



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS EN  
LA HIPERTROFIA RENAL TEMPRANA EN  
LA DIABETES MELLITUS INDUCIDA POR  
ESTREPTOZOTOCINA.**

**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 :

Josseline Miriam Rangel Veladiz

Directora de Tesis: Dra. Beatriz Vázquez Cruz



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

2009



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**

A la honorable Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, por forjar mis estudios profesionales.

A la Dra. Beatriz Vázquez Cruz que en lo personal respeto y aprecio por el apoyo y la dedicación para la realización de este trabajo.

Al maestro David Segura Cobos por brindarme su amistad y ayuda constante

Al Dr. Pedro López Sánchez por su valiosa colaboración y el tiempo brindado para este trabajo.

A mis sinodales el Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, Guadalupe Martínez y Gloria Luz Paniagua por sus críticas y observaciones para mejorar el contenido de este trabajo.

A la Bióloga Ana Chávez por su tiempo y colaboración

## DEDICATORIA

Con cariño a mi madre Maribel Veladiz que con amor ha estado a mi lado todo este tiempo para impulsarme en la obtención de mis logros

A mi padre Mauricio Rangel que con amor y esfuerzo me ha dado su apoyo

A mis queridas hermanas Karen y Tania por su estimulación y amor

A mi abuelita Silvia Torres P. a quien quiero mucho y admiro por su voluntad y fortaleza pero sobretodo te doy gracias abue por tanto apoyo y amor que me has brindado

A la memoria de mis abuelitos Cástulo Veladiz, Francisco Rangel y tía Silvia Veladiz que velaron siempre por el bienestar de la familia, los llevo en el corazón

A mi tía Mireya Veladiz quien es una gran mujer, gracias por todo el apoyo chaparrita

A mis tíos Yolanda Veladiz y Arturo Veladiz que están al pendiente de mí, aprecio mucho sus consejos

Gracias a todos por demostrarme de tantas maneras lo mucho que me quieren y por que siempre he contado con ustedes

Por último quiero agradecer a Norberto Colín (changuito) a quien quiero con el corazón, por el apoyo que me ha dado en este tiempo

Paz, amor y libertad.

# ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 DIABETES MELLITUS .....	8
1.1.1 Definición .....	8
1.1.2 Insulina .....	8
1.1.3 Receptor de insulina .....	9
1.1.4 Alteraciones metabólicas de la DM.....	11
1.1.5 Clasificación e Incidencia .....	12
1.1.6 Modelo experimental de DM por estreptozotocina.....	15
1.1.7 Complicaciones crónicas de la DM.....	15
1.2 NEFROPATÍA DIABÉTICA .....	16
1.2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	16
1.2.2 Factores funcionales: Filtración glomerular .....	17
1.2.3 Hipertrofia glomerular .....	19
1.2.4 Microalbuminuria y proteinuria.....	20
1.2.5 Factores estructurales .....	21
1.2.6 Factores metabólicos.....	21
1.2.6.1 Glucosilación no enzimática de proteínas .....	21
1.2.6.2 Vía del poliol .....	22
1.2.6.3 Proteína cinasa.....	23
1.2.7 Factores hemodinámicos.....	23
1.2.8 Hipertrofia renal .....	24
1.3 CICLOOXIGENASAS .....	25
1.3.1 Características fisiológicas y bioquímicas. ....	26
1.3.2 Ciclooxygenasa 2 en el riñón.....	28
1.4 HIPÓTESIS .....	31
1.5 OBJETIVO .....	31
1.6 OBJETIVOS PARTICULARES .....	31
2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.1 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES .....	32
2.2 MEDICIÓN DE INDICADORES DE LA FUNCIÓN RENAL .....	33
2.2.1 Peso del riñón.....	33
2.2.2 Cociente DNA/Proteínas.....	33
2.2.2.1 Aislamiento de DNA por método de Trizol .....	33
2.3 ANÁLISIS DE ORINA Y PLASMA .....	34
2.3.1 Determinación de la concentración de glucosa sanguínea.....	34
2.3.2 Determinación de proteínas en orina.....	35
2.3.3 Determinación de prostaglandinas en orina .....	35
2.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA CORTEZA RENAL .....	35
2.4.1 Técnica de Hematoxilina y Eosina.....	35
2.5 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA COX-2 EN CORTEZA RENAL DE RATA.....	36
2.5.1 Homogenización .....	36
2.5.2 Determinación de proteínas por el método de Lowry .....	37

<u>2.5.3 Electroforesis</u> .....	37
<u>2.5.4 Transferencia</u> .....	38
<u>2.5.5 Bloqueo e incubación con anticuerpos</u> .....	38
<u>2.5.6 Revelado</u> .....	39
<u>3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u> -----	40
<u>4 RESULTADOS</u> -----	41
<u>4.1 Caracterización del modelo experimental de DM</u> -----	41
<u>4.1.1 Hiperglucemia</u> .....	41
<u>4.1.2 Pérdida de peso corporal</u> .....	41
<u>4.1.3 Ingesta de agua y alimento</u> .....	42
<u>4.1.4 Volumen urinario</u> .....	43
<u>4.1.5 Hipertrofia renal</u> .....	44
<u>4.2 Efecto del celecoxib sobre la glucemia</u> -----	45
<u>4.3 Efecto del celecoxib sobre el peso corporal</u> -----	47
<u>4.4 Efecto del celecoxib sobre la ingesta de agua</u> -----	47
<u>4.5 Efecto del celecoxib sobre la ingesta de alimento</u> -----	48
<u>4.6 Efecto del celecoxib sobre el volumen urinario</u> -----	49
<u>4.7 Efecto del celecoxib sobre la hipertrofia renal</u> -----	49
<u>4.7.1 Efecto del celecoxib sobre el área celular del túbulo proximal</u> .....	51
<u>4.7.2 Efecto del celecoxib sobre la proteinuria</u> .....	53
<u>4.8 Efecto del celecoxib sobre los niveles urinarios de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub></u> ---	53
<u>4.9 Efecto del celecoxib sobre la expresión de COX- 2</u> -----	55
<u>5 DISCUSIÓN</u> -----	57
<u>6 CONCLUSIONES</u> -----	62
<u>7 BIBLIOGRAFÍA</u> -----	63

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
<b>Figura 1</b> Estructura de la molécula de insulina.....	9
<b>Figura 2</b> Receptor de Insulina.....	11
<b>Figura 3</b> Aparato yuxtaglomerular.....	17
<b>Figura 4</b> Mecanismo de retroalimentación de la mácula densa.....	19
<b>Figura 5</b> Biosíntesis de prostaglandinas.....	25
<b>Figura 6</b> Esquema de tratamiento.....	32
<b>Figura 7</b> Glucemia de ratas control y diabéticas.....	41
<b>Figura 8</b> Peso de ratas control y diabéticas.....	42
<b>Figura 9</b> Ingesta de Agua de ratas control y diabéticas.....	42
<b>Figura 10</b> Ingesta de alimento de ratas control y diabéticas.....	43
<b>Figura 11</b> Volumen urinario de ratas control y diabéticas.....	43
<b>Figura 12</b> Peso del riñón de ratas control y diabéticas.....	44
<b>Figura 13</b> Peso renal corregido por el peso corporal de ratas control y diabéticas.. ..	44
<b>Figura 14</b> Glucemia basal de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib.....	45
<b>Figura 15</b> Glucemia a las 48 h de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	46
<b>Figura 16</b> Glucemia a los 7 días de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib.....	46
<b>Figura 17</b> Peso corporal de ratas control y diabética con y sin celecoxib.....	47
<b>Figura 18</b> Ingesta de agua de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	48
<b>Figura 19</b> Ingesta de alimento de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	48
<b>Figura 20</b> Volumen urinario de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	49
<b>Figura 21</b> Peso renal de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib.....	50
<b>Figura 22</b> Peso renal corregido por el peso corporal de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	50
<b>Figura 23</b> Cortes histológicos de la corteza renal de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	51

<b>Figura 24</b> Área celular del túbulo proximal de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	52
<b>Figura 25</b> Cociente DNA/proteínas de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	52
<b>Figura 26</b> Proteinuria de los grupos control y diabéticas con y sin celecoxib .....	53
<b>Figura 27</b> Excreción de PGI durante 24h de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	54
<b>Figura 28</b> Excreción de PGE <sub>2</sub> durante 24h de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	54
<b>Figura 29</b> Excreción de TBXA <sub>2</sub> durante 24h de ratas control y diabéticas con y sin celecoxib .....	55
<b>Figura 30</b> Expresión de la COX-2 de las ratas control y diabéticas con y sin celecoxib.....	56
<b>Tabla 1</b> Clasificación etiológica de la DM .....	14

