y 4 semanas de evolución de la enfermedad presentaron glucosa sanguínea mayor a 300 mg/dL. El índice de masa renal (peso del riñón/peso corporal) fue significativamente mayor en ratas diabéticas, lo que sugiere hipertrofia renal. La estimulación con fenilefrina provocó aumento de la presión de perfusión (p.p) renal en ratas normales y diabéticas, pero a la semana de evolución de la enfermedad la respuesta a fenilefrina fue mayor en el animal diabético, mientras a las 4 semanas no se observó cambio. La indometacina no modificó el efecto vasopresor de fenilefrina en riñones de ratas diabéticas de 1 semana. En los dos grupos de ratas, el 2-PCPA un inhibidor de la PGIS incrementó la p.p basal, indicando que la liberación basal de prostaciclina regula tono vascular renal. De manera interesante, el efecto 2-PCPA fue menor en las ratas de 4 semanas de evolución lo que sugiere que la liberación basal de prostaciclina se reduce con el tiempo de evolución de la enfermedad. En contraste, el 2-PCPA bloqueó el estímulo contráctil de la fenilefrina principalmente en ratas diabéticas. El L-NAME también

incrementó el tono basal en ambos grupos, y la inhibición de la NOS no modificó la respuesta de fenilefrina. La expresión de la PGIS fue mayor en ratas diabéticas de 1 semana de evolución de la enfermedad, mientras que a las 4 semanas se observó una menor expresión de la proteína. Estos datos sugieren que en etapas tempranas de la diabetes aumenta la reactividad vascular renal a fenilefrina, donde no parece estar participando las COX. Existe asociación entre la expresión de la PGIS y liberación de prostaciclina basal ya que ambas disminuyeron con el tiempo de evolución de la diabetes.

1. INTRODUCCIÓN

Definición de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, que se caracteriza por el aumento de glucosa en sangre debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina. El mecanismo por el cual la acción de la insulina es deficiente incluye una disminución de la sensibilidad a la insulina en los principales tejidos blanco como el hepático, el muscular, el adiposo, el cartilaginoso y el óseo sobre los que actúa y una secreción insuficiente de insulina ya sea absoluta o relativa y (Seino et al., 2010).

La característica común para el desarrollo de diabetes es la disminución de la masa funcional de las células β pancreáticas que resulta en la incapacidad de proporcionar una cantidad adecuada de la insulina a las células blanco. La deficiencia en la acción de la insulina conduce a anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Seino et al., 2010) lo que se ha asociado con daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos (ADA, 2010).

Cuando se considera la morbilidad, la mortalidad y el costo de atención médica, la carga de la epidemia de diabetes se hace evidente en todo el mundo. La prevalencia de la diabetes se estimó en 171 millones en 2000, aumentando a 382 millones en 2013 y se proyecta que llegará a 592 millones para el año 2035 (Lim, 2014).

Clasificación

Diabetes tipo 1: Se genera por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas a través de la respuesta inflamatoria mediada por células T (insulitis), así como una respuesta humoral por células B que conduce a una deficiencia absoluta de insulina (Devendra et al., 2004).

Diabetes tipo 2: Se caracteriza por la insensibilidad a la insulina como resultado de la resistencia, la disminución de la producción y la eventual falla de las células β pancreáticas (Olokoba et al., 2012). Se desarrolla en asociación con factores de estilo de vida y factores genéticos (Ripsin et al., 2009). Esta forma de diabetes, representa entre el 90 y el 95% de las personas con esta enfermedad a nivel mundial (ADA, 2010).

Diabetes mellitus gestacional: Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se presenta durante el embarazo y se asocia con un aumento de la morbilidad materno-fetal, así como con complicaciones a largo plazo en las madres y los hijos (Kautzky-Willer *et al.*, 2016).

Otros tipos de diabetes: En este grupo se han identificado varias formas de diabetes asociadas con defectos genéticos de la célula β pancreática, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas, endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o químicos, otros síndromes genéticos que se pueden asociar a diabetes e infecciones (ADA, 2010).

Complicaciones vasculares de la diabetes

Las complicaciones vasculares de la diabetes se encuentran entre las manifestaciones más graves de la enfermedad. Las alteraciones en la vasculatura asociadas a esta patología incluyen cambios anatómicos, estructurales y funcionales que conducen a la disfunción multiorgánica (Rahman *et al.*, 2007). Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican tradicionalmente como macrovasculares que incluyen enfermedad de las arterias coronarias, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica y aterosclerosis, y las complicaciones microvasculares que incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía. En las primeras están involucrados los vasos sanguíneos grandes, como las arterias y las venas y en las últimas predominan los pequeños vasos, como las arteriolas, los capilares y las vénulas (Cade, 2008).

La enfermedad microvascular tiende a ocurrir predominantemente en tejidos donde la captación de glucosa es independiente de la actividad de la insulina, por ejemplo, riñón, retina y endotelio vascular (Vithian y Hurel, 2010). La DM se asocia con alteraciones funcionales y estructurales en el riñón, esta enfermedad afecta a todos los tipos de células de este órgano incluidas las células endoteliales, las células tubulointersticiales, los podocitos y las células mesangiales (Maezawa *et al.*, 2015).

La diabetes contribuye a la activación de vías moleculares patológicas bien reconocidas que contribuyen al daño vascular y por consiguiente al daño renal. La producción de productos finales de glicación avanzada (AGES) activa las vías del polirol y de hexosamina para estimular la formación de la proteína cinasa C (Vallon y Komers, 2011). La sobreproducción mitocondrial de superóxido en los vasos sanguíneos como se muestra

en la Figura 1 agrava el estrés oxidativo y promueve la inflamación y la fibrosis, que inducen lesiones funcionales y estructurales en el riñón (Nishikawa *et al.*, 2000). El desencadenante por el cual la alta concentración de glucosa altera la función vascular es el desequilibrio entre la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los AGES que conducen a una disfunción endotelial (DE) (Paneni *et al.*, 2013).

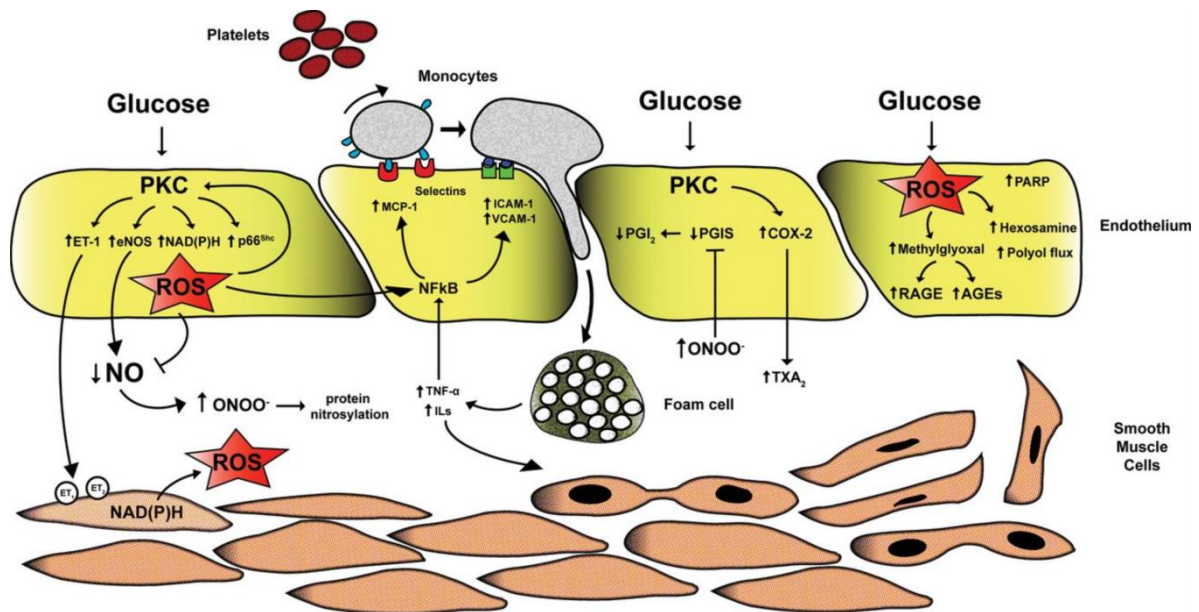


Figura 1. Mecanismos patológicos de la hiperglicemia y sustancias derivadas del endotelio vascular. En la figura se describe la vía de acción de las altas concentraciones de glucosa desde la unión a su receptor en el endotelio vascular (amarillo) y los productos finales que interactúan con las células del músculo liso (café).

La disfunción endotelial promueve una vasopermeabilidad desequilibrada, se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo y una disponibilidad reducida de NO que favorece la vasoconstricción, la agregación plaquetaria, la proliferación de células musculares lisas, una expresión elevada de factores proinflamatorios y protrombóticos como se muestra en la figura 1 que conducen a una vasoreactividad anormal (Zardi *et al.*, 2005).

Tono vascular renal

El tono vascular renal es un regulador fundamental de la perfusión tisular, está relacionado con el estado basal de apertura o cierre de los vasos de resistencia (arteriolas) y vasos de capacitancia (venas). El tono arteriolar está controlado por una variedad de mecanismos que incluyen el sistema nervioso autónomo simpático, factores neurohormonales endocrinos y mecanismos locales. El efector final del tono

vascular es el aparato contráctil de las células del músculo liso, la concentración de Ca^{2+} citoplasmático regula la contracción de las células y tejidos del músculo liso (Lamas y Rodríguez-Puyol, 2012).

Regulación endotelial del tono vascular renal

Las células endoteliales (CE) son reguladores esenciales del tono vascular. El endotelio es una monocapa de células que recubre todo el sistema vascular, tiene un papel crítico en la comunicación entre los componentes de la sangre y la pared vascular, esto implica que participa en procesos esenciales relacionados con la vasomoción, la agregación plaquetaria y la inflamación (Sandoo et al., 2010).

Estas células se ubican en la íntima, que es el revestimiento interno de los vasos sanguíneos (Sandoo et al., 2010) el endotelio renal muestra características particulares dependiendo de la ubicación en el sistema vascular, las posibles diferencias entre las células endoteliales renales probablemente estén relacionadas con la interacción con células circundantes como los podocitos, las células mesangiales y la matriz extracelular glomerular (Lamas y Rodríguez-Puyol, 2012).

Las CE generan factores como el óxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado del endotelio con efectos vasodilatadores mientras que la endotelina 1, angiotensina II y las ROS ejercen efectos vasoconstrictores, que regulan acciones directas en la capa de músculo liso regulando el estado contráctil al afectar finalmente las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Lamas y Rodríguez-Puyol, 2012). Como un importante regulador de la homeostasis vascular, el endotelio mantiene el equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción, el desequilibrio entre los factores vasoactivos conduce a una DE (Sena et al., 2013). En el riñón, la liberación local de estos mediadores endoteliales, junto con la presencia de células endoteliales especializadas en el glomérulo, contribuyen a regular el flujo sanguíneo renal, la filtración glomerular y la función tubular que están íntimamente relacionadas con el balance de sodio (Lamas y Rodríguez-Puyol, 2012).

Vía del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (AA) es el precursor de la síntesis de lípidos bioactivos, a través de tres vías enzimáticas principales: ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LO) y

monooxigenasa del citocromo P450 (CYP450). En conjunto, los mediadores derivados del ácido araquidónico se llaman eicosanoides (en referencia a ácidos grasos de 20 carbonos). Los eicosanoides incluyen los prostanooides derivados de la ruta de la COX, los leucotrienos de la ruta de LO, los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) de la ruta de la monooxigenasa P450 (Hao y Breyer, 2007).

Los prostanooides son un grupo de mediadores lipídicos que surgen del metabolismo enzimático del ácido araquidónico, que se libera a partir de fosfolípidos de la membrana por la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) en respuesta a diversos estímulos fisiológicos y patológicos. Las COX's primero convierten el ácido araquidónico en prostaglandina G₂ (PGG₂) a través de la actividad ciclooxygenasa, y luego la PGG₂ inestable se convierte en prostaglandina H₂ (PGH₂) por la actividad peroxidasa de las COX's. PGH₂ se metaboliza posteriormente a prostanooides biológicamente activos y más estables como prostaglandina E₂ (PGE₂) prostaciclina (PGI₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂) y tromboxano A₂ (TxA₂), por la acción de sintasas específicas que incluyen sintasa de prostaglandina E₂ (PGES), sintasa de prostaciclina (PGIS), sintasa de prostaglandina F_{2α} (PGFS), sintasa de prostaglandina D₂ (PGDS) y la sintasa de tromboxano A₂ (TXAS) Figura 2 (Hao y Breyer, 2008).

Existen 2 isoformas de la enzima COX, ciclooxygenasa 1 (COX-1) y ciclooxygenasa 2 (COX-2), estas enzimas tienen una masa molecular comparable de 71 y 73 kDa respectivamente, pero su expresión y distribución son diferentes. La COX-1 se expresa de forma constitutiva, manteniendo las funciones fisiológicas normales. La COX-2 es una enzima inducible, que se regula a partir de diferentes estímulos inflamatorios, mitogénicos y protrombóticos (Nørregaard et al., 2015).

Los prostanooides formados se liberan fuera de las células inmediatamente después de la síntesis. Cada metabolito interactúa con su receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteína G, los receptores prostanooides se clasifican en cinco subtipos entre los que se incluye el receptor de prostaglandina D₂ (DP), el receptor de prostaglandina E₂ (EP), receptor de prostaglandina F_{2α} (FP), receptor de prostaciclina (IP) y el receptor de tromboxano A₂ (TP) (Hao y Breyer, 2008), además de activar a su receptor específico, se sabe que las PGs y el tromboxano pueden interactuar con receptores nucleares como el receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPARγ) y beta/delta (PPARβ/δ).

PGI₂ y TXA₂ son químicamente inestables, tienen una vida media de 30 segundos a unos pocos minutos de ser sintetizados, se degradan rápidamente a productos inactivos en condiciones fisiológicas, otras PGs son químicamente estables, se metabolizan rápidamente y se inactivan durante un solo paso a través del pulmón (Narumiya y FitzGerald, 2001). Por lo tanto, esto limita su efecto a la proximidad inmediata de su sitio sintético, lo que explica su función autocrina o paracrina. Los efectos biológicos de los prostanoideos derivados de la COX son diversos y complejos, dependiendo de que prostanoides se produce y el receptor disponible (Hao y Breyer, 2008).