## ABREVIATURAS

<b>COX</b> Ciclooxygenasa	<b>PGE<sub>2</sub></b> Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>COX-1</b> Ciclooxygenasa 1	<b>PGG<sub>2</sub></b> Prostaglandina G <sub>2</sub>
<b>COX-2</b> Ciclooxygenasa 2	<b>PGH<sub>2</sub></b> Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>DM</b> Diabetes mellitus	<b>PGI<sub>2</sub></b> Prostaciclina
<b>DM tipo1</b> Diabetes mellitus tipo 1	<b>PVDF</b> Fluoruro de polivinildieno
<b>DM tipo 2</b> Diabetes mellitus tipo 2	<b>RNA</b> Ácido ribonucleico
<b>DNA</b> Ácido desoxirribonucléico	<b>TXA<sub>2</sub></b> Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>HLA</b> Antígeno leucocitario humano	<b>TXB<sub>2</sub></b> Tromboxano B <sub>2</sub>
<b>IAA's</b> Auto anticuerpos contra insulina	<b>ROS</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>Kb</b> Kilobase	<b>RTG</b> Retroalimentación túbulo glomerular
<b>KDa</b> Kilo daltones	<b>SDS</b> Dodecil sulfato de sodio
<b>MAPK</b> Proteína Cinasa Activada por Mitógenos	<b>STZ</b> Estreptozotocina
<b>MD</b> Mácula densa	<b>TEMED</b> N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida
<b>ND</b> Nefropatía diabética	<b>TFG</b> Tasa de filtración glomerular
<b>PCK</b> Proteína cinasa C	<b>TFGβ</b> Factor de crecimiento transformante β
<b>PDGF</b> Factor de crecimiento derivado de plaquetas	

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 DIABETES MELLITUS**

### **1.1.1 Definición**

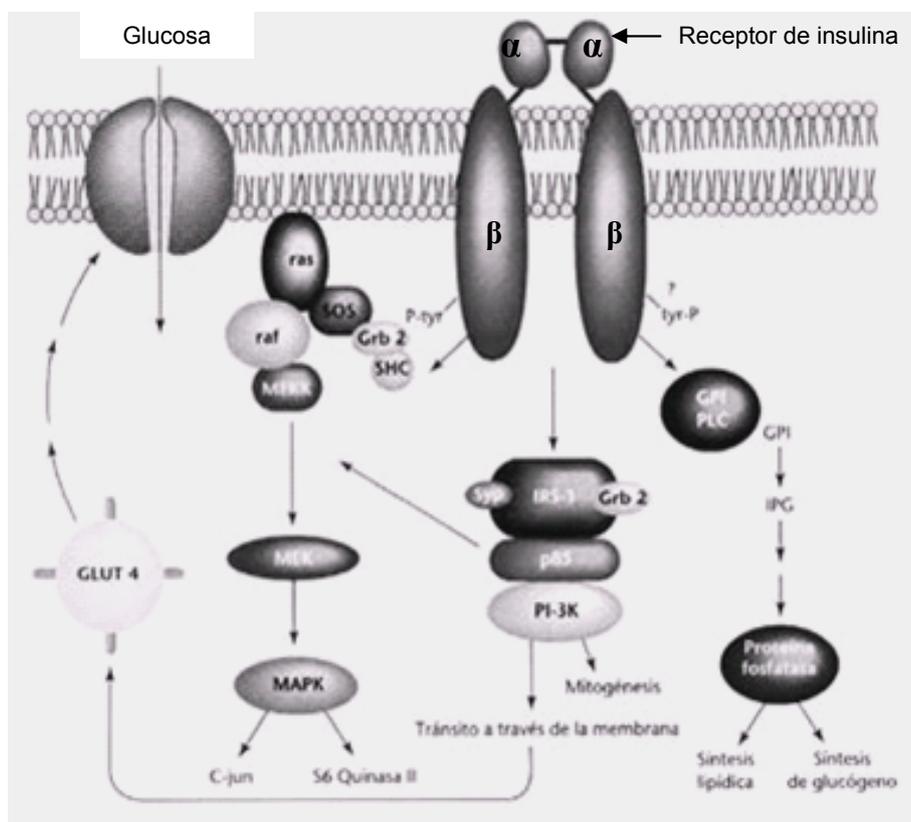
La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Se caracteriza por la presencia de hiperglucemia como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina, o en ambas. Los factores que se vinculan con mayor frecuencia a la aparición de la DM son: herencia, obesidad, afecciones pancreáticas, factores hormonales, infecciones y factores neurogénicos (Goodman y Gilman, 1996).

### **1.1.2 Insulina**

Los aspectos relacionados con la liberación y la acción de la insulina son importantes para comprender la patogenia de la diabetes. La insulina es una hormona anabólica constituida por 51 residuos de aminoácidos con peso molecular de 5.8 KDa (Figura 1). Esta hormona es sintetizada por las células  $\beta$  de los islotes del páncreas, a partir de un precursor de 110 aminoácidos llamado preproinsulina. Después de translocarse a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso, el péptido señal N-terminal de 24 aminoácidos de la preproinsulina se desdobra con rapidez hasta formar proinsulina, la cual se pliega y se forman puentes disulfuro intracatenarios e intercatenarios. La proinsulina se convierte en insulina en el complejo de Golgi, por hidrólisis de cuatro aminoácidos y del péptido conector quedando como hormona funcional con dos cadenas de péptidos (A y B) (Hunter-Garvey ,1998). Una vez que la célula es estimulada, la insulina madura se secreta junto con el péptido C. La



Los efectos fisiológicos de la insulina son mediados por su unión a una molécula receptora que se encuentra en la superficie de la membrana celular llamada *receptor de la insulina*, este receptor está presente prácticamente en todas las células del organismo, siendo los blancos clásicos hígado, músculo y tejido adiposo, también se le puede encontrar en eritrocitos, neuronas y células gonadales. El receptor de la insulina es una glicoproteína transmembrana compuesto por dos subunidades  $\alpha$  (135 KDa) extracelulares que contienen el dominio de unión de la insulina y dos subunidades  $\beta$  (95 KDa) transmembrana que poseen actividad tirosina. Las subunidades están unidas por enlaces disulfuro que forma un heterotetrámero  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  (Figura 2) (Seino, 1989). Una vez que la insulina se ha unido al receptor atraviesan la membrana plasmática esto conduce a la autofosforilación intramolecular rápida de varios residuos de tirosina, que estimula su actividad de tirosina cinasa hacia otros sustratos, entre ellos a las proteínas denominadas sustrato del receptor de insulina (IRS-1 a 4) (Cheatham-Kahn, 1995; Wang et al., 1996), lo que causa la asociación con proteínas que contienen los dominios de homología Src 2 (SH2) como p85, SYP o Grb2. La formación del complejo IRS1-p85 activa la PI 3-quinasa. Es probable que el receptor se acople por separado a la activación de una fosfolipasa C específica que cataliza la hidrólisis de las moléculas de glucosil-PI en la membrana plasmática. El inositol fosfato glucano (IPG), producto de la reacción anterior puede actuar como segundo mensajero, especialmente en lo que se refiere a la activación de fosfatasas de serina/treonina y la posterior regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos.



**Figura 2.** Esquema del modelo de acción de insulina a nivel celular. **IRS-1:** Sustrato-1 del receptor de la insulina, **SH:** Dominio de homología src, **MAP** cinasa: Proteína Cinasa activada por mitógenos; **MEK:** Cinasa de MAP, **GPI,** glucosil fosfatidil inositol, **PLC:** Fosfolipasa C.

#### 1.1.4 Alteraciones metabólicas de la DM

La insulina determina disminución de la glucemia a través del estímulo de su captación por las células. Por medio de esta acción promueve la glucogenogénesis, lipogénesis y glucólisis. Las hormonas antagonistas, glucagon y adrenalina determinan glucogenólisis y lipólisis. Cuando existe insuficiencia insulínica, las hormonas antagonistas no son contrabalanceadas,

cuya consecuencia es la hiperglucemia que sobrepasa la capacidad de reabsorción renal con la consiguiente glucosuria.

A continuación se produce poliuria por arrastre de agua y electrolitos del fluido tubular. También existe deshidratación del compartimiento intracelular por salida de agua debido a la hiperosmolaridad plasmática causada por la hiperglucemia. Las proteínas, especialmente las del músculo esquelético (calicolaminas, cortisol), son hidrolizadas para formar glucosa. Se favorece la lipólisis por falta de glucosa en el adipocito, además la lipólisis es la oferta de ácidos grasos libres al hígado para su oxidación a cuerpos cetónicos en el hígado (ácido acetoacético, beta hidroxibutírico y acetona) que pueden ser utilizados por las células como fuente de energía. En la forma más avanzada de la DM, la cantidad de cuerpos cetónicos producidos supera la capacidad de su oxidación celular y su acumulación en la sangre desencadena acidosis y agravamiento de la hiperosmolaridad. La cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la DM tipo 1 y 2; la diferencia radica en DM tipo 2 hay una hiperosmolaridad no cetónica ya que la pequeña cantidad de insulina producida es capaz de bloquear la producción de ácidos grasos a partir de la lipólisis, lo que evita la sobreproducción de cuerpos cetónicos (Fernández, 1996).

### **1.1.5 Clasificación e Incidencia**

La DM se ha dividido en dos grupos principales: DM tipo 1, conocida anteriormente como diabetes juvenil DM tipo 2, antes llamada del adulto. Sin embargo, la clasificación que actualmente se maneja, incluye cuatro entidades, considerando como base la etiología de la afección (tabla 1).

La DM tipo 1 se caracteriza por su origen autoinmune en el que se destruyen las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos. Esta autoinmunidad está asociada con alelos específicos HLA DR y DQ, la reacción autoinmunitaria tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales poco definidos que alteran las células beta y las hace inmunogénas (Robbins, 2004). Existen antígenos intracelulares contra los que reaccionan los anticuerpos, dentro de estos se encuentran los anticuerpos para insulina, la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) y autoanticuerpos contra tirosina fosfatasa (IA-2), los cuales están presentes en el 85-90% de individuos al detectarse inicialmente la DM (Atkinson y Maclaren, 1994). La DM tipo 1 se presenta en un 5-10% de los pacientes diabéticos, por lo general aparece en la infancia pero se manifiesta y agrava durante la pubertad; los pacientes dependen de la administración de insulina para sobrevivir.

La DM tipo 2 es un desorden caracterizado tanto por la resistencia a la insulina como por la falla de su secreción, ambos casos son influenciados por factores genéticos y exógenos (Robbins, 2004). Este tipo de diabetes no se diagnostica hasta después de varios años de que se tiene el padecimiento debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente por lo que en las primeras etapas a menudo no es grave hasta que se desarrollan los síntomas clásicos (polifagia, polidipsia y poliuria) (Harris, 1989; Zimmet, 1992). El tratamiento generalmente es progresivo, desde un control de la glucemia con dieta, hasta el uso de uno o más agentes hipoglucemiantes y finalmente, combinaciones de éstos con insulina (Moller, 2001). La DM tipo 2 afecta cerca de 90-95% de la población diabética. Una encuesta realizada en México en el 2000 por la Secretaría de Salud mostró que la prevalencia de DM tipo 2 en los

individuos de mas de 20 años es de 7.5% y de estos la prevalencia es ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres (7.8% y 7.2%, respectivamente) (ENSA 2000).

---

**I. Diabetes tipo 1** (Destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas que se caracteriza por deficiencia absoluta de insulina)

A. Mediada inmunologicamente

B. Idiopática

**II. Diabetes tipo 2** (se caracteriza por resistencia a la insulina, deficiencia relativa de la insulina, defectos en la secreción con resistencia a la insulina)

**III. Otros tipos específicos**

A. Defectos genéticos de la función celular

1. Cromosoma 12, HNF-1\_(MODY3)
2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2)
3. Cromosoma 20, HNF-4\_(MODY1)
4. DNA mitocondrial
5. Otros

B. Defectos genéticos en la acción de la Insulina

1. Resistencia a la insulina tipo A
2. Leprechaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Diabetes lipoatrófica
5. Otros

C. Enfermedades exocrinas del páncreas

1. Pancreatitis
2. Pancreatectomía
3. Neoplasias
4. Fibrosis quística
5. Hemocromatosis
6. Pancreatopatía fibrocalculosa

D. Endocrinopatías

1. Acromegalia
2. Síndrome de Cushing
3. Glucagonoma
4. Feocrocitoma
5. Hipertiroidismo
6. Somatostatina
7. Aldosteronoma
8. Otros

E. Inducida por químicos o drogas

1. Vacor
2. Pentamidina
3. Acido nicotínico
4. Glucocorticoides

5. Hormona tiroidea

6. Diazóxido
7. Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos
8. Tiazidas
9. Dilantin
10. Interferón- $\alpha$
11. Otros

F. Infecciones

1. Rubéola congénita
2. Citomegalovirus

G. Formas no comunes de DM medidas inmunológicamente

1. Síndrome de Stiff-man
2. Anticuerpos receptores anti-insulina
3. Otras

H. Otros síndromes génicos asociados con DM

1. Síndrome de Down
2. Síndrome de Klinefelter
3. Síndrome de Turner
4. Síndrome de Wolfram
5. Ataxia de Frederich
6. Corea de Huntington
7. Síndrome de Laurence-Moon-Bield
8. Distrofia miotónica
9. Porfiria
10. Síndrome de Prade-Willi
11. Otros

**IV. DM Gestacional**

---

**Tabla 1.** Clasificación etiológica de la DM (Modificado de Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2006).

### **1.1.6 Modelo experimental de DM por estreptozotocina**

El estudio de los eventos relacionados con la DM se ha realizado a través de diversos modelos experimentales, uno de los más utilizados por su reproducibilidad es el modelo por administración de estreptozotocina (STZ) (Szkudelski, T., 2001), este compuesto destruye de manera selectiva las células  $\beta$  del páncreas, fue aislado de *streptomyces acromegenes*. La dosis de STZ para los modelos experimentales de diabetes varía entre los 40 y los 65 mg/kg (Ganda et al., 1976), su vida media a pH 4.5 es de 10 a 15 min y la excreción es renal. La STZ entra a la célula  $\beta$  del páncreas a través del transportador GLUT-2 y produce alquilación del DNA y del ATP. El daño al DNA por la STZ induce a la polirribosilación del ADP que lleva a la depleción de NAD + y ATP. En la mitocondria estimula a la xantina oxidasa, aumentando la producción de especies reactivas de aniones superóxido, también inhibe el ciclo de Krebs y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria provocando disminución de la producción de ATP (Nukatsuka et al; 1990).

### **1.1.7 Complicaciones crónicas de la DM**

El aumento sostenido de la glucosa en la DM causa daño en diversos órganos como el riñón, ojos y sistema nervioso. Las alteraciones metabólicas y funcionales interactúan en forma sinérgica para el desarrollo de las complicaciones a largo plazo a nivel macrovascular (ateroesclerosis coronaria acelerada, aterosclerosis cerebrovascular acelerada, enfermedad vascular de extremidades inferiores acelerada) y microvascular (nefropatía, retinopatía, neuropatía).

## **1.2 NEFROPATÍA DIABÉTICA**

La nefropatía diabética es la principal complicación de la DM tipo1 y la DM tipo 2 (Sheetz, 2002) y es la primera causa de enfermedad renal terminal; alrededor del 33% de los casos de insuficiencia renal están asociados a ND (Sheetz, 2002). La ND afecta del 15-25% de los pacientes con DM tipo1, en los pacientes con DM tipo2 la prevalencia varía de 39-50% (De los Ríos et al., 2005). Los pacientes presentan esta complicación entre los 12 y 15 años de evolución de la diabetes, es raro que aparezca con menos de 10 años de evolución ó después de 30 años (Ortuño et al., 2001).

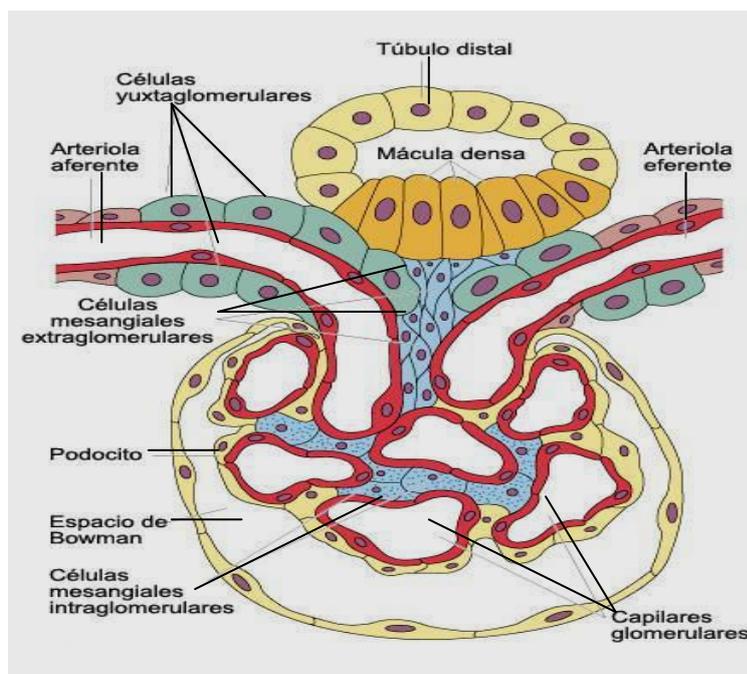
### **1.2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA**

La ND tiene algunas fases en su desarrollo, entre ellas están los cambios funcionales que ocurren en la nefrona, a nivel del glomérulo se produce hiperfiltración e hiperfunción glomerular, estos cambios se presentan aún antes que aparezcan los cambios clínicos medibles. Subsecuentemente se presenta aumento en el grosor de la membrana basal, hipertrofia glomerular y expansión mesangial, además del incremento de la excreción urinaria de albúmina (proteinuria) e hipertensión sistémica (Maurer et al., 1984).

Los mecanismos precisos por los cuales se desarrolla la ND no han sido completamente descritos pero se conoce que existe influencia genética además de alteraciones metabólicas y hemodinámicas. Las alteraciones hemodinámicas son principalmente por activación de sistemas vasoactivos como el sistema renina–angiotensina aldosterona (SRA-A) y el sistema de endotelina, en respuesta a la activación de estos sistemas se producen citocinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ -1) y aumento de la presión intraglomerular y sistémica.