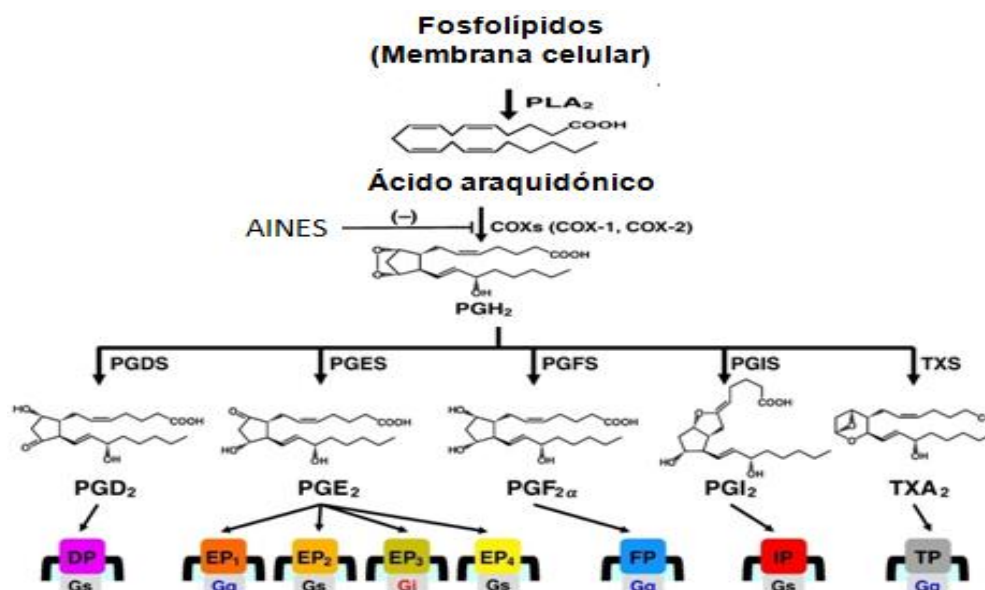


Figura 2. Prostanoides derivados de la ruta de la ciclooxigenasa (Yuhki et al., 2011).

Ciclooxigenasas en el riñón

La expresión diferencial y la distribución de las 2 isoformas de la COX están involucradas en la regulación de varias funciones fisiológicas en el riñón. La COX-1 es la isoforma dominante, se expresa en el endotelio renal, en las células mesangiales glomerulares, en células endoteliales arteriolares, así como en los conductos colectores corticales y medulares (Nørregaard et al., 2015).

En contraste, la expresión basal de COX-2 es menos intensa, se encuentra y tiene una distribución discreta en el riñón en condiciones normales, presenta algunas diferencias entre especies en la localización. La distribución constitutiva de COX-2 se ha localizado en células de la mácula densa y en el conducto ascendente grueso cortical del asa de Henle y las células intersticiales Figura 3 (Nørregaard et al., 2015), como COX-2 es una

enzima inducible, en condiciones patológicas puede expresarse en muchas células a nivel sistémico y en particular en diferentes tipos celulares dentro del riñón (Fitzpatrick y Soberman, 2001).

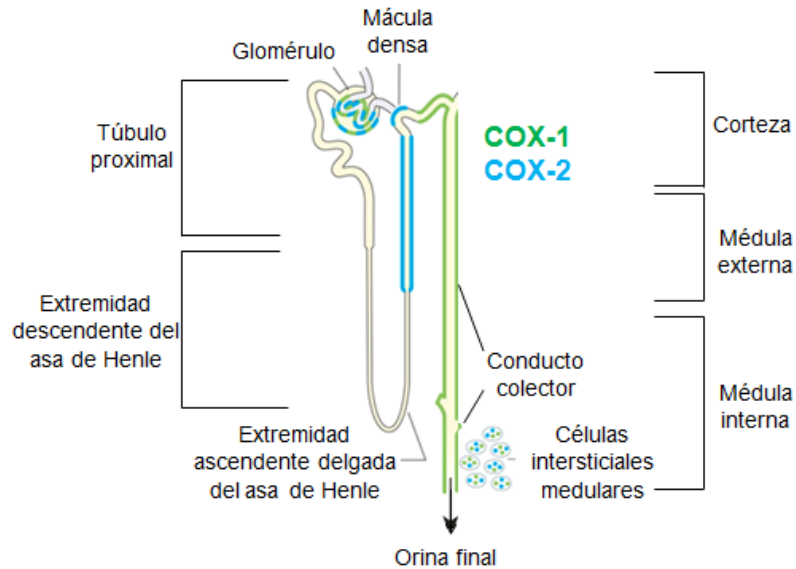


Figura 3. Distribución de las isoformas de la COX en toda la nefrona, COX-1 en color verde y COX-2 color azul modificado de (Nørregaard *et al.*, 2015).

Prostaglandinas en el riñón

En condiciones fisiológicas, los prostanoides derivados de la COX ejercen funciones esenciales en la regulación de la hemodinámica renal, por ejemplo; la liberación de renina, regulan el tono vascular, mantienen la filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal, participan en la mediación de la acción hormonal y modulan la excreción de agua y sodio (Li *et al.*, 2018).

Las acciones de los prostanoides sobre la función renal dependerán de una maquinaria enzimática compleja que acopla la fosfolipasa A2 y la COX, a la sintasa específica de cada prostanoides, que finalmente ejercerá su acción al unirse a un receptor acoplado a proteína G (Hao y Breyer, 2007). Se ha reconocido que PGE₂ es el metabolito renal más abundante seguido de PGI₂, PGF_{2α} y TxA₂ (Li *et al.*, 2018).

Las acciones biológicas de la PGE₂ se ejercen mediante la activación de los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4. A través de estos receptores, la PGE₂ desempeña una variedad de funciones fisiológicas renales, tiene efectos sobre el flujo sanguíneo renal, la excreción de sodio y la reabsorción de agua, y por lo tanto contribuye a la regulación de la presión

arterial, la filtración glomerular y la resistencia vascular (Breyer y Breyer, 2000). La PGI₂ ejerce su acción al activar el receptor IP, aumenta la secreción de potasio principalmente al estimular la secreción de renina (Kim, 2008). Las acciones de TxA₂ están mediadas por el receptor Tp es un importante vasoconstrictor renal, estimula la contracción de las células mesangiales y, por lo tanto, puede tener efectos directos sobre la filtración glomerular y la proteinuria, además parece estar involucrado en la regulación de la hemodinámica y la excreción de sodio (Li et al., 2018). En condiciones fisiopatológicas, la función renal se vuelve dependiente de los prostanoideos participando de manera activa en la hipertensión vascular renal y la nefropatía diabética (Hao y Breyer, 2008).

Óxido nítrico

El óxido nítrico es un radical libre diatómico, se sintetiza en diversas células y tejidos del organismo a partir del aminoácido L-arginina a L-citrulina; esta reacción es catalizada por las sintasas de óxido nítrico (NOS). Se han identificado 3 isoformas principales, nombradas en función del tejido del cual fueron aisladas y purificadas: sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS, NOS-I o NOS-1), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, NOS-II o NOS-2) y sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS, NOS-III o NOS-3) (Tenorio et al., 2008). La biosíntesis de NO requiere como cofactores: el complejo Ca²⁺- calmodulina (CaM), la tetrahydrobiopterina (H4B), el grupo hemo, el flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD) (Tenorio et al., 2008). La eNOS y nNOS son dependientes de la Ca²⁺/calmodulina y la iNOS es inducida por citocinas (Sosa-Luna et al., 2005).

El NO controla el tono vascular dependiente del endotelio y desempeña una función activa en numerosos procesos biológicos como la vasodilatación. Además de su efecto relajante directo, el NO inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión y migración de células sanguíneas a la pared vascular (Sosa-Luna et al., 2005).

La estimulación por neurotransmisores como la noradrenalina, acetilcolina, o por autacoides como la trombina, bradicinina, angiotensina II y endotelina produce la liberación de NO. La generación de NO se incrementa por factores físicos como el flujo sanguíneo (estrés de cizallamiento) o la contracción de los vasos sanguíneos, de esta manera el NO tiene una función destacada en la regulación del tono del músculo liso vascular y del flujo sanguíneo hacia los tejidos (Sosa-Luna et al., 2005).

La eNOS se expresa en las células endoteliales vasculares renales y la proteína nNOS se ha encontrado predominantemente en las células epiteliales de la mácula densa, células del conducto colector y los nervios sensoriales pélvicos renales. La iNOS se expresa ampliamente después de la inducción con endotoxinas o estímulos proinflamatorios en los epitelios del túbulo, incluidos el túbulo proximal, la extremidad ascendente gruesa y el túbulo contorneado distal (Han et al., 2006)

En el riñón, el NO tiene numerosas funciones fisiológicas, incluida la regulación de la hemodinámica renal y glomerular, la mediación de la natriuresis por presión, el mantenimiento de la perfusión medular, reducción de la retroalimentación tubuloglomerular, inhibición de la reabsorción tubular de sodio y la modulación de la actividad del nervio simpático renal (Mount y Power, 2006).

Prostaciclina

La prostaciclina (PGI_2) es un ácido carboxílico insaturado de 20 carbonos con un anillo de ciclopentano, es uno de los cinco productos principales de la cascada del ácido araquidónico, ambas enzimas (COX-1 y COX-2) convierten el AA en el precursor la prostaglandina PGH_2 , que posteriormente se sintetiza en PGI_2 a través de la sintasa de prostaciclina (PGIS), se sabe que COX-2 es la enzima responsable de su síntesis en el riñón (Stitham et al., 2011). PGI_2 no se almacena, se convierte rápidamente por procesos no enzimáticos en un metabolito inactivo, 6-ceto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ ($\text{PGF}_{1\alpha}$). Las acciones de la prostaciclina están mediadas principalmente a través de su receptor de superficie celular el receptor IP (Reid y Kinsella, 2015), es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, predominantemente a la subunidad G_s , esto implica un aumento en los niveles intracelulares de AMPc mediante la acción de la adenilato ciclasa y a su vez, la activación de la proteína quinasa A (PKA) dependiente del AMPc (Fig. 4) (Boie et al., 1994, Reid y Kinsella, 2015) para producir finalmente un desacoplamiento de la maquinaria contráctil que induce a la vasodilatación.

Los estudios en animales también han demostrado que la PGI_2 puede ser señalizada a través de vías alternas relacionadas con proteína G_q y G_i (Lawler et al., 2001), así como por vías mediadas por receptores nucleares, como la vía del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (Lim y Dey, 2002).

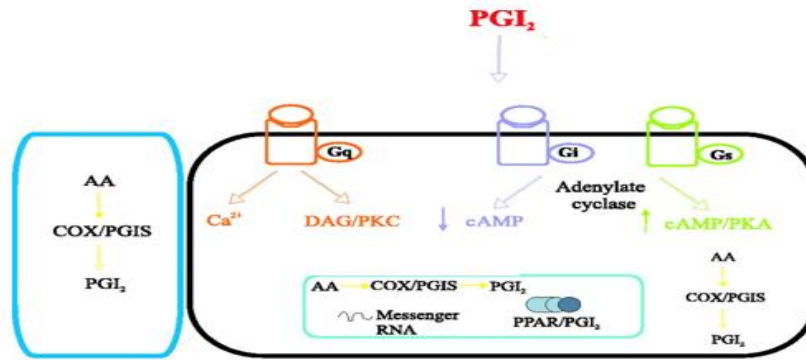


Figura 4. Diversas opciones de señalización para PGI₂ en el riñón (modificado de Nasrallah y Hébert, 2005).

La prostaciclina desempeña un papel clave en la vasculatura, se produce principalmente dentro del endotelio y del músculo liso vascular de todos los vasos sanguíneos (Reid y Kinsella, 2015), tiene potentes efectos vasodilatadores y tiene capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas circulantes. Además de su papel en la vasculatura también contribuye al mantenimiento de las funciones homeostáticas de muchos sistemas de órganos y la patogénesis de ciertas enfermedades (Nasrallah y Hébert, 2005).

La PGI₂ en el riñón, regula el flujo sanguíneo renal (RBF), la tasa de filtración glomerular (TFG), la secreción de renina, respuestas de crecimiento como el crecimiento glomerular y tubular, los procesos de transporte tubular y el destino celular (Nasrallah y Hébert, 2005). Los desequilibrios en los niveles de prostaciclina, de su sintasa específica o su receptor están implicados en una amplia gama de enfermedades como son: las cardiovasculares, renales y pulmonares, entre otras (Kawabe *et al.*, 2010).

Sintasa de prostaciclina

La sintasa de prostaciclina (PGIS) es una hemoproteína con características del citocromo P450 (CYP), se expresa principalmente en células vasculares como las células endoteliales y las células del músculo liso y se asocia con el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. La PGIS es una enzima inusual porque cataliza una isomerización en lugar de una monooxigenación que es típica de las enzimas P450, cataliza el reordenamiento de la prostaglandina H₂ para formar PGI₂. Se colocaliza con las COX's y la fosfolipasa A2, la PGIS se acopla funcionalmente con estas enzimas. La PGIS se expresa de forma constitutiva y puede ser regulada por citocinas, hormonas reproductivas y factores de crecimiento. El acoplamiento de PGIS con COX-2 desempeña un papel

importante en la protección vascular, y el desarrollo e implantación de embriones en condiciones normales (Wu y Liou, 2005)

Estudios en animales noqueados para la PGIS comprueban el papel crítico de PGI₂ en el desarrollo renal, el estudio de Yokoyama *et al.*, 2002 demuestra que los riñones deficientes de PGIS generalmente se desarrollan en tamaño, pero la ausencia de la sintasa genera animales con un solo riñón o uno más pequeño y sin desarrollar, además se generan cambios morfológicos como atrofia, lesión vascular y fibrosis. Mientras que la deficiencia de PGIS en los vasos sanguíneos induce el engrosamiento de las paredes arteriales, lo que indica que PGI₂ es muy importante para mantener el estado normal de los vasos. Además, la ausencia de PGI₂ favorece la formación de TXA₂ y PGE₂.

La mayoría de los estudios sobre la síntesis de PGI₂ se han centrado en la expresión y regulación de las COX's, estas enzimas se consideran el paso limitante para la producción de prostanoïdes, sin embargo, la regulación de las sintasas específicas de cada prostanoïde es un blanco terapéutico importante de estudiar (Klein *et al.*, 2015).

Se han realizado investigaciones para comprender la regulación de la liberación de PGI₂, Klein *et al.*, 2015 informaron que en células mesangiales humanas la mayor síntesis fue de PGI₂, seguida de PGE₂ y PGF_{2α}, la estimulación con citocinas incrementa la formación de PGI₂ y PGE₂ sin provocar cambios en la producción de TXB₂ y PGF_{2α}.

En general, se piensa que las sintasas de PGs se expresan de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, Caughey *et al.*, (2001), observaron que la COX-2 puede inducir la expresión de la sintasa de PGE₂ y PGI₂ en células endoteliales de la vena umbilical humana. Otros han demostrado que las células endoteliales bovinas transducen la unión del factor de necrosis tumoral (TNF) en un aumento de la expresión de la enzima COX-2 y, posteriormente en la inducción del RNAm de la PGIS (Spisni *et al.*, 1995).