## 1.2.2 Factores funcionales: Filtración glomerular

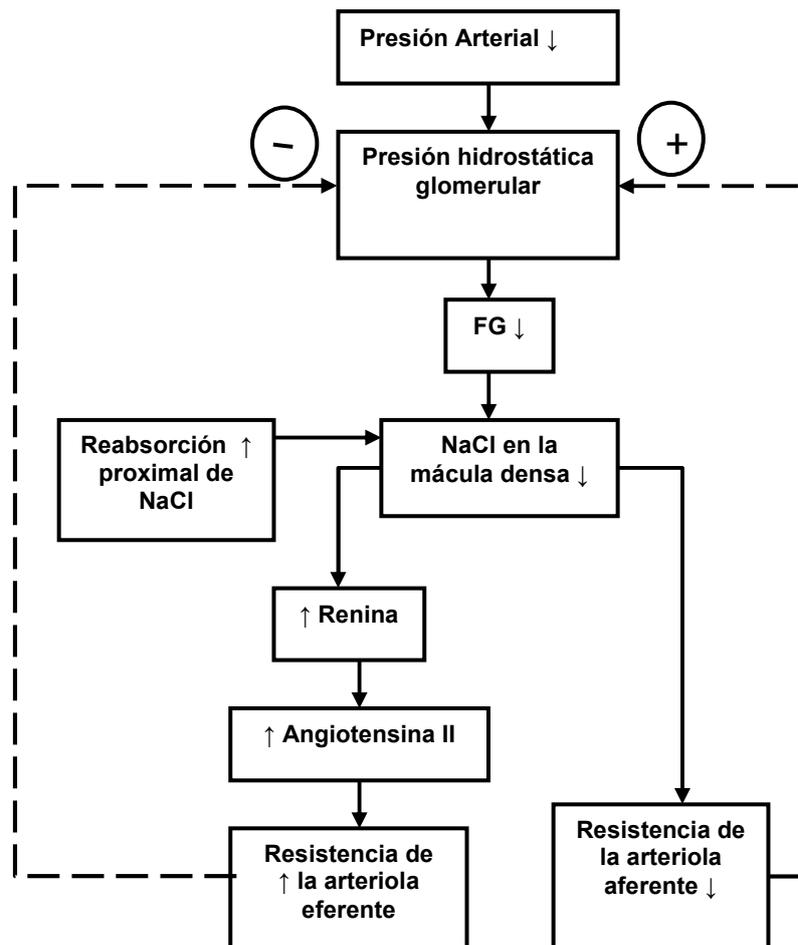
La sangre que se filtra a través del glomérulo hacia la cápsula de Bowman recibe el nombre de filtrado glomerular. La membrana de los capilares glomerulares se parece a la de otros capilares excepto en que tiene tres capas, en lugar de las dos habituales: 1) el endotelio capilar, 2) la membrana basal glomerular y 3) una capa de células epiteliales (los podocitos), que rodean a la superficie externa de la membrana basal de los capilares, estas capas en conjunto, forman la barrera de filtración glomerular que permite el paso de diferentes solutos de acuerdo a su tamaño (peso molecular  $< 5500$  Da) y a su carga (Figura 3). El volumen de plasma filtrado por unidad de tiempo se conoce como tasa de filtración glomerular (TFG) y depende de la presión hidrostática y de la presión coloidosmótica de las proteínas en la cápsula de Bowman. La microvasculatura renal tiene un sitio de control de resistencia en las arteriolas aferentes y eferentes lo que permite su relajación o constricción (Brenner et al., 2003).



**Figura 3.** Estructura del Aparato yuxtaglomerular

Una característica importante del riñón es su capacidad para mantener el flujo renal y la TFG relativamente constante, a esta propiedad se le conoce como autorregulación. El mecanismo más importante de autorregulación renal es la retroalimentación tubuloglomerular (RTG). El mecanismo de RTG consta de dos elementos que se encuentran en las arteriolas aferentes y eferentes y que actúan conjuntamente para regular la TFG, ambos elementos dependen de la disposición anatómica del aparato yuxtaglomerular, el cual está formado por las células de la mácula densa (MD) de la porción inicial del túbulo distal y las células yuxtaglomerulares situadas en las paredes de las arteriolas aferentes y eferentes. La mácula densa es un grupo especializado de células epiteliales situadas en los túbulos distales (Fig. 4) que guardan estrecho contacto con las arteriolas, las células de la mácula densa son sensibles a los cambios de volumen y a la concentración de solutos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en el túbulo distal; la disminución de la TFG puede retrasar el paso del líquido tubular en el asa de Henle, lo que va seguido de aumento de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la porción ascendente del asa de Henle y por tanto de reducción en las células de la mácula densa, lo que pone en marcha una señal emitida por la mácula densa que produce dos efectos 1) disminuye la resistencia de las arteriolas aferentes, con lo que se eleva la presión hidrostática glomerular y favorece la vuelta a la normalidad de la TFG (Figura 4), y 2) aumenta la liberación de renina lo que lleva a la formación de angiotensina II, la cual produce vasoconstricción de las arteriolas eferentes, lo que eleva la presión glomerular restableciendo la TFG (Figura 4). Por otro lado, en la membrana apical de las células de la MD se encuentra el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  que permite el paso de estos iones al espacio intracelular. El incremento de  $\text{Cl}^-$  despolariza la

membrana, activando canales a  $\text{Ca}^{++}$ , permitiendo la entrada de este ión a la MD, liberando de esta forma agentes parácrinos como la adenosina, tromboxano, etc. que contraen el músculo liso vascular. Los receptores  $\text{A}_1$  para adenosina en el músculo liso son importantes en esta respuesta, el efecto que se provoca es incremento en la resistencia arteriolar aferente y a su vez disminución de la TFG (Schnerman et al., 1998).



**Figura 4.** Regulación de la tasa de filtración glomerular mediante el mecanismo de retroalimentación de la mácula densa

### 1.2.3 Hiperfiltración glomerular

Los signos tempranos de hiperfunción e hiperfiltración glomerular resultan del incremento en la reabsorción en los túbulos proximales, esto origina que las células de la MD detecten menor cantidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ,

asimismo disminuye la presión hidrostática dentro del túbulo proximal lo que resulta en un incremento en el gradiente y presión hidrostática entre el glomérulo y el túbulo proximal; para normalizar este gradiente a través de la RTG se incrementa la TFG por vasodilatación de la arteria aferente y vasoconstricción de la eferente restaurándose los electrolitos y fluidos en el túbulo distal, pero al mismo tiempo se produce daño que contribuye a la ND (Vallon et al., 2003).

#### **1.2.4 Microalbuminuria y proteinuria**

La microalbuminuria de acuerdo a la clasificación de Morgensen (1984), es definida como la excreción urinaria de albúmina entre 20-200  $\mu\text{g}/\text{min}$ , que equivale a 30-300  $\text{mg}/24\text{h}$ . Un factor clave en la génesis de la microalbuminuria se relaciona con la alteración de la síntesis de mesangio y membrana basal, estos cambios son secundarios a una disminución en la síntesis de diversas macromoléculas aniónicas llamadas proteoglicanos de sulfato de heparán que originan pérdida de la carga negativa en la membrana y por consecuencia escape de albúmina (Vernier et al., 1992; Osterby, et al., 1993). La microalbuminuria es predictivo del desarrollo de lesión renal diabética, asociado además, a otras complicaciones diabéticas especialmente enfermedad cardiovascular (Cooper, 1998).

La proteinuria es definida como la excreción urinaria de albúmina mayor de 300  $\text{mg}/24\text{h}$ . La proteinuria persistente es acompañada de caída del filtrado glomerular, señalando el inicio del deterioro progresivo de la función renal (Morgensen, 1984).

### **1.2.5 Factores estructurales**

El tamaño de los riñones en la nefropatía diabética es variable. Al comienzo de la DM, se produce un aumento de la masa renal, del tamaño glomerular y tubular, y de la superficie capilar de filtración. Posteriormente, se reducen hasta llegar a la etapa de riñón terminal conforme avanza la DM y la ND (Mauer, 1984; Caramori, 2002).

En el glomérulo se produce un engrosamiento difuso de la membrana basal y se hace más permeable a las proteínas y otras macromoléculas, simultáneamente el material de la membrana basal se acumula en la zona mesangial, afectando los espacios vascular y urinario. Además, en la membrana basal se producen depósitos de fibrina y otros agregados que estimulan la formación de matriz mesangial (Steffes, 1992).

### **1.2.6 Factores metabólicos**

Existen varios mecanismos que intentan explicar cómo la hiperglucemia origina las complicaciones diabéticas especialmente la ND, entre estos están: Glucosilación no enzimática de las proteínas, vía del poliol y activación de la proteína cinasa C (PKC) (Brownlee, 2001; Rodby, 1997).

#### **1.2.6.1 Glucosilación no enzimática de proteínas**

La hiperglucemia favorece un proceso a través del cual la glucosa tiene una unión no enzimática con los grupos amino de las proteínas, como consecuencia se producen moléculas estables (conocidas como productos de glucosilación avanzada (PGA) que afectan las proteínas circulantes en la membrana celular haciéndola más permeable (membrana basal glomerular) y las proteínas intracelulares. Estos productos pueden a su vez, generar

formación de enlaces cruzados en moléculas que normalmente no lo harían, como la colágena, y con ello capturar moléculas como proteínas plasmáticas o intersticiales, lipoproteínas tipo LDL; o bien, pueden unirse a receptores de muchos tipos celulares, como endotelio, linfocitos, macrófagos y células mesangiales, induciendo cascadas de actividad biológica como migración celular, liberación de citocinas, factores de crecimiento y otras moléculas, que contribuyen al desarrollo de las complicaciones (Wellsknecht, 1995)

#### **1.2.6.2 Vía del poliol**

Otra vía dependiente de glucosa es la vía del poliol, que ha sido implicado en la patogénesis de la nefropatía diabética. La hiperglucemia activa vías metabólicas alternativas para el consumo de glucosa tal como la vía de la aldosa reductasa, la cual convierte la glucosa en sorbitol y fructosa los cuales quedan atrapados en el interior de la célula porque la membrana es impermeable a estos polioles, de esta forma se incrementa la osmolaridad intracelular (Lee, 1999., Iso, 2001). La acumulación del sorbitol altera la actividad de bombas iónicas y se cree que facilita la lesión de las células de Schwann y los pericitos de los capilares retinianos con la consiguiente neuropatía periférica y la formación de microaneurismas retinianos. Esto altera también la actividad de bombas iónicas como la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa e induce la acumulación de NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico con una caída en el NADPH, lo que exacerba el estrés oxidativo intracelular, con un incremento en la formación de las especies reactivas de oxígeno mitocondrial (Brownlee, 2001).

### **1.2.6.3 Proteína cinasa**

La Proteína cinasa C (PKC) se activa vía diacilglicerol (Ceolotto, 1999) y una de las respuestas que genera es la inhibición de la producción de óxido nítrico en el glomérulo, aumenta la actividad de endotelina 1, aumenta la producción y liberación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en células de músculo liso vascular, aumenta la producción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fibronectina y colágena tipo IV en células glomerulares y mesangiales e incrementa la producción del inhibidor-1 del activador de plasminógeno (PAI-1)(Du et al., 2000; Kuboki, 2000). La activación de PKC está relacionada con la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la cual es importante en la señalización intracelular para la proliferación e hipertrofia. También aumenta la producción de prostanoïdes vasodilatadores que llevan a la hiperfiltración e incremento de la permeabilidad a la albúmina (Haneda, 1997).

### **1.2.7 Factores hemodinámicos**

El aumento de la presión intraglomerular fue demostrada por Brenner y colaboradores (2003), como la primera anormalidad hemodinámica que se produce por la reducción de la resistencia arteriolar aferente y eferente con predominio de la primera. Los cambios hemodinámicos pueden liberar hormonas vasoactivas como angiotensina II, endotelina, óxido nítrico, prostaglandinas, cininas, y péptido auricular natriurético, que contribuyen a la manifestación de la ND (Tooke, 1995).

La concentración tisular de angiotensina II se encuentra aumentada en la DM lo cual aumenta la presión intraglomerular por su efecto predominante sobre la vasoconstricción de la arteriola eferente. Este hecho tiene especial

relevancia en la presión intraglomerular en la diabetes, en la que hay una pérdida de la autorregulación renal (adaptación del grado de vasodilatación-vasoconstricción de la arteriola aferente a la presión sistémica) (Christensen, et al, 1997). De este modo, la presión arterial sistémica se transmite al glomérulo, aumentando todavía más la presión intraglomerular. Como consecuencia de esta mayor presión intraglomerular se produce un aumento de la distensión glomerular, fenómeno con capacidad fibrogénica (Yasuda, et al, 1996), e hiperfiltración de albúmina y otras proteínas. Además de sus efectos hemodinámicos, la angiotensina II ejerce efectos nocivos sobre el riñón por su capacidad de aumentar la producción de radicales libres y diversas citocinas, entre ellas factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que intervienen en la fibrosis glomerular e intersticial (Mezzano, et al, 2003). También, disminuye la expresión de la nefrina, proteína interpodocitaria que reduce el paso transglomerular de proteínas (Doublier, et al, 2003).

### **1.2.8 Hipertrofia renal**

Se ha demostrado que entre las alteraciones más tempranas después del inicio de la diabetes se produce hipertrofia renal e incremento de la TFG (O'Bryan, 1997).

Un órgano puede aumentar su tamaño total debido al incremento en el número de células causado por proliferación estimulada o por apoptosis disminuida o por incremento en el tamaño de cada célula individual llamado hipertrofia. La hipertrofia celular sería definida como el agrandamiento de la célula debido a un aumento del contenido de RNA y proteínas sin cambios concomitantes en la síntesis del DNA.

La concentración alta de glucosa induce parcialmente a través del TGF $\beta$ , la expresión de 2 inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>. Estos inhibidores de CDK se unen a complejos ciclina/CDK e inhiben su actividad y por eso evitan el tránsito de las fases G1 a S del ciclo celular (Kamesaki, et al., 1998). La hiperglucemia activa también las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), las cuales a su vez fosforilan directamente p27<sup>Kip1</sup> en residuos de serina y prolongan la vida media de este inhibidor de CDK (Wolf, et al., 2002).

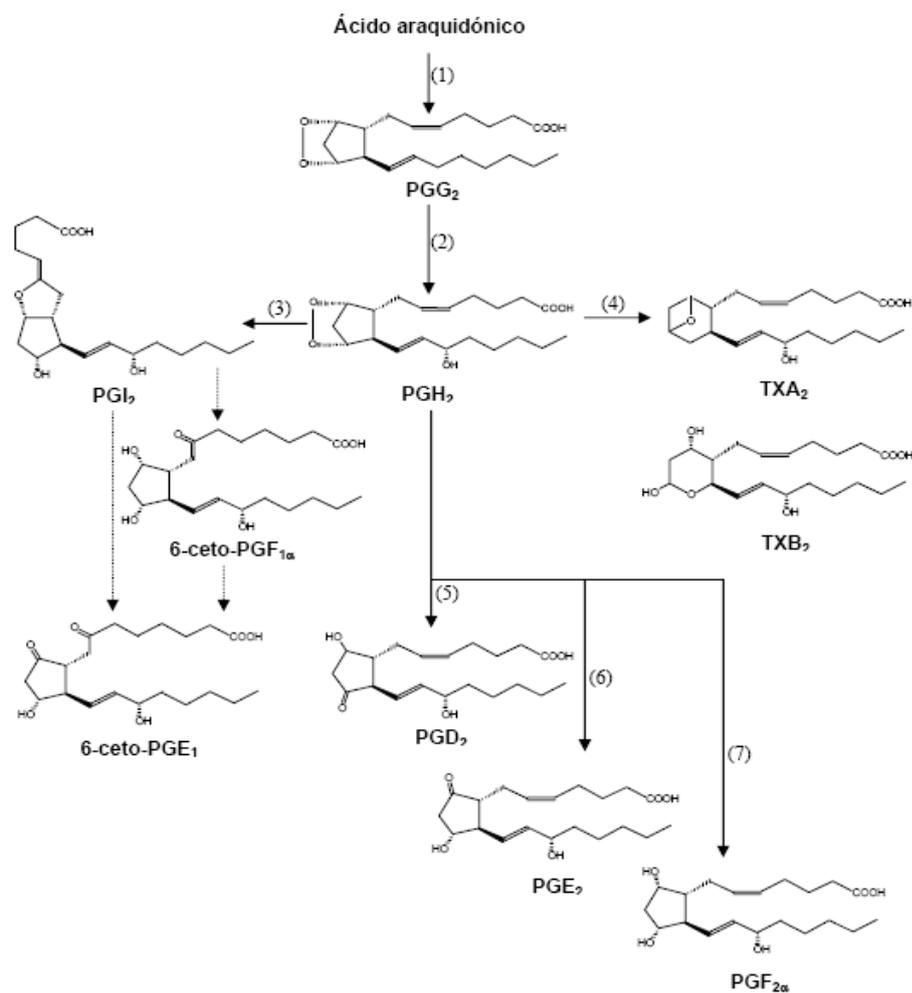
Bak demostró en el 2000 mediante una serie de experimentos de hidrodinámica renal que la hipertrofia precede a la hiperfunción renal (aumento de la absorción de solutos y cambios hemodinámicos) en un modelo de diabetes en ratas. Thomson y colaboradores en el 2001, demostraron que el aumento en la tasa de filtración glomerular se debe principalmente a un aumento en la reabsorción del túbulo proximal dado por la hipertrofia que la DM induce en el riñón. Por lo tanto se deben considerar factores hemodinámicos, metabólicos e hipertrofia renal, para entender como la diabetes afecta al riñón en estadios tempranos.

### **1.3 CICLOOXIGENASAS**

En 1971 Vane y colaboradores realizaron un trabajo sobre las prostaglandinas (PGs), leucotrienos y tromboxano, y su formación a partir de ácidos grasos no saturados por medio de la acción de endoperoxidasas, de las cuales una más tarde se denominaría ciclooxigenasa (COX). La COX es la enzima que cataliza la primera etapa de la conversión del ácido araquidónico en prostanoides, incluyendo PGs, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

### 1.3.1 Características fisiológicas y bioquímicas.

Las ciclooxigenasas son enzimas asociadas a la membrana, contienen un grupo Hemoprotoporfirina IX (DeWitt, 1988). Se ha demostrado que hay tres isoformas de ciclooxigenasas (COX-1 COX-2 y COX-3), COX-1 y COX-2 poseen aproximadamente 60% de aminoácidos idénticos (Simmons, et al, 1991), producen cinco prostanoideos bioactivos: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>) (Figura 5).



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

La COX-1 actúa como una enzima constitutiva que mantiene una producción de prostanoïdes que participan en procesos fisiológicos importantes, por ejemplo cataliza principalmente la reacción para producción de prostaciclina en la mucosa gástrica y tromboxano en riñón y plaquetas, por lo que participa de forma importante en la coagulación sanguínea, en la función renal, y mantiene la integridad gastrointestinal.