Ciclooxigenasas en diabetes

Estudios en diabetes mellitus humana y experimental han revelado alteraciones del metabolismo del ácido araquidónico renal y en la producción de prostaglandinas (PGs) y tromboxano dependientes de COX (Kreisberg y Patel, 1983, Schambelan *et al.*, 1985, Quilley y McGiff, 1985). Esto sugiere que el daño renal provocado por la diabetes, implica un aumento en la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) dependiente de calcio, que genera ácido araquidónico como sustrato para la COX-2, y posteriormente se produce un

incremento en la formación de prostaglandinas que pueden afectar la función renal. La diabetes mellitus se asocia con una regulación alterada en la microcirculación. Una inflamación vascular de bajo grado se ha implicado en el desarrollo de complicaciones vasculares relacionadas con la diabetes. Los productos derivados de COX's tienen un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación, por lo tanto, se ha establecido que participan en la progresión de la diabetes y sus complicaciones (Bagi et al., 2006).

Las investigaciones indican que las PGs derivadas de COX-2 están implicadas en una variedad de procesos fisiopatológicos en el riñón (Nørregaard et al., 2015), en la DM se produce un aumento en la síntesis de varios prostanoides a través de la regulación positiva de COX-2, que interfiere con la regulación de la función vasomotora (Bagi et al., 2006). Las respuestas vasodilatadoras a los agentes dependientes del endotelio se reducen, mientras que las respuestas a los agentes vasoconstrictores disminuyen, aumentan o no cambian (Quilley y Chen, 2003). En la diabetes experimental se ha observado un aumento de la expresión de COX-2 y este incremento en la actividad se asocia con una mayor liberación de prostaglandinas renales en la rata diabética, se sabe que los prostanoides derivados de esta enzima producen cambios hemodinámicos y estructurales que son significativos para el desarrollo de nefropatía diabética (Li et al., 2005; Yabuki et al., 2010).

En el estudio de Quilley y Chen, (2003) se evaluó el papel de COX-2 en el efecto vasoconstrictor del AA, y entre sus principales hallazgos demostraron que en el riñón de ratas diabéticas las respuestas vasoconstrictoras al AA estaban incrementadas, esta mayor capacidad de respuesta en el riñón se asoció con una mayor conversión a prostaglandinas por la COX, particularmente a dosis más bajas. El efecto vasoconstrictor del AA dependiente de COX aumentado en la rata diabética fue parcialmente atribuible a la actividad de la isoforma de COX-2, cuya expresión renal aumentó en el modelo de diabetes experimental.

Se demostró que la diabetes experimental da como resultado la regulación positiva de la COX-2 y aumentos en la formación de prostaglandinas renales, TNF- α y TGF- β , lo que contribuye a la hipertrofia y la albuminuria (Cheng et al., 2002). Las intervenciones que evitan la regulación positiva de la COX-2 renal en la rata diabética están, en su mayor parte, asociadas con una reducción de la liberación renal exagerada de prostaglandinas en respuesta al AA (Quilley et al., 2011).

El estudio de Komers et al., (2007) evaluó en un modelo de ratas diabéticas con un fenotipo de hiperfiltración renal, las relaciones inmunohistoquímicas y funcionales de COX-2. Se reportó un aumento de la expresión cortical renal de la COX-2 en ratas diabéticas y la inhibición aguda de COX-2 redujo la elevación de la TFG en la rata diabética disminuyendo la producción de prostaglandinas asociadas a la hiperfiltración. La identidad de las prostaglandinas que contribuye a la hiperfiltración en diabetes sigue siendo desconocida, pero los aumentos en la excreción urinaria de PGE₂ y el metabolito de la PI₂ el 6-cetoPGF_{1α} indican que son las PGs implicadas.

La inhibición selectiva de COX-2 con el celecoxib durante la primera semana de diabetes experimental redujo la expresión renal de COX-2 y la excreción urinaria de PGs, en específico la producción de PGI₂, la inhibición favoreció un efecto nefroprotector, caracterizado por la reducción de la hipertrofia renal y una menor expresión de TGF-β (Vázquez-Cruz et al., 2013).

La inhibición selectiva de COX-2 conduce a una disminución de la PGI₂ sin la inhibición de la síntesis de TXA₂. Debido a que los inhibidores selectivos de la COX-2 reducen los niveles de PGI₂ sin inhibir la síntesis de TXA₂, se postula que el cambio del equilibrio entre estos dos prostanoides a favor de TXA₂ interrumpe la homeostasis vascular y contribuye a la progresión de complicaciones vasculares (Smyth et al., 2009).

La producción de prostanoides vasodilatadores y vasoconstrictores derivados de COX-1 y COX-2 que son importantes mediadores del tono vascular renal, se han estudiado con la inhibición selectiva de estas enzimas. Actualmente, el principal producto de la COX-1 en el riñón es el vasoconstrictor tromboxano A₂ (TxA₂), por el contrario, los metabolitos derivados de la COX-2 son la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la prostaciclina (PGI₂). Sin embargo, Ruíz-Leyja et al., 2013 evaluaron el papel diferencial de la COX-1 y la COX-2 en la vasoconstricción renal inducida por fenilefrina en riñones de ratas hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY). Una vez que el riñón es estimulado por el agonista, el patrón de prostanoides producidos por COX-1 y COX-2 es distinto, la inhibición de COX-1 con SC-560 redujo el efecto contráctil de fenilefrina en los riñones WKY, mientras que en SHR no hubo cambios, la inhibición selectiva de COX-2 con NS398 redujo el efecto vasoconstrictor inducido por fenilefrina en riñones SHR, por el contrario, el efecto vasoconstrictor de fenilefrina aumentó en riñones WKY. Por lo tanto, COX-1 está acoplada a la síntesis de TXA₂ en riñones normotensos, mientras que esta enzima está involucrada en la producción de TxA₂ y PGI₂ en riñones hipertensos. En contraste, COX-2

está acoplado a la síntesis de TxA_2 y PGI_2 en riñones WKY, mientras que COX-2 está involucrado en la producción de TxA_2 en riñones SHR. Este cambio en la actividad de la COX en la regulación del tono vascular de ratas hipertensas puede estar mediado por diferentes vías, además de que un aumento en la expresión de la COX-2 renal implicaría modificaciones en la distribución tisular de las COX o en la disponibilidad de las sintasas de prostanoides.

La alteración en la vía de la ciclooxigenasas que se produce en la diabetes no es el único mecanismo por el cual se produce daño, los prostanoides son reguladores clave de la función renal, e interactúan con varios sistemas, incluido el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), las alteraciones en estos sistemas también pueden regular la expresión y actividad de la COX (Quadri et al., 2016). En condiciones patológicas como la diabetes, se genera un estado de estrés oxidativo en el que se da un desbalance entre la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, por lo tanto, se genera una remoción insuficiente de estas moléculas. En estados de inflamación, la producción de NO por la vasculatura aumenta considerablemente junto con otros ROS y contribuye al estrés oxidativo (Lubos *et al.*, 2008). Durante la diabetes se alteran mecanismos que pueden regular la expresión y actividad de COX, varios estudios sugieren que la COX y el NO interactúan, el NO es una molécula que puede volverse altamente dañina, la reacción del NO con el superóxido (O_2^-) forma el peroxinitrito (ONOO^-) esta molécula altamente oxidante participa en condiciones patológicas, y es capaz de reducir la biodisponibilidad de NO (Pacher *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido inducen la actividad de COX-2 (Kiritoshi et al., 2003, Cosentino et al., 2003); debido a que el estrés oxidativo aumenta en la diabetes e induce a la COX-2. El estudio de Li et al., 2005 demostró que la administración crónica del tempol (un mimético de la superóxido dismutasa) impidió la inducción de la COX-2 renal en la rata diabética y disminuyó la mayor liberación renal de prostaglandinas en respuesta al ácido araquidónico, lo que sugiere que el superóxido juega un papel central en la inducción de COX-2 durante la diabetes.

2. JUSTIFICACIÓN

Los inhibidores selectivos y no selectivos de COX-1 y COX-2 se han asociado a eventos clínicos adversos en el riñón, debido a que COX-1 y COX-2 se expresan de manera

constitutiva en él y desempeñan diversas funciones renales. COX-1 regula el control de la hemodinámica y la tasa de filtración glomerular, mientras que COX-2 regula la excreción de sal y agua, ambas isoformas mantienen las funciones normales del riñón. Sin embargo, se desconoce el papel de las sintasas de prostanoïdes en la disfunción renal en la diabetes. Por lo tanto, es importante estudiar las funciones de las enzimas río abajo de COX en la síntesis de PGs. En este trabajo, es de interés conocer la participación de la PGIS en las alteraciones vasculares ocasionadas por la diabetes en el riñón y así proponer posibles blancos terapéuticos novedosos para los pacientes con esta afección.

3. HIPÓTESIS

La diabetes se asocia con una mayor producción de autacoides vasodilatadores como la prostaciclina y el óxido nítrico en el riñón en etapas tempranas de esta enfermedad. Por lo tanto, un aumento en la actividad de las sintasas de prostaciclina y óxido nítrico reducirá el tono vascular renal en el modelo de diabetes experimental.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la vía COX-la sintasa de prostaciclina y del óxido nítrico en la función vascular renal en ratas en dos etapas de evolución de la diabetes.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la participación de la ciclooxigenasa en el tono vascular renal inducida por fenilefrina en ratas diabéticas de 1 semana de evolución.

Determinar la participación de la sintasas del óxido nítrico en el tono vascular renal inducido por fenilefrina en ratas diabéticas de 4 semanas de evolución.

Determinar la participación de la sintasa de prostaciclina en el tono vascular renal inducido por fenilefrina en ratas diabéticas de 1 y 4 semanas de evolución.

Determinar la expresión de la proteína sintasa de postaciclina en corteza renal de ratas diabéticas de 1 y 4 semanas de evolución.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300g que fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se mantuvieron en condiciones ambientales controladas, con agua y comida *ad libitum*. El manejo de las ratas fue realizado conforme a la Norma Oficial Mexicana para uso y cuidado de animales laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México).

Inducción de la diabetes experimental

Las ratas se dividieron en 2 grupos: el de ratas inducidas a diabetes y el control.

Al grupo de ratas inducidas a diabetes se les administró estreptozotocina (STZ), por vía intraperitoneal (i.p.) en una dosis de 65 mg/kg de peso. 72 horas después se les midió la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro (Accu-Check Performa) para corroborar el establecimiento de hiperglucemia, se tomaron valores mayores a 300mg/dL como positivos para el grupo diabético.

El grupo de ratas control fue administrado con el amortiguador de citratos (el vehículo de la STZ) en una dosis de 1ml/kg de peso

Registro de la presión de perfusión del riñón en cámara de órgano aislado

A la primera semana y cuatro semanas después a la inducción de diabetes, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60mg/kg, i.p.) Figura 5, se realizó una laparotomía abdominal para exponer el riñón derecho y se hizo una disección en planos como en la Figura 6, para posteriormente canularlo a través de la arteria mesentérica.



Figura 6. Rata Wistar macho anestesiada

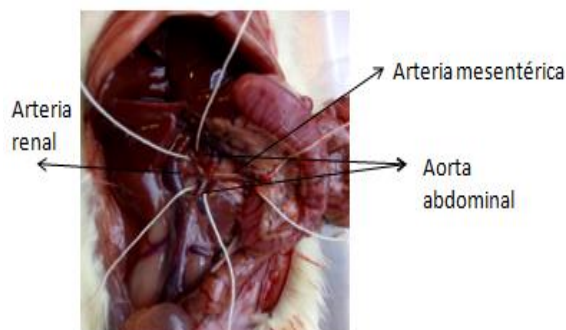


Figura 5. Disección y sitio de canalización del riñón derecho.

Posteriormente el riñón se colocó en una cámara para órgano aislado tipo Langerdoff para la perfusión *in vitro* como se muestra en la Figura 7, con flujo constante (10ml/min) de solución Krebs con la siguiente composición; NaCl, 118 mM; KCl, 4.6 mM; MgSO₄·7H₂O, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; CaCl₂·2H₂O, 1.5 mM; dextrosa, 5.5 mM; NaHCO₃, 24.9 mM y EDTA, 0.027 mM, a 37°C, pH 7.4 y en constante oxigenación (95% O₂ y 5% CO₂), la presión de perfusión se registró con el transductor de presión TSD105 (Biopac Systems) acoplado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems). Los riñones se estabilizaron durante 60 minutos y se realizaron curvas concentración-respuesta Figura 8 a fenilefrina (0.031-100nm) en ausencia y presencia del inhibidor no selectivo de las COXs, la indometacina (1x10⁻⁵ M), del inhibidor no selectivo de las NOS, L-NAME (1x10⁻⁵ M) y del inhibidor selectivo de la sintasa de prostaciclina, la tranilcipromina o 2-PCPA (1x10⁻⁵ M, Cayman® 10010494) en diferentes riñones.

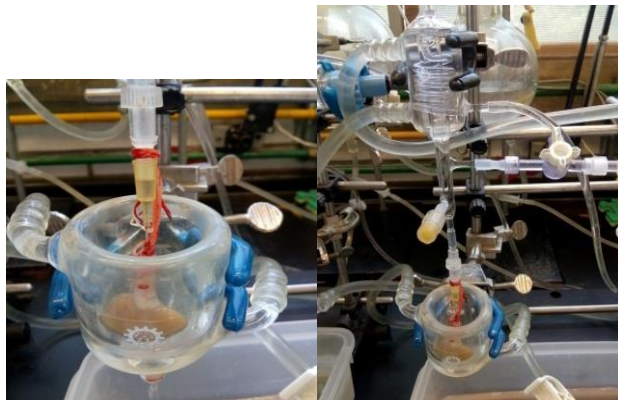


Figura 7. Riñón derecho de rata Wistar montado en el aparato de órgano aislado

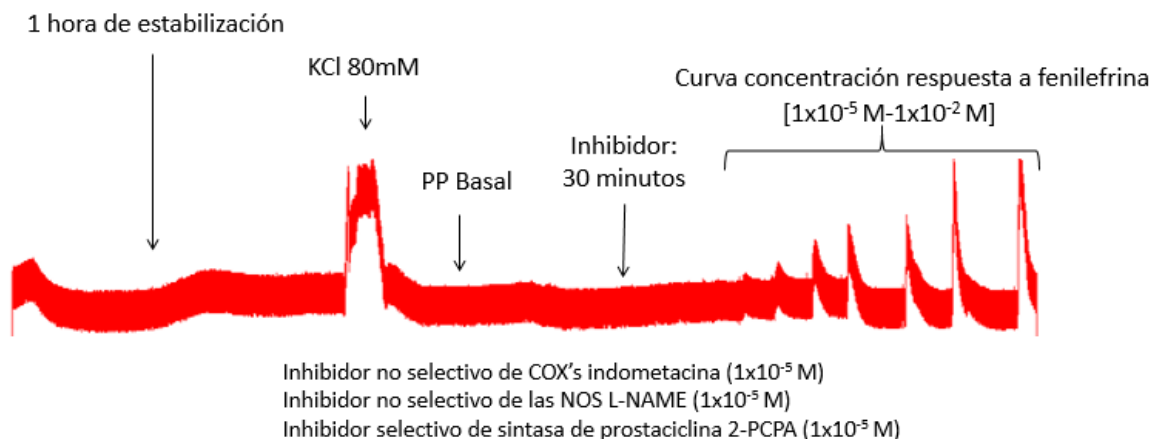


Figura 8. Registro de un experimento para evaluar la respuesta a fenilefrina en la vasculatura renal en presencia de inhibidores.