La COX-2 es una enzima inducible por citocinas, mitógenos y endotoxinas en células inflamatorias, aunque también se considera constitutiva en el riñón. Es la responsable de la producción de prostaglandinas que participan (Simmons, et al, 2004) en procesos fisiopatológicos como en el proceso inflamatorio, artritis, enfermedad de Alzheimer y cáncer (Dubois et al., 1998). La expresión de COX-2 es menor en los tejidos, pero es inducida por mediadores que incluyen citocinas, factores de crecimiento, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) (Yakamoto et al., 1995), interleucina -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Herschman, 1999; Hla et al., 1999) promotores tumorales, virus, iones y radiación UV (Kujubu et al., 1991).

La COX-3 deriva del gen que codifica la COX-1, pero es estructural y funcionalmente distinta. Se estableció su papel en la de producción de fiebre y dolor a nivel central y no de la inflamación (Simmons, et al., 2002)

Algunas de las diferencias entre las isoformas COX-1 y COX-2 incluyen que el gen que codifica para la COX-1 se encuentra en el cromosoma 9 de los seres humanos, mientras que el correspondiente a la COX-2 se encuentra en el cromosoma 1 humano. La COX-1 tiene un peso molecular de 65,000-70,000 daltones presenta 3 sitios de glucosilación a lo largo de su cadena (Nemeth et

al., 2001), la glucosilación de la asparagina 410 es esencial para sus actividades ya que promueve propiedades de desdoblamiento de proteínas. Esto sugiere que la glucosilación es postranscripcional, sin embargo, una vez que la COX-1 se ha desdoblado, los residuos glucosilados pueden ser removidos por endoglucosidasas.

La COX-2 tiene un peso molecular de 72,000 a 75,000 daltones tiene 4 sitios de glucosilación (Nemeth et al., 2001), es observada frecuentemente en múltiples estados glucosilados, que en el Western blot produce una doble o triple banda característica. La COX-2 es una enzima bifuncional, contiene un sitio catalítico, que permite la bioxigenación (agrega dos átomos de oxígeno al ácido araquidónico) para formar el endoperóxido PGG<sub>2</sub> y un sitio activo para peroxidasa el cual reduce la PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> (Figura 5).

Durante la DM se ha demostrado un aumento en la cantidad de COX-2 en algunas partes del riñón, en particular, en la MD, así como un aumento en la cantidad de radicales dependientes de la actividad de esta enzima (Khan et al, 2001; Tabatabaie et al, 2003). También, se ha demostrado el papel de esta isoforma (COX-2) en los cambios hemodinámicos renales (Komers et al, 2001; Harris, 2001).

### **1.3.2 Ciclooxigenasa 2 en el riñón.**

La COX-2 se encuentra en forma constitutiva en el asa de Henle, MD y podocitos (Harris, 1994). Por medio de técnicas de inmunolocalización e hibridación *in situ* su localización se ha descrito en microsomas de corteza y papila (Yang et al., 1998, 1999). En la médula renal la expresión de la COX-2 es un importante componente de la respuesta renal al estrés físico y a la deshidratación. Después de un estado de deshidratación, la COX-2 es inducida

significativamente, por activación de la vía del NF- $\kappa$ B (Hao et. al., 2000); otros estudios sugieren que es a través de MAP cinasa/JNK, ERK y p38 (Wojtaszek et. al., 1998).

En la corteza renal se ha documentado la expresión de la COX-2 en la MD y en las células adyacentes a la rama ascendente del asa de Henle en ratón, rata, conejo y perro (Guan et al., 1997; Harris et al, 1994; Khan et al 1998). Hay controversia con respecto a su localización en el ser humano, aunque en personas mayores de 60 años se localiza en ambos lugares de la corteza renal. La mácula densa está relacionada con la liberación de renina al detectar alteraciones en el cloruro luminal a través del cotransportador Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> (Cowly et al., 1994, 1995).

En la DM está aumentada la expresión de la COX-2, en estadios tempranos de la nefropatía, las prostaglandinas vasodilatadoras tales como la PGE<sub>2</sub> han sido implicadas en las alteraciones de la hemodinámica renal en humanos con DM tipo 1 y modelos experimentales (Schambelan et al., 1985; Yao et al, 2006). La PGE<sub>2</sub> es el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico por la COX-2 en el riñón (Bonvalet et al., 1987) contribuye en la hemodinámica renal glomerular y la reabsorción tubular de Na<sup>+</sup> y H<sub>2</sub>O durante el estrés fisiológico, y puede iniciar la producción de renina (Jensen et al., 1996). En el glomérulo la prostaglandina que se encuentra en mayor cantidad es la PGI<sub>2</sub> en humanos y la PGE<sub>2</sub> en ratas, aunque también se encuentran PGF<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>. Estas prostaglandinas participan en la regulación fisiológica de la hemodinámica renal y la absorción de solutos por el riñón, en la RTG después de la estimulación de la mácula densa, atenuando la respuesta mitogénica y en la liberación de renina. La PGE<sub>2</sub> interactúa con cuatro diferentes receptores

designados como EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>. Los receptores EP<sub>1</sub> y el EP<sub>3</sub> están acoplados a IP<sub>3</sub> y diacilglicerol, modulan el tono vascular y transporte epitelial, su activación provoca constricción del músculo liso. Los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>, contienen proteínas G acopladas a la adenilciclasa, permiten que la PGE<sub>2</sub> actúe como buffer previniendo la respuesta excesiva a perturbaciones fisiológicas y su activación se traduce en vasodilatación (Hao, 2000). La reactividad vascular de las arteriolas eferentes es controlada, al menos en parte, por la liberación de prostaglandinas permitiendo la autorregulación de la presión glomerular capilar (O 'Bryan, 1997).

Diversos estudios tanto en pacientes como en animales con diabetes mellitus experimental consideran a las prostaglandinas factores que contribuyen a la ND ya que reportan alteraciones en la síntesis renal de prostaglandinas que producen aumento y disminución de prostaglandinas vasodilatadoras. Esta disfunción de la capacidad vasodilatadora es una evidencia considerable de que las prostaglandinas están implicadas en la vasodilatación extrarenal y renal endotelial-dependiente. Los mecanismos por los cuales se desarrollan estos factores no se conoce del todo, además de que muchos de los estudios en modelos animales de DM utilizan tiempos de evolución de la DM más avanzados (mínimo dos semanas). Por esta razón en este trabajo se diseñó el estudio en un modelo de DM de siete días considerándolo como diabetes temprana, que permita estudiar la participación de las prostaglandinas en una fase temprana.

## **1.1 HIPÓTESIS**

Durante el desarrollo temprano de la diabetes, el aumento en la producción de prostaglandinas promueve un desequilibrio en la hemodinámica renal que contribuye al inicio de la aparición de la hipertrofia renal.

## **1.2 OBJETIVO**

Estudiar la participación de las prostaglandinas en la hipertrofia renal temprana en la diabetes mellitus producida por estreptozotocina.

## **1.3 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Reproducción del modelo de diabetes en rata
- Caracterizar el desarrollo de hipertrofia renal en ratas, en un modelo de diabetes mellitus por inyección de estreptozotocina.
- Determinar el grado de hipertrofia renal por cociente DNA/proteínas.
- Describir la participación de las prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> a través de su metabolito (6-ceto PGF1 alfa) y TXA<sub>2</sub> a través de su metabolito TXB<sub>2</sub>, en el desarrollo de la hipertrofia renal temprana en la diabetes mellitus.
- Determinar los cambios en la expresión de la COX-2 en la diabetes mellitus inducida por estreptozotocina con y sin tratamiento de celecoxib.

# 1 MATERIALES Y MÉTODOS

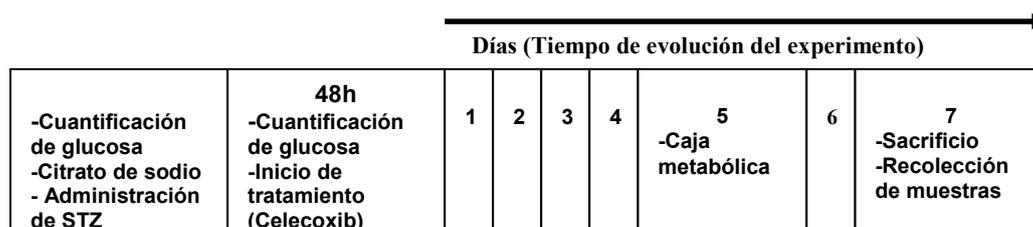
## 1.1 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-300g, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad con acceso libre a agua y alimento. Se les indujo la diabetes mellitus por administración de 65 mg/Kg de peso, vía i.p. de estreptozotocina (STZ) (S-0130 CHEMICAL CO, St. Louis, MO U.S.A.) disuelta en buffer de citrato 10mM, pH 4.5. También se administró celecoxib por vía oral para inhibir de manera selectiva a la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Los grupos experimentales se conformaron de la siguiente manera:

1. Ratas control a las cuales solo se les administró el buffer de citrato.
2. Ratas control (administración del Buffer de citrato) con tratamiento de celecoxib a la dosis de 10mg/kg de peso, diluido en el agua de beber.
3. Ratas a las cuales se les administró la STZ
4. Ratas a las cuales se les administró STZ y tratamiento de celecoxib a una dosis de 10mg/kg de peso, diluido en agua de beber.

El tratamiento de los diferentes grupos se llevó a cabo por un periodo de siete días a partir de la instauración de la hiperglucemia. Los animales de todos los grupos fueron pesados diariamente durante el tiempo que duró el experimento (7 días).



**Figura 6.**Esquema de tratamiento

## **1.2 MEDICIÓN DE INDICADORES DE LA FUNCIÓN RENAL**

Cuarenta y ocho horas antes de que las ratas fueran sacrificadas, se colocaron en jaulas metabólicas con la finalidad de que se adaptaran por un lapso de 24 horas, en las 24 horas restantes se colectó la orina, se registró el volumen urinario, el consumo de agua e ingesta de alimento. La orina se conservó a -80°C para posteriormente llevar a cabo el análisis de proteinuria por el método de Lowry (1951) y excreción de prostaglandinas mediante Kits de ELISA (Cayman, USA).

### **1.2.1 Peso del riñón**

Para la determinación de la hipertrofia renal, antes de sacrificar a los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/Kg, i.p) y se extrajeron los riñones, se registró su peso fresco. Asimismo, se determinó el peso del riñón corregido por el peso corporal total obteniéndose el peso renal por 100 g de peso corporal. Uno de los riñones se utilizó para las técnicas de biología molecular, el otro riñón fue sometido a la técnica histológica para determinar el área glomerular.

### **1.2.2 Cociente DNA/Proteínas**

#### **1.2.2.1 Aislamiento de DNA por método de Trizol**

El aislamiento del DNA se realizó con los procesos descritos en la técnica con el reactivo de Trizol (Invitrogen). De la corteza renal se tomaron aproximadamente 100mg de tejido para homogenizarlo en 1ml de Trizol con un homogenizador (Tissue Tearable, Biospec Products, Inc., U.S.A), enseguida se realizó la fase de separación para lo cual las muestras homogenizadas se incubaron 5 min., a temperatura ambiente en tubos de 1.5 mL para permitir la

disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se adicionaron 0.2mL de cloroformo, los tubos se agitaron vigorosamente con la mano por 15 seg, y se incubaron a temperatura ambiente de 2-3 min, posteriormente se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min, a 4°C. Enseguida se removió la fase acuosa que se formó sobre la interfase, a continuación se precipitó el DNA con 0.3 mL de etanol al 100%, las muestras se mezclaron por inversión y se centrifugaron nuevamente a 2000 x g por 5 min., a 4°C, posteriormente se removió el sobrenadante. La pastilla de DNA se lavó tres veces por 30 minutos con una solución compuesta de 0.1M de citrato de sodio en etanol al 10%, después ésta se suspendió durante 10 min., en 1.5 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 2000 x g por 5 min., a 4°C, el contenido de los tubos se deshechó y se redisolvió el DNA con 400 µL de NaOH 8mM, por último se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a 260 y 280nm.

### **1.3 ANÁLISIS DE ORINA Y PLASMA**

#### **1.3.1 Determinación de la concentración de glucosa sanguínea**

La concentración de glucosa en sangre se determinó en los diferentes grupos antes de la inducción de diabetes, a las 48h y siete días después de la inyección de STZ, para lo cual se dejó a las ratas en ayuno de 8 h, posteriormente por punción de la vena de la cola se tomó una gota de sangre y se colocó sobre una tira reactiva y se analizó mediante un glucómetro (ACCU-CHEK Active, Roche). Los valores de glucosa de 200 mg/dL o mayores se tomaron para considerar a las ratas como diabéticas.

### **1.3.2 Determinación de proteínas en orina**

La proteinuria se determinó por el método de Lowry (1951), las muestras se diluyeron con agua mili-Q 1:100 (grupos: control y control+ celecoxib) y 1:10 (grupos: diabéticas y diabéticas + celecoxib) se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L para cuantificar las proteínas totales. La curva patrón se realizó a partir de una solución estándar de 0.5 mg/mL de albúmina sérica bovina. Se construyó la curva estándar en un programa de Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

### **1.3.3 Determinación de prostaglandinas en orina**

La determinación de la excreción de prostaglandinas se realizó mediante el uso de Kits de ELISA (Cayman, USA). Las prostaglandinas que se cuantificaron fueron: prostaciclina ( $PGI_2$ ) que se cuantificó a través de su metabolito 6-ceto PG F1 alfa, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) que se cuantificó a través de su metabolito tromboxano B2 ( $TXB_2$ ).

## ***1.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA CORTEZA RENAL***

Uno de los riñones obtenidos, se diseccionó para obtener la corteza, ésta se conservó en formaldehído al 4% para teñirla a través de la técnica Hematoxilina-Eosina y medir el área de las células del túbulo proximal.

### **1.4.1 Técnica de Hematoxilina y Eosina**

Primeramente las muestras se lavaron con agua durante 30 min., para quitar el exceso de formaldehído, luego se deshidrataron con alcohol a porcentajes ascendentes por periodos de 20 min., (50, 60, 70, 80, 90, 96, 100

% y alcohol amílico), se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes del tejido en un microtomo (Leika) a un espesor de 7 $\mu$ .

Los tejidos cortados y colocados en los portaobjetos, se desparafinaron introduciendo las rejillas en una estufa de cultivo (marca BG Modelo E-33 durante toda la noche) después se sumergieron en dos cambios de xilol durante 5 min. Las muestras se fueron rehidratando en un tren descendente de alcoholes (100, 90, 80 y 70%) hasta agua corriente, posteriormente se tiñó con la Hematoxilina de Harris (colorante básico) por 5 min, se lavaron con agua corriente por 1 min., para virar de color carmesí a violáceo y enseguida se tiñeron con Eosina (colorante ácido) por 3 min.). Se continuó la deshidratación de las muestras utilizando el tren ascendente de alcoholes (70, 80, 90 y 100%), después se aclaró con dos cambios de xilol de 5 min. cada uno, por último se montaron las muestras con Entellan y se observaron los tejidos en un microscopio óptico (Motic) en un campo de 40x para determinar el área de las células del túbulo proximal renal en los diferentes grupos experimentales mediante el uso del software Motic Images. Los núcleos se tiñen de morado mientras que el citoplasma tiñe de naranja a rosa.

## ***1.5 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA COX-2 EN CORTEZA RENAL DE RATA***

### **1.5.1 Homogenización**

Se tomaron aproximadamente 100mg de tejido de corteza renal de rata a los cuales se les añadió 1ml de solución Tris HCL 0.1M,pH 7.4, con una mezcla de inhibidor de proteasas (minicomplete), enseguida se molió el tejido en frío con un homogenizador (Tissue Tearor, Biospec Products, Inc U.S.A) a una velocidad entre 10000 y 13000 rpm, el homogenizado se centrifugó a 4°C

a 5000 rpm por 10 minutos, para obtener el sobrenadante, el cual se separó en alícuotas de 200  $\mu$ L para su posterior uso.

### **1.5.2 Determinación de proteínas por el método de Lowry**

La concentración de proteínas se determinó con el método de Lowry (1951). Las muestras del homogenizado se diluyeron (1:100) para de ahí tomar los 200  $\mu$ L que se requieren para la muestra problema. La curva patrón se realizó a partir de una solución estándar de 0.5 mg/mL de albúmina bovina. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 750 nm. Finalmente se graficó la curva estándar, los valores de concentración de proteínas en las muestras se obtuvieron mediante un programa de Excel (Microsoft Office).

### **1.5.3 Electroforesis**

Por cada alícuota de 200  $\mu$ L de las muestras homogenizadas, se mezclaron 20  $\mu$ L de buffer de carga o solución Laemmli y 40  $\mu$ L de  $\beta$  mercaptoetanol, como agente reductor, después se hirvieron en un estándar heatblock a 90° C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se prepararon los geles de poliacrilamida al 10% (Gel de corrida) y al 6 % el gel concentrador.

Una vez que los geles solidificaron, se colocaron en la cámara de electroforesis mini Protean 3, Bio Rad con buffer de corrida, después se cargó en un carril por cada gel 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio Rad), en los demás carriles se cargaron 100  $\mu$ g de proteína de las muestras, de acuerdo con la cantidad de proteína

obtenida previamente con el método de Lowry. Posteriormente se realizó la electroforesis a 88 V por 120 min. (Fuente de poder Power Pac 200, Bio Rad).

#### **1.5.4 Transferencia**

Al término de la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a las membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) a 18 volts por 45 min. Para este paso las membranas se prehumedecieron con metanol absoluto por 5 minutos y después se sumergieron en solución TBST junto con los papeles filtro. El gel de acrilamida, la membrana de PVDF y los papeles filtro se ensamblaron evitando que quedaran burbujas entre las capas, para lo cual se rodó un tubo de ensayo en cada capa. Estos se colocaron en la cámara de electrotransferencia (Transblot SD semi Dry Transfer Cell, Bio Rad). Todos los pasos requieren del uso de guantes y pinzas.

#### **1.5.5 Bloqueo e incubación con anticuerpos**

Una vez terminada la transferencia se realizó el bloqueo de la membrana con leche (Svelty, Nestlé) al 5% en TBST durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante (Speci Mix, Thermolyne o un agitador orbital).

Después del bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de chivo contra COX-2 (72 kDa) (goat IgG, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:400); y de conejo contra  $\beta$ -actina (43 kDa) (rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:1000), durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Al término de la incubación, las membranas se sometieron a tres lavados de 10 min., con TBST, y se incubaron con el anticuerpo secundario específico para COX-2 (antigoat IgG, HRP conjugate,

Santa Cruz Biotechnology) (Dilución 1:1000) y  $\beta$ -actina (antirabbit (Dilución 1:10000), durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante, las membranas se lavaron nuevamente con TBST (tres lavados de 10 min.)