Inmunodetección de PGIS en corteza de riñón (“Western Blot”)

La corteza se obtuvo de riñones perfundidos durante 3 minutos, y de cada uno se tomaron 25mg; se colocaron en 1 ml de solución R.I.P.A (TRIS-HCL pH 7.4, NaCl 5M, EDTA, desoxicolato de sodio y SDS 20%), con una mezcla de inhibidores de proteasas (Minicomplete Roche). Para separar las proteínas, el tejido se homogeneizó con un Polytron PT10-35; se centrifugó a 10,000 revoluciones por 10min, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry modificado, para lo cual se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA), las muestras se sometieron a reaccionar con reactivo de Folin y se determinaron las absorbancias a 750 nm; con estos datos se estimó la concentración de proteínas totales en cada muestra, por regresión lineal a partir de la curva estándar y la ecuación de la línea recta. Las muestras fueron preparadas en condiciones desnaturalizantes con Laemlli (Tris-HCL 0.125 M, pH 6.8, SDS 10%, glicerol 20%, 2-mecaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.03mM) y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamina, SDS-PAGE al 10% las proteínas se separaron por su peso molecular, se cargó 50 µg de proteína de cada muestra, se utilizó un campo eléctrico de 80V por 25 min para concentrar las muestras y 120V para separarlas, para comprobar que las muestras no estuvieran degradadas, se tiñó un gel con azul de Coomassie.

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Biosciences ®), por electrotransferencia en una cámara semi-seca TRANS-BLOT (Bio-Rad ®), por 50 min a 15 V, con amortiguador de transferencia (Trizma base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%).

Una vez que las proteínas se transfirieron a la membrana PVDF, se bloquearon los sitios de unión libre con leche baja en grasa (5%), diluida en PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂HPO₄) más tween 0.1% y agitación constante durante 1 hora, para evitar unión inespecífica del anticuerpo. La PGIS se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo (1:2500), y se incubó toda la noche a 4°C; después se eliminó el anticuerpo no unido, lavando con PBS-tween 0.1%, y luego se incubó con el anticuerpo secundario, anti-rabbit unido a peroxidasa (1:3000) en leche al 5%-PBS-tween al 0.1% por 1 hora en agitación constante. El peso de PGIS en la detección es de ~53 kDa, como proteína de referencia se usó la β-actina, se utilizó un anticuerpo anti β-actina de conejo (1:3000).

Para visualizar la PGIS se hizo una reacción de inmunoluminiscencia en la membrana PVDF con Luminol (Santa Cruz Biotechnology ®), y se colocó en un cassette de radiografía, para después exponer la película de detección (Amersham Biotechnology ®), y posteriormente revelarla y fijarla con reactivos de Kodak ®.

Las imágenes en las películas se digitalizaron en un escáner Biosens SC 645 BIOTOP ®, y la intensidad de las bandas se determinaron con el software de análisis de imágenes multi gauge 3.0 software (Fujifilm); así se construyó la gráfica que mostró la cantidad relativa de la PGIS, al relacionar la intensidad de píxeles (PGIS/ β -actina).

7. RESULTADOS

1. Valores de peso y glucosa de ratas diabéticas y normoglucémicas.

El peso corporal de las ratas se tomó antes de la inyección de STZ y al inicio de cada experimento a la primera y cuarta semana de inducción de la diabetes, los promedios del peso de las ratas control y diabéticas de 1 semana fueron 330 ± 3 g y 260 ± 6 g, y a las 4 semanas los pesos fueron 387 ± 4 g y 259 ± 7 g respectivamente, el peso corporal del grupo diabético en ambos casos fue significativamente menor respecto al grupo normoglucémico, como se muestra en la Tabla 1 también hubo un incremento del peso en las ratas normoglucémicas con respecto a el peso inicial en los dos tiempos estudiados.

La concentración de glucosa se midió 72 horas después de la inducción, y después de los tiempos de evolución de diabetes estudiados, la concentración se presentó en los rangos esperados para cada grupo, mayores a 300 mg/dL indicaba que la diabetes experimental ya estaba establecida, las concentraciones del grupo control a una semana fueron de 137 ± 10 mg/dL y 547 ± 10 mg/dL para el grupo diabético, a las cuatro semanas la concentración fue de 133 ± 5 mg/dL y 565 ± 8 mg/dL respectivamente, obteniendo que la concentración de glucosa en los grupos diabéticos estuvieron aumentados significativamente en comparación con el grupo normoglucémico como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de peso y glucosa de ratas normoglucémicas y diabéticas después de una y cuatro semanas de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de ratas (normoglucémico, n= 33), (diabético, n= 32) y (normoglucémico, n= 45), (diabético, n=43) respectivamente. *p<0.05 entre control y diabético.

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO (g) después de la inducción	GLUCOSA (mg/dL)
1 SEMANA			
Normoglucémico	272 \pm 4	330 \pm 3	137 \pm 10
Diabético	277 \pm 3	260 \pm 6 *	547 \pm 10 *
4 SEMANAS			
Normoglucémico	265 \pm 2	387 \pm 4	133 \pm 5
Diabético	268 \pm 1	259 \pm 7 *	565 \pm 8 *

2. Peso renal e índice de masa renal

El peso del riñón en la primera semana de evolución tuvo un valor promedio de 1.15 \pm 0.02 g para ratas normoglucémicas y de 1.25 \pm 0.03 g para el grupo diabético. El peso renal de las ratas diabéticas aumentó significativamente en comparación con el grupo normal, sin embargo, a las 4 semanas de evolución no hubo diferencias Tabla 2. La relación del peso renal entre el peso corporal se conoce como índice de masa renal, este valor se determinó para ambos grupos, el grupo diabético en los tiempos establecidos de 1 y 4 semanas tuvo un índice de masa renal mayor comparado con el grupo normoglucémico respectivo Figura 9.

Tabla 2. Peso del riñón de ratas diabéticas con 1 y 4 semanas de evolución. Los valores se expresan como las medias \pm EE de ratas a 1 (normoglucémico, n= 29), (diabético, n= 30) y 4 semanas (normoglucémico, n= 45), (diabético, n=43) respectivamente. *p<0.05 entre normoglucémico y diabético.

GRUPOS	PESO DEL RIÑÓN (g)
1 SEMANA	

Normoglucémico	1.15 ± 0.02 g
Diabético	1.25 ± 0.03g *
4 SEMANAS	
Normoglucémico	1.21 ± 0.02g
Diabético	1.21 ± 0.03g

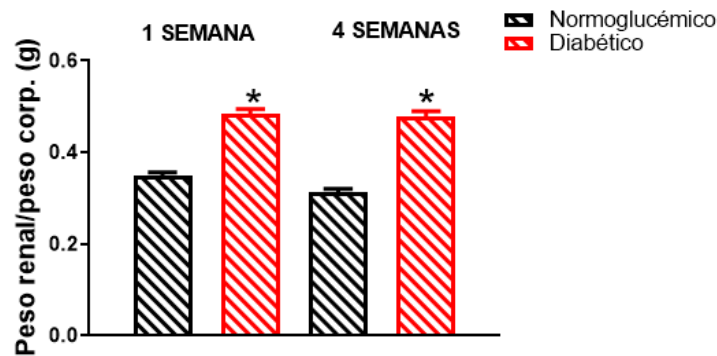


Figura 9. Índice de masa renal de ratas Wistar diabéticas de 1 y 4 semanas. Los valores se expresan como la media ± EE de ratas (normoglucémico, n= 29), (diabético, n= 30) y (normoglucémico, n= 45), (diabético, n=43) respectivamente. *p<0.05 entre normoglucémico y diabético.

Liberación basal de la PGI₂ en el tono vascular renal de ratas diabéticas y normoglucémicas.

Los riñones del grupo normoglucémico y diabético de 1 y 4 semanas se perfundieron durante 30 minutos antes de la estimulación con fenilefrina en presencia continua del inhibidor selectivo de la PGIS (2-PCPA 1x10⁻⁵ M). La inhibición de la PGIS aumentó la presión de perfusión de ratas normoglucémicas y diabéticas, lo que indica que en el lecho vascular renal la liberación basal de la PGI₂ participa en la regulación del tono vascular en ambos grupos de ratas Figura 10. A la primera semana la liberación basal de PGI₂ no se modificó en el grupo diabético; ya que el inhibidor de la PGIS (2-PCPA) provocó un incremento similar en la presión de perfusión en ambos grupos. Sin embargo, a las 4 semanas la liberación basal de PGI₂ disminuyó en la rata diabética; ya que el efecto del 2-PCPA fue menor comparado con el grupo normoglucémico Figura 11.

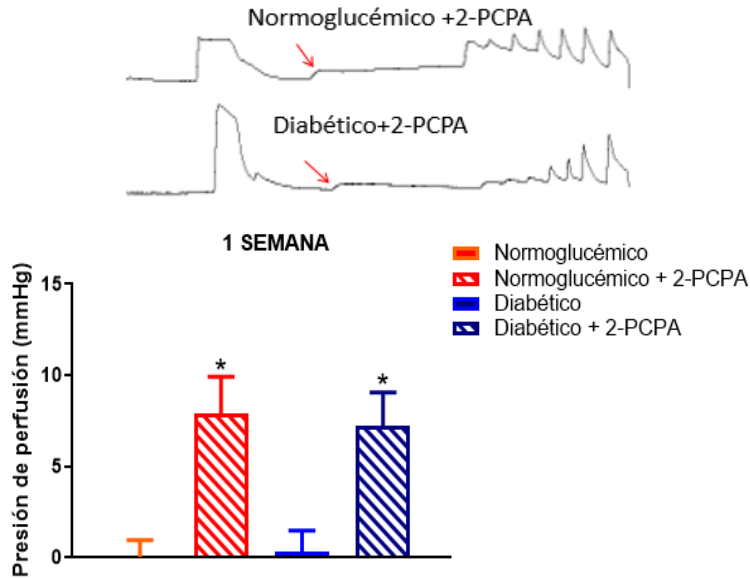


Figura 10. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas diabéticas con 1 semana de evolución. Los valores se expresan como las medias \pm EE de 7-8 ratas. * $p < 0.05$ 2-PCPA vs. normoglucémico y diabético. En la parte superior se muestra un experimento típico del efecto de la inhibición de PGIS en la presión de perfusión basal.

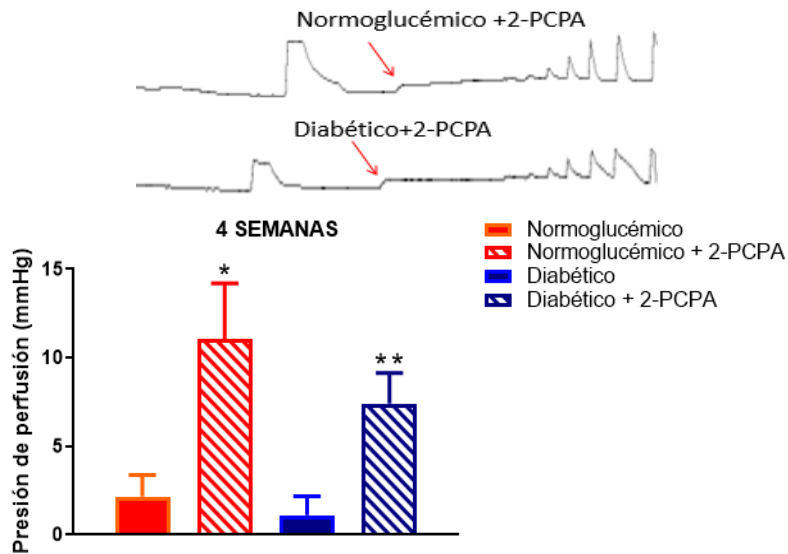


Figura 11. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas diabéticas con 4 semanas de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 9 riñones por grupo. * $p < 0.05$ 2-PCPA vs. normoglucémico y diabético. En la parte superior se muestra un experimento típico del efecto de la inhibición de PGIS en la presión de perfusión basal.

Participación del NO en el tono vascular basal en riñones aislados de ratas diabéticas.

Con la finalidad de determinar si el NO es liberado de manera basal en el lecho vascular renal. Los riñones del grupo normoglucémico y diabético de 4 semanas se perfundieron durante 30 minutos con el inhibidor no selectivo de las NOS (L-NAME 1×10^{-5} M). Como se puede ver en la figura 12 la inhibición de las NOS con el L-NAME provocó un aumento significativo en la presión de perfusión del grupo normoglucémico y diabético, indicando que NO es liberado y participa en la regulación basal del tono renal en ambos grupos Figura 12.

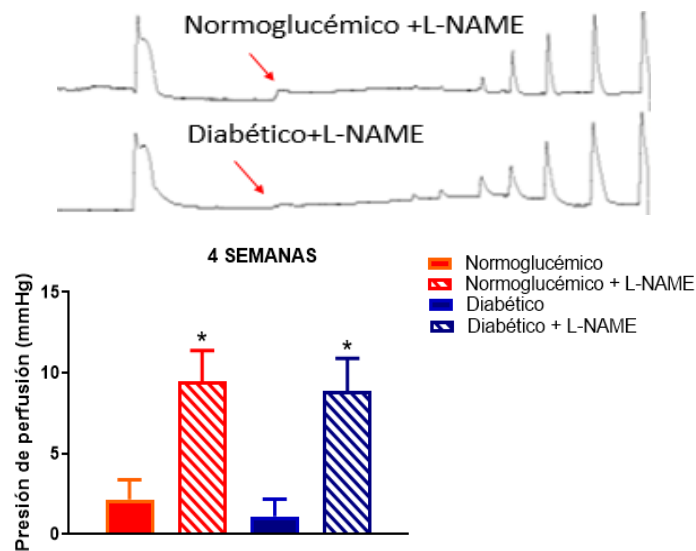


Figura 12. Efecto de la inhibición de las sintasas de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas diabéticas de 4 semanas de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE 8-9 ratas por grupo. * $p < 0.05$ L-NAME vs. normoglucémico y diabético. En la parte superior se muestra un experimento típico del efecto de la inhibición de las NOS en la presión de perfusión basal.

Efecto de la inhibición simultánea de la liberación basal de la PGI_2 y NO en el tono vascular renal de ratas normales y diabéticas.

Los riñones del grupo control y diabético de 1 y 4 semanas se perfundieron durante 30 minutos con los inhibidores de la PGIS (2-PCPA 1×10^{-5}) y de la NOS (L-NAME 1×10^{-5}). El bloqueo de la liberación basal de prostaciclina y NO incrementó notablemente la presión de perfusión renal en el grupo control y diabético de 1 y 4 semanas. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el animal normal y el diabético Figura 13 y Figura 14. Este efecto fue mayor que cuando se inhibió la síntesis de prostaciclina y NO de manera

individual, lo que indica que estos autacoides modulan el tono renal por mecanismos independientes.

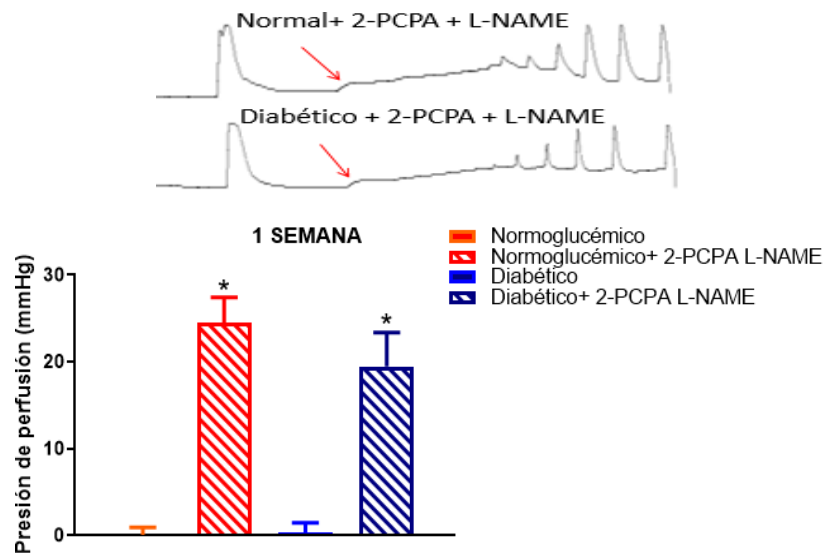


Figura 13. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas diabéticas en 1 semana. Los valores se expresan como las medias \pm EE de 6-8 ratas por grupo. * $p < 0.05$ 2-PCPA, L-NAME vs. normoglucémico y diabético. En la parte superior se muestra un experimento típico del efecto de la inhibición de la PGIS y las NOS en la presión de perfusión basal.

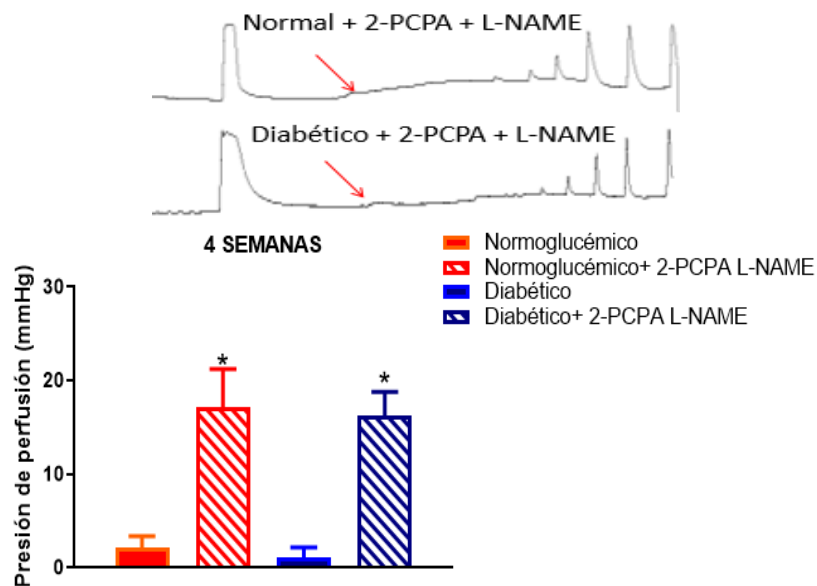


Figura 14. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y sintasa de NO (L-NAME) en el tono vascular basal en el riñón perfundido de ratas diabéticas con 4 semanas de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de ratas 9-10. * $p < 0.05$ 2-PCPA, L-NAME vs. normoglucémico y diabético. En la parte superior se muestra un experimento típico del

efecto de la inhibición de la PGIS y las NOS en la presión de perfusión basal.

Efecto del cloruro de potasio (KCl 80 mM) en riñones aislados de ratas diabéticas.

Después de 1 hora de estabilización, el riñón del grupo control y diabético de 1 y 4 semanas se contrajo con KCl 80 mM, a la primera semana el incremento de la presión de perfusión en respuesta al KCl fue mayor en el grupo diabético en comparación con el grupo control, mientras que a las 4 semanas de evolución se observó una disminución de la presión de perfusión respecto al grupo control. La contracción del KCl se debe a la entrada de Ca^{2+} extracelular, por lo que nuestros datos sugieren que los mecanismos que regulan la disponibilidad de Ca^{2+} intracelular y el daño directo en el músculo liso dependen del tiempo de evolución de la enfermedad Figura15.

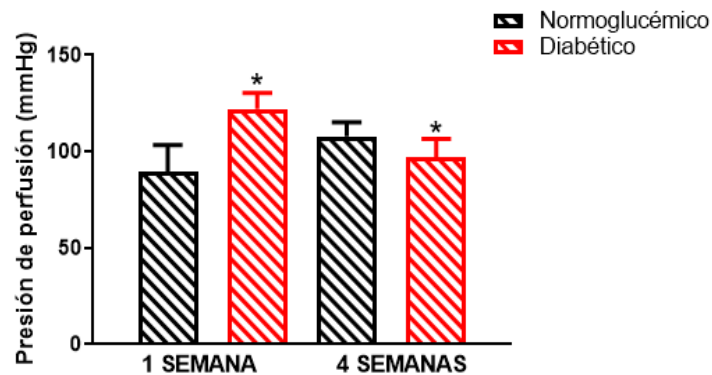


Figura 15. Efecto del KCl en la presión de perfusión en riñón aislado de ratas de 1 semana (normoglucémico, n= 10), (diabético, n=11) y 4 semanas (normoglucémico, n= 11), (diabético, n=13) de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE. * $p < 0.05$ entre diabético y normoglucémico .

Curva concentración-respuesta a fenilefrina en riñones perfundidos aislados

La Figura 16 muestra el efecto vasoconstrictor de fenilefrina en riñones aislados y perfundidos de una y cuatro semanas de diabetes. La fenilefrina provocó un aumento en la presión de perfusión de manera dependiente de la concentración tanto en el grupo control como diabético de 1 y 4 semanas. En la primera semana, la respuesta al efecto vasoconstrictor de fenilefrina fue significativamente mayor en el riñón de las ratas diabéticas comparado con el grupo control, a las 4 semanas no hubo diferencias en la respuesta de fenilefrina en ratas diabéticas respecto al control.

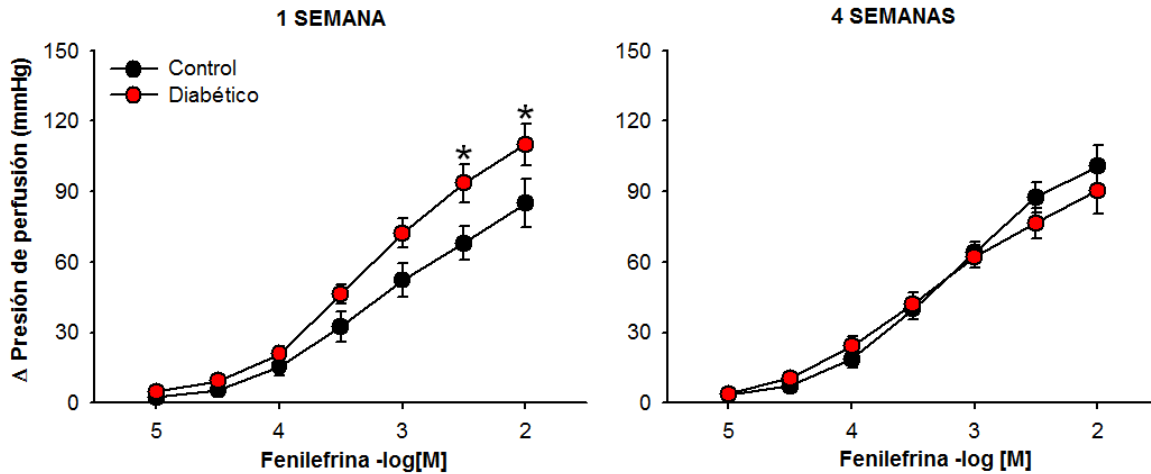


Figura 16. Curva concentración respuesta a la fenilefrina en riñones aislados de ratas Wistar en condiciones normoglucémicas y diabéticas en 1 semana (control, n= 10), (diabético, n=11) y 4 semanas (control, n= 11), (diabético, n=13) de evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE. * $p < 0.05$ entre control y diabético.

Participación de las ciclooxygenasas en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

Para determinar la participación de los prostanoideos en el efecto presor de la fenilefrina, los riñones se perfundieron con el inhibidor no selectivo de la COX's indometacina (1×10^{-5} M). En riñones de ratas con 1 semana de evolución, se observó que la indometacina no modificó la acción vasopresora inducida por fenilefrina en los grupos normoglucémico y diabético Figura 17.

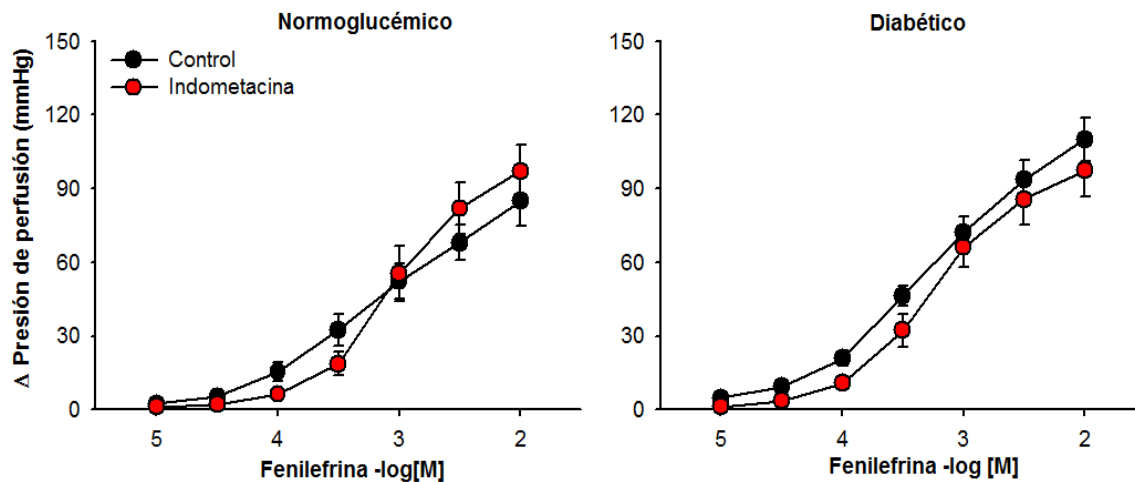


Figura 17. Efecto de la inhibición de las COX's sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas de 1 semana de evolución, del grupo normoglucémico y diabético. El control es el mismo que en la Fig. 16. Los valores se expresan como las medias \pm EE de 6–7 ratas por grupo.

Participación de la PGIS en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

Con la finalidad de determinar la participación de la prostaciclina en la regulación del tono vascular renal en respuesta a la fenilefrina, se evaluó el efecto del 2-PCPA (inhibidor selectivo de la sintasa de prostaciclina), en los riñones del grupo normoglucémico y diabético de 1 y 4 semanas. Ambos grupos de riñones se perfundieron en presencia del inhibidor selectivo de la PGIS (2-PCPA 1×10^{-5} M) durante 30 minutos antes y durante la curva concentración-respuesta con la fenilefrina.

En la primera semana, el 2-PCPA no modificó la acción vasopresora de fenilefrina en el grupo normoglucémico, sin embargo, en el grupo diabético disminuyó significativamente la presión de perfusión en las concentraciones más altas de fenilefrina en comparación con el grupo control Figura 18.

A las 4 semanas, el 2-PCPA también disminuyó la respuesta vasoconstrictora a la fenilefrina en el lecho vascular renal de las ratas diabéticas, siendo significativo comparado con el grupo control, mientras tanto el 2-PCPA no provocó cambios en la respuesta vaso contráctil de fenilefrina en los riñones del grupo normoglucémico, como consecuencia el incremento en la presión de perfusión renal en respuesta al agonista adrenérgico fue menor en la presencia del inhibidor Figura 19. Los riñones del grupo diabético fueron más sensibles a los efectos del 2-PCPA ya que el bloqueo de la respuesta constrictora fue más evidente.

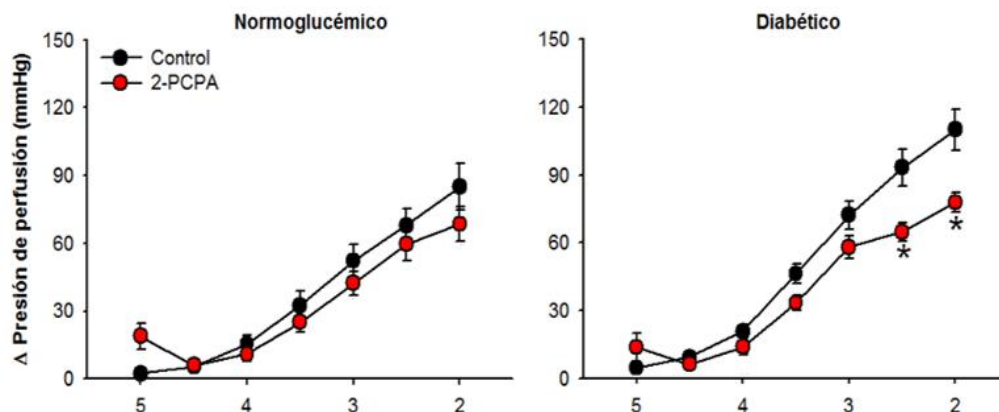


Figura 18. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 1 semana evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 7-8 ratas por grupo. * $p < 0.05$ 2-PCPA vs. control.

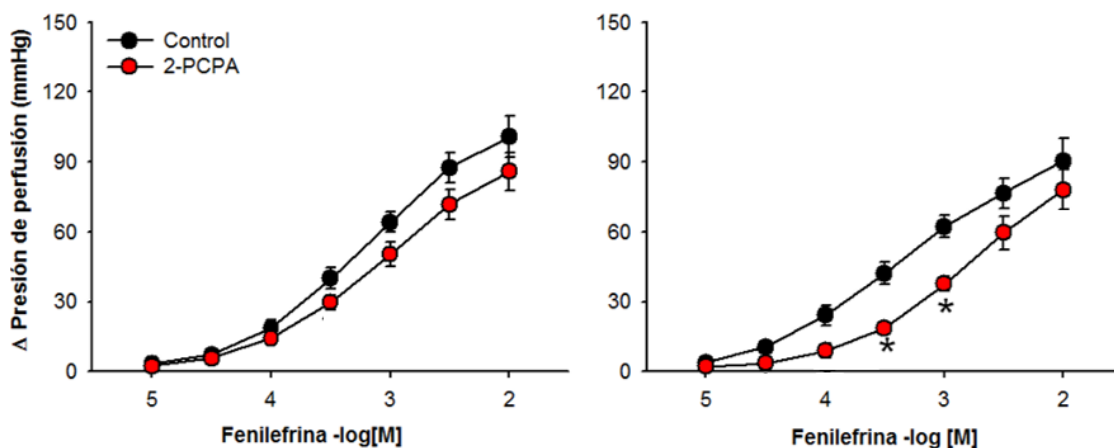


Figura 19. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 9 ratas por grupo. * $p < 0.05$ 2-PCPA vs. control.

Participación de las NOS en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

Con la finalidad de determinar la participación de las sintasas de NO en la regulación del tono vascular renal provocado por fenilefrina, se evaluó el efecto del L-NAME (inhibidor no selectivo de la sintasas de NO), los riñones del grupo normoglucémico y diabético de 4 semanas se perfundieron en presencia del inhibidor (L-NAME 1×10^{-5} M) durante 30 minutos antes y durante la curva concentración-respuesta con fenilefrina. A las 4 semanas de evolución de diabetes, la inhibición de las NOS no modificó el efecto vasoconstrictor de fenilefrina en ambos grupos Figura 20.

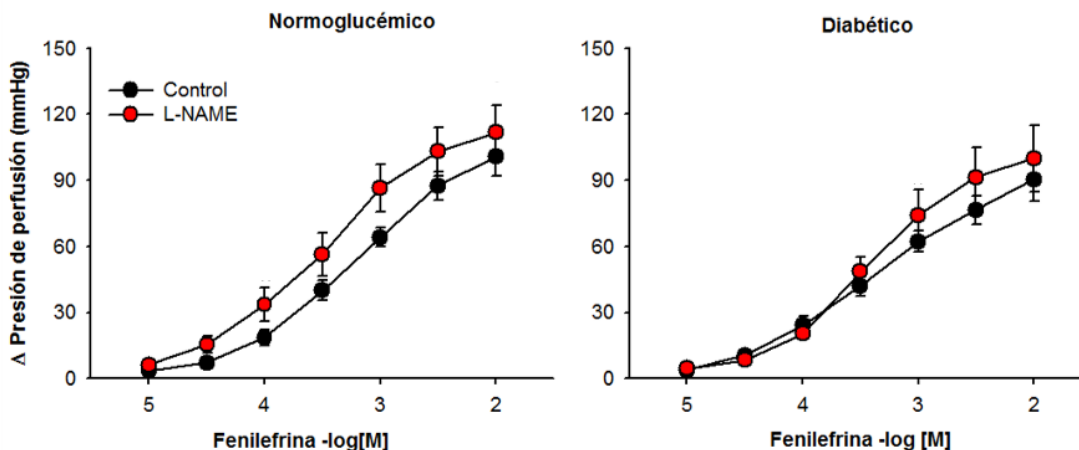


Figura 20. Efecto de la inhibición de las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 8-9 ratas.

Participación de la PGI₂ y NO en el efecto presor inducido por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

Con la finalidad de determinar la participación del NO en el efecto del 2-PCPA se evaluó el efecto de la 2-PCPA en la presencia de L-NAME un inhibidor de la sintasa de NO. Los riñones del grupo normoglucémico y diabético de 1 y 4 semanas se perfundieron con los inhibidores durante 30 minutos antes y durante la curva concentración-respuesta a la fenilefrina. En 1 y 4 semanas el L-NAME no modificó el efecto del 2-PCPA sobre la respuesta vasopresora de fenilefrina en riñones perfundidos de los grupos normoglucémicos y diabéticos Figura 21 y Figura 22.

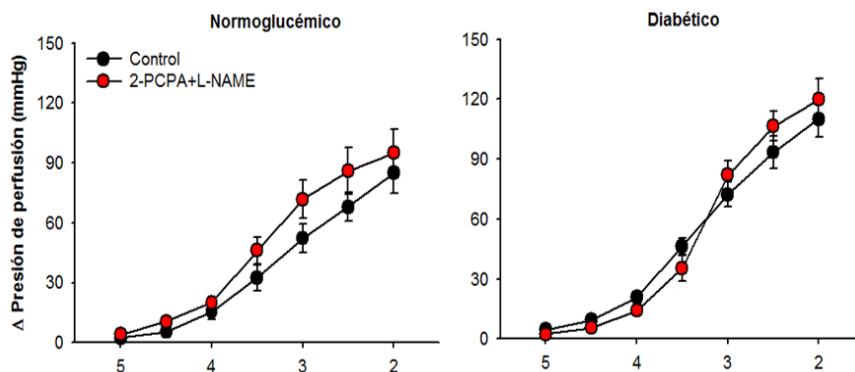


Figura 21. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 1 semana evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 6-8 ratas por grupo.

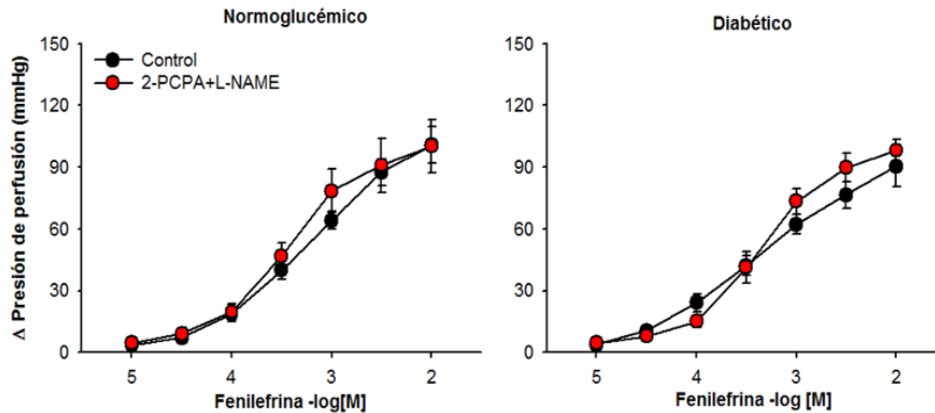


Figura 22. Efecto de la inhibición de la sintasa de prostaciclina (2-PCPA) y las sintasas de NO (L-NAME) sobre la vasoconstricción inducida por la fenilefrina en el riñón perfundido aislado de ratas del grupo normoglucémico y diabético en 4 semanas evolución. Los valores se expresan como la media \pm EE de 9-10 ratas por grupo.

11. Expresión de la PGIS en corteza renal

Con la finalidad de determinar la expresión de la PGIS a nivel de proteína, se realizó la inmunodetección de la sintasa en corteza renal de todos los grupos evaluados con la técnica de "Western Blot". A la primera semana de evolución de la diabetes se observó aumento en la expresión de la PGIS en las ratas diabéticas en comparación con el grupo control, mientras que a las 4 semanas disminuyó dicha expresión respecto a su grupo control, además de manera importante se puede ver en la Figura 23 que la expresión de la PGIS fue significativamente menor en el grupo diabético de 4 semanas comparado con el grupo diabético de 1 semana.

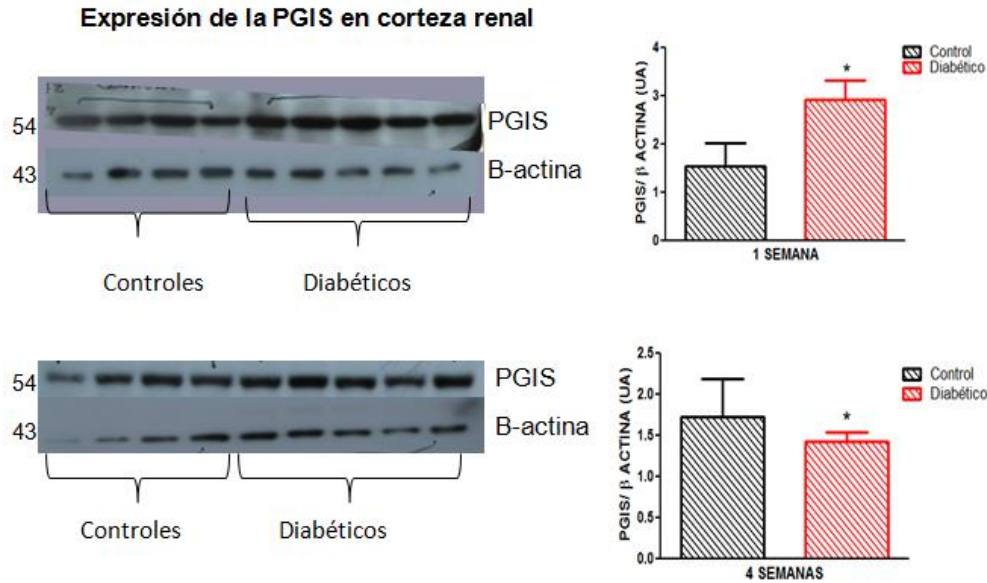


Figura 23. Expresión de la PGIS en corteza renal con 1 y 4 semanas de diabetes. En la figura de la parte de la izquierda se presenta un experimento típico de la inmunodetección de la PGIS, las barras representan los valores medios \pm EE de 4-5 ratas por grupo. * $p < 0.05$ diabético vs. control

8. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la diabetes se asocia con cambios en la expresión de la PGIS, lo que parece ser dependiente del tiempo de evolución de la enfermedad, ya que durante la primera semana de evolución de la diabetes se observó una mayor expresión de la PGIS en la corteza renal, mientras que a las 4 semanas la expresión de esta enzima disminuyó. Estos cambios sugieren que durante la diabetes se producen alteraciones en el tono vascular renal que pueden contribuir con la disfunción renal que se presenta durante este padecimiento. Los resultados presentados aquí demuestran que la diabetes con 1 semana de evolución produjo una mayor respuesta a fenilefrina mientras que a las 4 semanas no hubo cambios, lo que sugiere que la reactividad aumentada en la etapa inicial de la diabetes está influenciada por diferentes mecanismos como la movilización de Ca^{2+} o mayor acoplamiento de las proteínas contráctiles. El 2-PCPA redujo la respuesta vasoconstrictora de fenilefrina en ratas diabéticas de 1 y 4 semanas, lo que sugiere que el 2-PCPA puede estar actuando directamente sobre la capacidad de respuesta del músculo liso vascular. La inhibición de NO con L-NAME en ratas normales y diabéticas de 4 semanas no modificó la respuesta a fenilefrina, lo que sugiere que en lecho vascular renal el NO no regula la respuesta contráctil a la estimulación $\alpha 1$ -adrenérgica, sin embargo,

este resultado no descarta que en el grupo diabético se presente disfunción endotelial y por consiguiente una menor biodisponibilidad de NO.

Liberación basal de PGI₂ y NO en el tono vascular renal previo a la estimulación adrenérgica.

El tono vascular renal es regulado por el sistema nervioso autónomo y vías de señalización locales, controladas principalmente por las células endoteliales y células del músculo liso. Las células endoteliales tienen la capacidad de generar óxido nítrico y prostaciclina en condiciones basales y cuando son estimuladas por sustancias vasoactivas o por estímulos físicos (Nava y Llorens et al., 2019). Tanto el NO como la prostaciclina relajan los vasos sanguíneos. La prostaciclina se produce en la pared vascular y participa en el mantenimiento del tono vascular local (Nava y Llorens et al., 2019) y el NO derivado de endotelio tiene un papel esencial en la regulación basal y dinámica del diámetro de los vasos sanguíneos (Zhao et al., 2015).

En el presente estudio la inhibición de la sintasa de prostaciclina con 2-PCPA y la inhibición de las NOS con L-NAME incrementó el tono vascular basal de riñones perfundidos del grupo control y diabético en los tiempos de evolución estudiados (1 y 4 semanas), lo que sugiere que PGI₂ y NO se liberan de manera basal en la microvasculatura regulando el lecho vascular renal previo a una estimulación por algún agente vasoconstrictor. Lo que concuerda con Ruíz Leyja et al., 2013 quienes reportaron la liberación basal de PGI₂ en riñón perfundido de ratas hipertensas (SHR) y normotensas (WKY), además Kim, 2008 informó que PGI₂ se sintetiza abundantemente en el riñón y que junto con PGE₂ son las PGs más importantes en la regulación del tono vascular renal. En otro estudio, Qi et al., (2006) evaluó en médula y corteza de riñón de ratón la producción basal de prostanooides, siendo la PGI₂ la más abundante después de PGE₂.

De manera similar el NO liberado basalmente tiene una acción vasodilatadora constante que determina el flujo sanguíneo a los tejidos (Amezcuca et al., 1989). Aun cuando hay resultados contradictorios en donde se observa que la adición de L-NAME no tiene efecto sobre el tono basal en la arteria mesentérica de rata (Dora et al., 2000). Sin embargo, la medición de la formación de GMPc sugiere que hay un nivel basal bajo de liberación de NO (Plane et al., 1998). En conjunto, estos hallazgos sugieren que se produce la liberación basal de PGI₂ y de NO en el lecho renal.

Las complicaciones vasculares de la diabetes se asocian con un deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio, y existe evidencia que indica que la síntesis o la actividad de la PGI₂ y del NO se modifican durante esta patología (Fortes et al., 1983). El progreso de la diabetes se asocia con una disminución de los metabolitos vasodilatadores y un incremento de sustancias vasoconstrictoras (Drenjančević et al., 2016). El aumento del tono vascular provocado por la inhibición de la sintasa de PGI₂ en ratas con 4 semanas de diabetes fue menor comparado con el grupo control, lo que sugiere que hay una menor liberación basal de PGI₂ en ellas. Lo anterior concuerda con lo reportado por Peredo et al., (1999) en el lecho vascular mesentérico de ratas con una semana de diabetes no se modificó la producción de PGI₂ y PGE₂, pero su síntesis se redujo al 50% de los valores del grupo control, después de 4 semanas. La relación PGI₂/TXA₂ se emplea como índice para evaluar posibles complicaciones vasculares debido a que el cambio en la función vascular favorece la síntesis de metabolitos vasoconstrictores que se asocia a daño tisular y renal (Peredo et al., 2006). Por otro lado, la inhibición simultánea de la liberación basal de la PGI₂ y NO con 2-PCPA y L-NAME respectivamente, provocó un incremento del tono basal que fue ligeramente mayor al provocado por cada inhibidor, lo que indica que estos autacoides modulan el tono renal por vías independientes. La liberación basal de ambos metabolitos en condiciones fisiológicas depende de las enzimas constitutivas, cuya actividad parece estar regulada localmente, por la fricción causada por la sangre sobre la superficie endotelial. La eNOS constitutiva, localizada solo en el endotelio vascular, es la enzima que responde a éste estrés, mientras que la generación de prostaciclina depende de la actividad de COX-1 y COX-2 (Grabowski et al., 1985). En condiciones patológicas como la diabetes ambos mediadores se incrementan aún más por estímulos inflamatorios. Así, en el caso de la prostaciclina la COX-2 es la enzima involucrada en el proceso inflamatorio crónico de bajo nivel, mientras que el caso del NO se genera por la iNOS que normalmente no está presente en la pared del vaso (Moncada, 2006).

Efecto de la estimulación con agonistas

Un elemento clave para el control del tono vascular es la señalización dependiente de Ca²⁺ en regiones especializadas que conectan las células endoteliales con las células del músculo liso. Cuando estas últimas se estimulan con agonistas que aumentan el calcio intracelular, se libera NO y prostaciclina (de Nucci et al., 1998). El calcio es el paso

común, que se requiere para la activación de eNOS y la síntesis de NO y en la síntesis de prostaciclina para la activación de fosfolipasa A2. Cuando las células endoteliales liberan NO y prostaciclina, las cinéticas de liberación son diferentes para estas dos hormonas. El óxido nítrico se libera continuamente cuando las células del músculo liso se activan (Mitchell et al., 1992; Harrington et al., 2007), y en el caso de prostaciclina la liberación es de manera transitoria (Luckhoff et al., 1998; Mitchell et al., 1992). Las diferencias temporales en la liberación de NO y prostaciclina son el resultado de los requerimientos específicos de calcio, la activación de la fosfolipasa A2 requiere de una alta concentración de calcio resultante de la liberación de las reservas intracelulares, que ocurre sólo en los primeros minutos de la activación celular (Luckhoff et al., 1998). La eNOS tiene un requerimiento menor de calcio que la fosfolipasa A2 y se activa cuando los niveles de calcio intracelular están respaldados por la entrada extracelular del Ca^{2+} (Mitchell *et al.*, 2008).

Debido a que la contracción de las células del músculo liso depende de un aumento de los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} , los cambios en la señalización que modifican las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , tienen un impacto significativo en la determinación del tono vascular y la resistencia periférica; ya que de ambos depende el diámetro de las arterias de resistencia (Brozovich et al., 2016)

Efecto del KCl en riñones aislados de ratas diabéticas

En este estudio los riñones aislados se contrajeron en un principio mediante la activación de canales operados por voltaje con KCl 80 mM con la finalidad de comprobar la viabilidad de los vasos sanguíneos, la respuesta vasoconstrictora al KCl se produce a través de un mecanismo en el que no está implicado un receptor, la solución de cloruro de potasio permite la entrada de Ca^{2+} extracelular después de que se despolariza la membrana. En este estudio observamos que el efecto del KCl en ratas diabéticas de 1 semana de evolución fue mayor mientras que a las 4 semanas de diabetes la contracción que produjo el KCl disminuyó comparado con el control. Se han demostrado alteraciones en las vías que participan en la movilización de Ca^{2+} en tejidos vasculares de ratas diabéticas. En consecuencia, cualquier daño o modificación en la actividad de los mecanismos clave involucrados en controlar las concentraciones de Ca^{2+} contribuiría a la disfunción vascular al alterar la función de las células del músculo liso o de las células endoteliales (El-Najjar et al., 2017). El KCl puede causar sensibilización al Ca^{2+} por un

proceso que es regulado principalmente por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM), mediante la modulación de la actividad de fosfatasa de la CLM, así como también por la actividad de cinasa de CLM, y por eventos que suceden corriente abajo de la fosforilación de CLM. Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en el grupo diabético de 1 semana ya que; una mayor sensibilidad al Ca^{2+} y la sensibilidad de las proteínas contráctiles al este, podría generar una mayor contracción como lo que observamos en este estudio (Ratz et al., 2005).

También se evaluó la contracción por la estimulación directa del receptor $\alpha 1$ -adrenérgico, usando fenilferina, la estimulación de los receptores $\alpha 1$ acoplado a proteína G en el musculo liso activa la fosfolipasa C que causa la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP2). IP3 puede causar la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS) y DAG estimula la actividad PKC. Se sabe que fenilefrina también promueve la entrada de Ca^{2+} extracelular en las células del músculo liso vascular por dos canales principales de Ca^{2+} , el canal de calcio operado por voltaje (VOCC) y el canal de calcio operado por receptor (ROCC) (Leung et al., 2007)

Reactividad vascular en el tono vascular renal de ratas diabéticas

La diabetes mellitus influye en la reactividad vascular a varios agonistas contráctiles, al alterar directamente la contractilidad del músculo liso (Brozovich et al., 2016). En nuestros resultados el efecto vasoconstrictor de fenilferina incrementó en los animales diabéticos de 1 semana de evolución, mientras que a las 4 semanas la respuesta a fenilferina no se modificó; lo que sugiere que en la primera semana hay una mayor reactividad vascular a fenilefrina. La diabetes aumenta las respuestas contráctiles a la noradrenalina y fenilefrina de arterias grandes aisladas, como la aorta y la arteria mesentérica superior. Aunque, también hay resultados contradictorios de una reactividad disminuida o sin cambios a los agonistas α adrenérgicos en arterias aisladas incluidas las arterias mesentéricas y en el lecho mesenterio perfundido (Öztürk et al., 1996 ; Cooper et al., 2001). La duración de la diabetes influye en la respuesta a los agonistas del receptor $\alpha 1$ adrenérgico, la diabetes modifica la función de las vías del óxido nítrico y ciclooxygenasa importantes reguladores del tono vascular, al aumentar la producción de ROS, los que inactivan factores relajantes derivados del endotelio como el NO y la prostaciclina. Además de una mayor liberación de factores contráctiles como los metabolitos vasoactivos del ácido araquidónico, la PGH_2 y el TXA_2 y las ROS inducidas por la diabetes

perjudican la función vasodilatadora. Estas anomalías pueden contribuir a una mayor capacidad de respuesta a los agonistas vasoconstrictores en lechos vasculares de animales diabéticos. Por otra parte, el aumento del tono arterial en la diabetes puede ser ocasionado por una respuesta anormal del músculo liso, así como por la disfunción endotelial. El tiempo de exposición a la diabetes influye en la reactividad vascular a los agonistas, debido a que en nuestros resultados la reactividad incrementó en la primera semana, pero no se observaron cambios a las 4 semanas de diabetes. Se han propuesto otros mecanismos para el aumento de la reactividad a los agonistas de los receptores adrenérgicos α en las arterias diabéticas; por ejemplo, mayor afluencia de Ca^{2+} (Abebe *et al.*, 1994 ; Tam *et al.*, 1997), mayor actividad de las proteínas G y fosfolipasa C- β (Weber y Macleod, 1997) o mayor sensibilidad al Ca^{2+} a la proteína contráctil (Chow *et al.*, 2001).

La mayor respuesta a fenilefrina depende en gran medida del Ca^{2+} extracelular y es posible que en ratas diabéticas el aumento de la respuesta al Ca^{2+} extracelular en presencia de fenilefrina pueda ser el resultado de un aumento en la eficacia del acoplamiento de los receptores adrenérgicos α con su sistema de transducción de señales, que se sabe que influye en la movilización del Ca^{2+} extracelular o en la sensibilidad de los elementos contráctiles a Ca^{2+} , además el aumento de la activación de PKC que modula la concentración de Ca^{2+} intracelular que se libera del retículo sarcoplásmico o que entra por los canales de Ca^{2+} (Xavier *et al.*, 2003).

Efecto de la indometacina sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

Los prostanoides derivados de COX son reguladores del tono vascular renal, dependiendo del efecto vasodilatador o vasoconstrictor pueden modificar las concentraciones de Ca^{2+} en el músculo liso vascular. La inhibición de COX no produjo un cambio en la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina en riñones del grupo control y diabético de 1 semana de evolución, sugiriendo que las COX no participa en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Nacci *et al.*, (2009) quienes utilizaron el inhibidor no selectivo de COX la indometacina en lecho vascular mesentérico de ratones de 1 semana de diabéticos en la respuesta vasodilatadora a acetilcolina (Ach), aunque el efecto de la inhibición de las COX fue ligeramente mayor en ratones diabéticos en comparación con ratones control, esta diferencia no fue significativa.

La indometacina es un inhibidor no selectivo de las dos isoformas de COX con una mayor actividad inhibitoria hacia la COX-1 que la COX-2 (Kato et al., 2001). El bloqueo de ambas isoformas produce la inhibición de sus prostanoïdes vasoconstrictores como vasodilatadores, por lo que la inhibición no selectiva de ambas isoformas puede enmascarar las contribuciones opuestas individuales de los mediadores vasculares (Nacci et al., 2009).

Efecto de la tranilcipromina (2-PCPA) en el tono vascular renal en ratas con diabetes.

Es importante destacar que, en la regulación del tono vascular, el papel principal de los prostanoïdes y en particular de PGI₂ es modular la respuesta de otros agonistas vasoactivos (angiotensina II, norepinefrina entre otros), actuando como contra reguladores de los efectos contráctiles. Los resultados presentados en este estudio demostraron que el inhibidor de la PGIS el 2-PCPA disminuyó la respuesta contráctil a la fenilefrina en riñones de ratas con 1 y 4 semanas de diabetes, los riñones diabéticos fueron más sensibles a los efectos del 2-PCPA ya que la disminución del efecto vasoconstrictor de fenilefrina fue más evidente. El efecto del 2-PCPA fue inesperado ya que PGI₂ es una prostaglandina vasodilatadora cuya actividad se opone al efecto de los agentes vasoconstrictores, por lo tanto, al inhibir la síntesis de prostaciclina se esperaba una mayor respuesta vasocontráctil de fenilefrina. Ribback et al., (2012) reportaron la acción farmacológica del 2-PCPA en anillos de aorta de ratas con y sin endotelio sobre la contracción provocada por fenilefrina; ellos reportaron que el 2-PCPA relajó las aortas sin endotelio este efecto lo asociaron con la actividad hipotensora que es un efecto secundario frecuente del tratamiento antidepresivo a pesar de la administración de fármacos simpaticomiméticos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con informes anteriores en los que se ha informado que la tranilcipromina puede aumentar o disminuir la respuesta mediada por el receptor adrenérgico (Grana et al., 1991; Xiang y McNeil, 1992). Ferrer et al., (2004) informaron que en arterias mesentéricas de ratas SHR, la tranilcipromina redujo la respuesta a la noradrenalina, y este efecto fue más marcado a dosis más altas que a dosis bajas de noradrenalina. Otros investigadores han sugerido que cuando la PGIS se inactiva, el exceso de PGH₂ se desvía hacia otras vías metabólicas que conducen a una variedad de productos que en general, son perjudiciales para la función vascular (Gluais et al., 2005). Además, la PGIS se encuentra entre los

blancos más sensibles del peroxinitrito y se inactiva por concentraciones tan bajas como 50 nM (Zou et al., 2002; Schmidt et al., 2003).

Por otra parte, en la diabetes se produce una alteración en la producción de PGI₂ y se ha sugerido que en las primeras etapas de la diabetes hay una mayor liberación de PGI₂ mientras que en etapas avanzadas disminuye y la regulación fisiológica depende de metabolitos vasoconstrictores como TXA₂ (Cheng et al., 2002), esto está directamente relacionado con la expresión de la PGIS que es el paso clave para la síntesis de PGI₂. En nuestros resultados evaluamos la expresión de la PGIS en corteza renal de ratas diabéticas y observamos que en la primera semana de evolución la expresión de la enzima incrementó, mientras que a las 4 semanas disminuyó.

Efecto del L-NAME sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

El daño vascular que ocasiona la diabetes se debe en parte a que promueve la disfunción endotelial, esta condición se caracteriza por una menor biodisponibilidad de NO, secundaria a un aumento del estrés oxidativo que conduce a una vasoreactividad anormal. La inhibición de las sintasas de NO por L-NAME no provocó aumento del efecto vasoconstrictor a la fenilefrina en ratas normales y diabéticas de 4 semanas, lo que indica que el estímulo contráctil no se asocia con la liberación de NO en el lecho vascular renal de ratas. Existe evidencia del papel regulador del endotelio sobre las respuestas vasoconstrictoras mediadas por agonistas adrenérgicos α_1 . La liberación de NO por las células endoteliales durante la respuesta contráctil a los agonistas adrenérgicos o a otros agentes vasoconstrictores tiene un efecto inhibitorio sobre la vasoconstricción. Por lo tanto, la inhibición de la liberación de NO aumenta la respuesta a los agonistas del receptor adrenérgico α_1 . Los trabajos de Dora et al., (2000) demostraron que la estimulación del receptor adrenérgico α_1 en el músculo liso de la arteria mesentérica de rata influye en la liberación de sustancias vasodilatadoras como el NO, observaron que después de estimular el tejido con fenilefrina se generó una tensión, pero fue significativamente mayor cuando inhibieron NO con el L-NAME, lo que sugiere que normalmente la liberación de NO contrarresta la contracción. Así nuestros resultados indican que existen diferencias dependientes del lecho vascular en la modulación del NO de la actividad contráctil a la estimulación de los receptores adrenérgicos α_1 .

La disminución del efecto inhibitorio del L-NAME en ratas diabéticas, se ha asociado con una menor biodisponibilidad del NO, Nacci et al., (2009) evaluaron la disfunción endotelial

en el lecho vascular mesentérico de ratones con 8 semanas de diabetes y reportaron que ACh no tenía capacidad para provocar vasorelajación, lo que les indicaba una disfunción endotelial severa. En este estudio también evaluaron la expresión de la eNOS y observaron que en ratas diabéticas de 8 semanas aumentó la expresión, este dato no era consistente con la disminución de la vasodilatación mediada por NO en respuesta a ACh. Por lo tanto, se concluyó que la diabetes afecta la función de la eNOS y hay un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno que incrementan la eliminación de NO (Nacci *et al.*, 2009). Los cambios metabólicos que se presentan en la diabetes pueden afectar la producción de NO, el desacoplamiento de eNOS contribuye considerablemente a la disfunción endotelial, ya que no sólo reduce la producción de NO, sino que también potencia el estrés oxidativo preexistente. La situación se agrava aún más porque la sobreproducción de anión superóxido por eNOS desacoplado conduce a la formación de peroxinitrito, que a su vez agota la tetrahidrobiopterina (BH4), que es un cofactor esencial para la actividad de eNOS.

Participación del NO en el efecto del 2-PCPA sobre la contracción inducida por fenilefrina en riñones aislados de ratas diabéticas.

El mantenimiento del tono vascular depende del equilibrio de los mediadores endoteliales que influyen de manera integrada en la función normal de la vasculatura. Sin embargo, en la diabetes hay una producción alterada que modifica el tono normal. En particular, parece que cada mediador individual posee la capacidad de interactuar con los componentes de las rutas de síntesis y activación para los otros mediadores y, por lo tanto, existe una comunicación cruzada que regula la actividad de las diferentes vías que regulan la función vascular. Estas relaciones se han caracterizado mejor en términos de mantenimiento del tono vascular y ocurren en dos niveles: primero, en la regulación fisiológica del diámetro del vaso, y segundo, como un mecanismo compensatorio que se activa, cuando la expresión o actividad de un mediador alternativo es deficiente (Villar *et al.*, 2006). En nuestros resultados la inhibición de PGIS con el 2-PCPA disminuyó el efecto vasoconstrictor de fenilefrina en riñones diabéticos, lo que nos podría sugerir que ante la inhibición de la síntesis de PGI₂, el NO actúa de manera activa contrarrestando la nula producción de PGI₂ y por lo tanto participa manteniendo el tono vascular. Con la finalidad de determinar la participación del NO en el efecto del 2-PCPA, se colocó la combinación de inhibidores, el L-NAME no modificó el efecto del 2-PCPA sobre la respuesta vasopresora de fenilefrina en riñones perfundidos de los grupos normoglucémicos y

diabéticos de 1 y 4 semanas, indicando que el fármaco 2-PCPA involucra otros mecanismos que no dependen de NO en la disminución de la contracción de los agonistas adrenérgicos α_1 . Varios informes que demuestran la regulación positiva de PGI₂ en un entorno donde se suprimió la producción NO. Por ejemplo, Scotland et al., (2005) describieron que en arteriolas del músculo gracilis de ratones machos bloqueados para eNOS, la dilatación dependiente del endotelio se mantiene a pesar de la ausencia de NO y se demostró que esta compensación dependía de PGI₂ ya que la respuesta fue atenuada notablemente por el inhibidor de la COX, indometacina.

CONCLUSIONES

1. La liberación basal de prostaciclina y óxido nítrico regulan el tono vascular en ratas diabéticas y normoglucémicas. El tiempo de evolución de la diabetes se asocia con una reducción en la liberación basal de PGI₂.
2. En la primera semana de evolución de la diabetes la reactividad vascular a fenilefrina aumenta, así como el efecto vasoconstrictor del KCl, mientras que no se observan cambios en la respuesta a estos agentes en etapas más tardías de la enfermedad.
3. La inhibición no selectiva de las COX y de las NOS no altera la reactividad vascular renal a la fenilefrina en ratas normales y diabéticas en este modelo experimental.
4. El 2-PCPA disminuye la contracción inducida por fenilefrina en el grupo diabético, posiblemente por un efecto directo del fármaco sobre el músculo liso.
5. La expresión de la PGIS depende del tiempo de evolución de diabetes debido a que, en la primera semana esta incrementada, mientras que a las 4 semanas disminuye.

REFERENCIAS

Abebe W, Harris KH, MacLeod KM. 1994. Role of extracellular Ca²⁺ in the selective enhancement of contractile responses of arteries from diabetic rats to noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* 72(12):1544-1551.

American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 33(Suppl 1): 62–69.

Amezcuca JL, Palmer RM, de Souza BM, Moncada S. 1989. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*. 97(4):1119-1124.

Bagi Z, Erdei N, Papp Z, Edes I, Koller A. 2006. Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. *Pharmacol Rep*. 58:52-56.

Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M. 1994. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem*. 269(16):12173-12178.

Breyer MD, Breyer RM. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279(1):12-23.

Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. 2016. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacol Rev*. 68(2):476-532.

Cade WT. 2008. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*. 88(11):1322-1335.

Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. 2001. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol*. 167(5):2831-2838.

Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int*. 62(3):929-939.

Chow WL, Zhang L, MacLeod KM. 2001. Noradrenaline-induced changes in intracellular Ca²⁺ and tension in mesenteric arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 134(1):179-187.

Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. 2001. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens*. 14(5):475-486.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Lüscher TF. 2003. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 107(7):1017-1023.

D'Abril Ruíz-Leyja E, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Gallardo-Ortíz IA, Estrada-Soto SE, Ibarra-Barajas M. 2013. Differential role of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase -2 on renal vasoconstriction to α 1-adrenoceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life Sci*. 93(16):552-557.

de Nucci G1, Gryglewski RJ, Warner TD, Vane JR. 1988. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(7):2334-2338.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. 2004. Type 1 diabetes: recent developments. *Bmj*. 328(7442):750-754.

Dora KA, Hinton JM, Walker SD, Garland CJ. 2000. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 129(2):381-387.

Drenjančević, I., Jukić, I., Mihaljević, Z., Ćosić, A., Kibel, A. (2016). The metabolites of arachidonic acid in microvascular function. In *microcirculation revisited-from molecules to clinical practice*. Chapter 5. 101-133.

El-Najjar N, Kulkarni RP, Nader N, Hodeify R, Machaca K. 2017. Effects of hyperglycemia on vascular smooth muscle Ca²⁺ signaling. *Biomed Res Int*. 2017:3691349.

Ferrer M, Salaices M, Balfagón G. 2004. Endogenous prostacyclin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 506(2):151-156.

Fitzpatrick FA, Soberman R. 2001. Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest*. 107(11):1347-1351.

Fortes ZB, Garcia Leme J, Scivoletto R. 1983. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. *Br J Pharmacol*. 79(3):771-781.

Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. 2005. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 146(6):834-845.

Grabowski EF, Jaffe EA, Weksler BB. 1985. Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress. *J Lab Clin Med.* 105(1):36-43.

Grana E, Barbieri A, Lucchelli A. 1991. Potentiating action of tranylcypromine and moclobemide on the sympathomimetic activity of dopamine. *Pharmacol. Res.* 24(4): 337–343

Hadi HA ,Suwaidi JA. 2007. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag.* 3(6):853-876.

Han KH, Jung JY, Chung KY, Kim H, Kim J. 2006. Nitric oxide synthesis in the adult and developing kidney. *Electrolyte Blood Press.* 4(1):1-7

Hao CM, Breyer MD. 2007. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney Int.* 71(11):1105-1115.

Hao CM, Breyer MD. 2008. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 70:357-377.

Harrington LS, Carrier MJ, Gallagher N, Gilroy D, Garland CJ, Mitchell JA. 2007. Elucidation of the temporal relationship between endothelial-derived NO and EDHF in mesenteric vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3):1682-1688.

Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S. 2001. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 53(12):1679-1685.

Kautzky-Willer A, Harreiter J, Bancher-Todesca D, Berger A, Repa A, Lechleitner M, Weitgasser R. 2016. Gestational diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr.* 128(Suppl 2):103-112.

Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. 2010. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives. *Circ J.* 74(5):836-843.

Kim GH. (2008). Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors. *Electrolyte Blood Press.* 6(1):35-41.

Kim GH. 2008. Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors. *Electrolyte Blood Press.* 6(1):35-41.

Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E. 2003. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 52(10):2570-2577.

Klein T, Klaus G, Kömhoff M. 2015. Prostacyclin synthase: upregulation during renal development and in glomerular disease as well as its constitutive expression in cultured human mesangial cells. *Mediators Inflamm.* 2015(2015):1-9.

Komers, R., J.N. Lindsley, T.T. Omay, S. Anderson. 2007. Cyclooxygenase 2 inhibition attenuates the progression of nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34: (1-2):36-41.

Kreisberg JI, Patel PY. (1983). The effects of insulin, glucose and diabetes on prostaglandin production by rat kidney glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. *Prostaglandins Leukot Med.* 11(4):431-442.

Lamas S, Rodríguez-Puyol D. 2012. Endothelial control of vasomotor tone: the kidney perspective. *Semin Nephrol.* 32(2):156-66.

Lawler OA, Miggin SM, Kinsella BT. 2001. Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem.* 276(36):33596-33607.

Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y. 2007. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 153(5):846-857.

Li J, Chen YJ, Quilley J. 2005. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 314(2):818-824.

Li Y, Xia W, Zhao F, Wen Z, Zhang A, Huang S, Jia Z, Zhang Y. 2018. Prostaglandins in the pathogenesis of kidney diseases. *Oncotarget.* 9(41):26586-26602.

- Li, J., Y.J. Chen, J. Quilley. 2005. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 314: (2): 818-824.
- Lim AKh. 2014. Diabetic nephropathy-complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 7:361-381.
- Lim H, Dey SK. 2002. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology.* 143(9):3207-3210.
- Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. 2008. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci.* 1(13):5323-5344.
- Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R. 1988. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 95(1):189-196.
- Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. 2015. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. *J Diabetes Investig.* 6(1):3-15
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. 2008. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 93(1):141-147.
- Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. 1992. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 105(2):485-489.
- Moncada S. 2006. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1469):735-759.
- Mount PF, Power DA. 2006. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol.* 187(4):433-446.
- Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratù MR, Quon MJ, Montagnani M. 2009. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology.* 150(2):849-861.
- Narumiya S, FitzGerald GA. 2001. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 108(1):25-30.

Nasrallah R, Hébert RL. 2005. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(2): 235-246.

Nava E, Llorens S. 2019. The Local Regulation of Vascular Function: From an Inside-Outside to an Outside-Inside Model. *Front Physiol.* 10:729

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates JP, Hammes H-P, Giardino I, Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 404:787–790.

Nørregaard R, Kwon TH, Frøkiær J. 2015. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract.* 34(4):194-200.

Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. 2012. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J.* 27(4):269-273.

Oztürk Y, Altan VM, Yildizoğlu-Ari N. 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.* 48(1):69-112.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87(1):315-424.

Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. 2013. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 34(31):2436-2443.

Peredo HA, Rodríguez R, Susemihl MC, Villarreal I, Filingier E. .2006. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Auton Autacoid Pharmacol.* 26(4):355-360.

Plane F, Wiley KE, Jeremy JY, Cohen RA, Garland CJ. 1998. Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br J Pharmacol.* 123(7):1351-1358.

Qi Z1, Cai H, Morrow JD, Breyer MD. 2006. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension.* 48(2):323-328.

- Quadri SS, Culver SA, Li C, Siragy HM. 2016. Interaction of the renin angiotensin and cox systems in the kidney. *Front Biosci (Schol Ed)*. 1(8):215-226.
- Quilley J, McGiff JC. 1985. Arachidonic acid metabolism and urinary excretion of prostaglandins and thromboxane in rats with experimental diabetes mellitus. *J Pharmacol Exp Ther*. 234(1):211-216.
- Quilley J, Santos M, Pedraza P. 2011. Renal protective effect of chronic inhibition of COX-2 with SC-58236 in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300(6):2316-2322.
- Quilley J, Chen YJ. 2003. Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension*. 42(4):837-843
- Rahman S, Rahman T, Ismail AA, Rashid AR. 2007. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*. 9(6):767-780.
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 9(10):1057-1069.
- Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. 2005. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288(4):769-783.
- Reid HM, Kinsella BT. 2015. Prostacyclin receptors: Transcriptional regulation and novel signalling mechanisms. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 121(Pt A):70-82.
- Ribback S, Pavlovic D, Herbst D, Nedeljkov-Jancic R, Wendt M, Nedeljkov V, Bleich S, Frieling H. 2012. Effects of amitriptyline, fluoxetine, tranylcypromine and venlafaxine on rat vascular smooth muscle in vitro--the role of the endothelium. *J Physiol Pharmacol*. 63(2):119-125.
- Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. 2009. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 79(1): 29-36.
- Ruiz-Leyja EDA, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Gallardo-Ortíz IA, Estrada-Soto SE, Ibarra-Barajas M. 2013. Differential role of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase -2

on renal vasoconstriction to α 1-adrenoceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life Sci.* 93(16):552-557.

Sandoo A, van Zanten JJV, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 4: 302–312.

Schambelan M, Blake S, Sraer J, Bens M, Nivez MP, Wahbe F. 1985. Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 75(2):404-412.

Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, Przybylski M, Ullrich V. 2003. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem.* 278(15):12813-12819.

Scotland RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S, Andresen J, Nilsson H, Hobbs AJ, Ahluwalia A. 2005. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation.* 111(6):796-803.

Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, Hanafusa T, Haneda M, Ueki K. 2010. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 1(5):212-228.

Sena CM, Pereira AM, Seica R. 2013. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta.* 1832(12):2216-2231.

Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. 2009. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res.* 50(Suppl): 423-428.

Sosa-Luna CA, Astudillo-de la Vega H, Sánchez-González DJ, Martínez-Salas SG, Valdez-Espinosa R, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M. 2005. Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de ratas hipertensas. *Rev Sanid Milit Mex.* 59(1):32-50

- Spisni E, Bartolini G, Orlandi M, Belletti B, Santi S, Tomasi V. 1995. Prostacyclin (PGI₂) synthase is a constitutively expressed enzyme in human endothelial cells. *Exp Cell Res.* 219(2):507-513.
- Stitham J, Midgett C, Martin KA, Hwa J. 2011. Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol.* (2):24
- Tam ES, Ferguson DG, Bielefeld DR, Lorenz JN, Cohen RM, Pun RY. 1997. Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell Calcium.* 21(2):143-150.
- Tenorio L, Fermín A, Torres N, Juan C, Zarco OG, Díaz J, Julieta A, Pastelín HG, Valle M Leonardo. 2008. El óxido nítrico y las enfermedades cardiovasculares: cardioprotección versus cardiotoxicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 39(3): 39-48
- Vallon V, Komers R. 2011. Pathophysiology of the diabetic kidney. *Compr Physiol.* 1(3):1175-1232.
- Vázquez-Cruz, B., J. Rangel-Veladiz, D. Segura-Cobos, P. López-Sánchez, M. Ibarra-Barajas, D. Amato. 2013. Effect of cyclooxygenase-2 blockade on renal hypertrophy development during early diabetes mellitus. *Pharmacology & Pharmacy.* 4(3): 288-295.
- Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. 2006. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* 70(5):840-853.
- Vithian K, Hurel S. 2010. Microvascular complications: pathophysiology and management. *Clin Med.* 10(5):505-509.
- Weber LP, Macleod KM. 1997. Influence of streptozotocin diabetes on the alpha-1 adrenoceptor and associated G proteins in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(3):1469-1478.
- Wu KK, Liou JY. 2005. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(1):45-52
- Xavier FE, Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV. 2003. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascul Pharmacol.* 40(1):67-76.

Xiang H, McNeill JH. 1992. Influence of arachidonic acid metabolites on cardiac alpha 1 adrenoceptor response in diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70(5): 680–686

Yabuki A, Taniguchi K, Yamato O. 2010. Immunohistochemical examination of cyclooxygenase-2 and renin in a KK-A(y) mouse model of diabetic nephropathy. *Exp Anim.* 59(4):479-486.

Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M, Tanabe T. 2002. Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation.* 106(18):2397-2403.

Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, Ushikubi F. 2011. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther.* 129(2):195-205.

Zardi EM, Zardi DM, Cacciapaglia F, Dobrina A, Amoroso A, Picardi A, Afeltra A. (2005). Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *Int Immunopharmacol.* 5(3):437-459.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 129(2):83-94.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. 2002. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(1):198-203.