### **1.5.6 Revelado**

Para este proceso, las membranas se expusieron por 1 min., en una mezcla de Luminol (sustrato quimioluminiscente) (WBL, Santa Cruz Biotechnology): 1 mL de la solución A más 1 mL de la solución B. Una vez transcurrido el tiempo, las membranas se colocaron en la cámara de revelado (Biomax, Kodak, con pantalla intensificadora) luego se colocó la película (Hyperfilm, Amersham Biosciences), se cerró bien la cámara para exponer la película por un tiempo entre 1 a 3 min. A continuación se sacó la película para sumergirla en solución reveladora (Kodak Professional Dektol, Rochester, N.Y., U.S.A.), se enjuagó con agua y después se sumergió en solución fijadora (Kodak Professional Rapad Fixer, Rochester, N.Y., U.S.A.) por último se enjuagó nuevamente con agua y se dejó secar.

Finalmente se marcaron las bandas dejadas por el marcador de peso molecular y se realizó la densitometría de las bandas, con respecto al control interno ( $\beta$ -actina), para lo cual se escanearon las películas fotográficas con un equipo Fujifilm (Fla-5000). La intensidad de las bandas se determinó con el empleo de un software para análisis de imágenes (Multi Gauge, Fla-5000).

## **2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

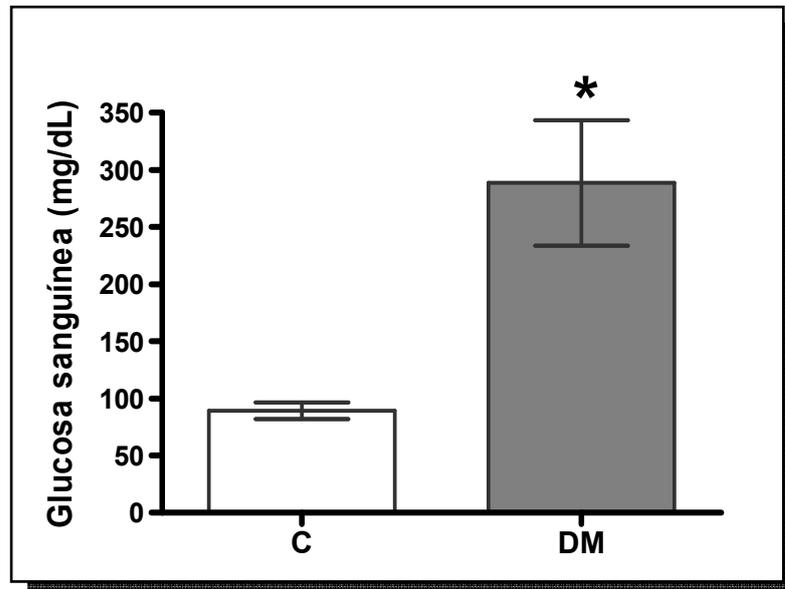
En todos los grupos experimentales se realizó el cálculo de la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). Los resultados que se obtuvieron en la caracterización del modelo de DM se analizaron con t de Student. Para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon con la prueba Post Hoc de Scheffe por medio del programa SPSS versión 10. Se consideró una diferencia significativa si  $p < 0.05$ .

# 1 RESULTADOS

## 1.1 Caracterización del modelo experimental de DM

### 1.1.1 Hiperglucemia

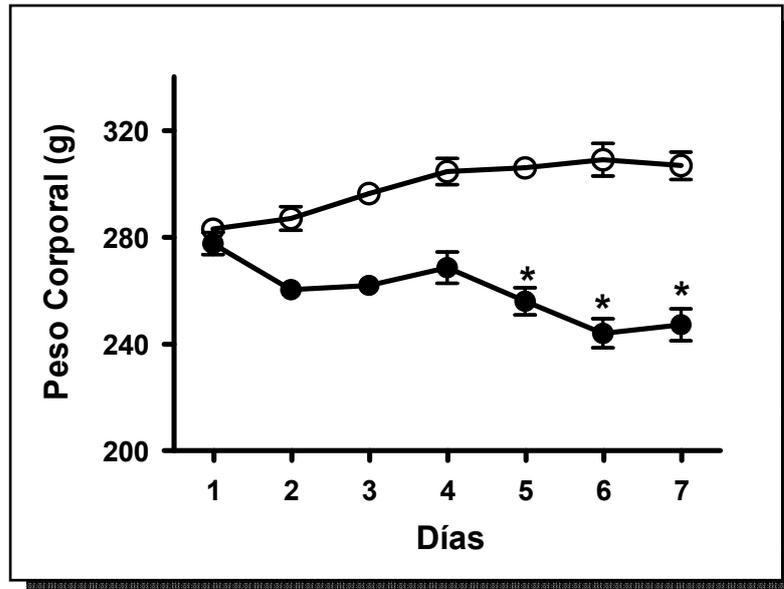
La concentración de glucosa sanguínea se cuantificó a los siete días de la inducción de la diabetes. Se observó que ésta aumentó en el grupo de ratas diabéticas con respecto al grupo control ( $288 \pm 59$  contra  $89 \pm 7$  mg/dL, respectivamente) (Figura 7).



**Figura 7.** Concentración de glucosa sanguínea a los 7 días de la inducción de la diabetes de ratas control (C) y diabéticas (DM) (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05

### 1.1.2 Pérdida de peso corporal

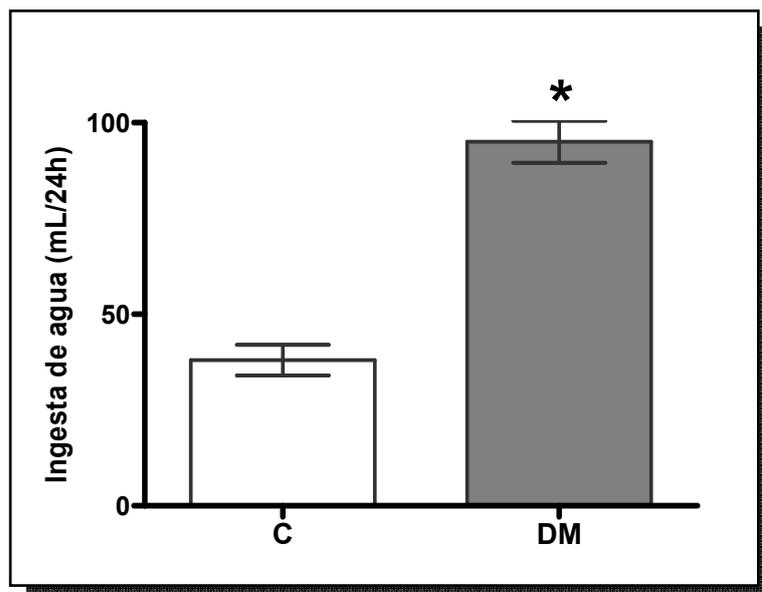
En el registro del peso corporal diario de los animales, se observó que a los siete días de la inducción de la diabetes, el grupo control aumentó de peso ( $307 \pm 5g$ ), mientras que el grupo de ratas diabéticas disminuyó a lo largo del estudio ( $247 \pm 6g$ ) (Figura 8).



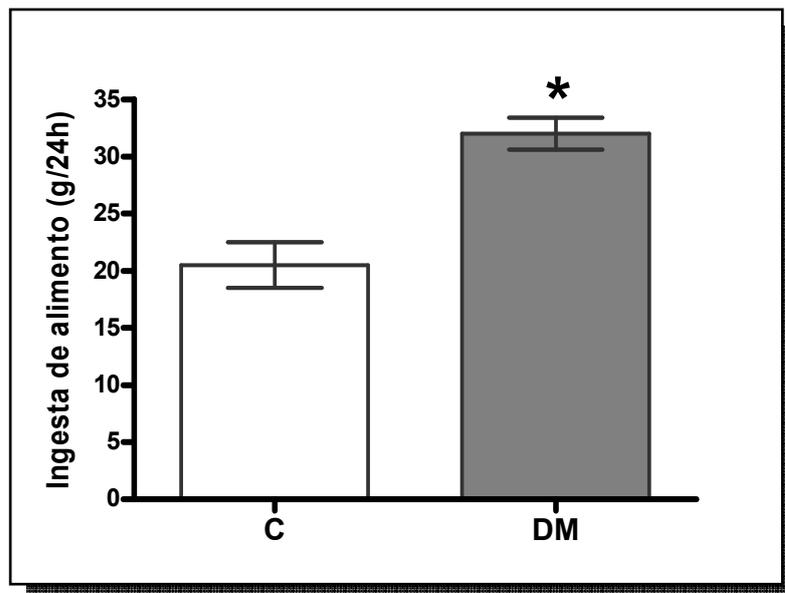
**Figura 8.** Peso corporal en un periodo de siete días posteriores a la inducción de diabetes de ratas control (○) y diabéticas (●) (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

### 1.1.3 Ingesta de agua y alimento

Con respecto a la ingesta de agua y alimento (Figuras 9 y 10), estas fueron menores en el grupo control en comparación con el grupo de ratas diabéticas (38.4 $\pm$ 4.3 mL y 20.5 $\pm$  2g contra 95.6 $\pm$  5.5 mL de agua y 32 $\pm$  1.4g de alimento, respectivamente).



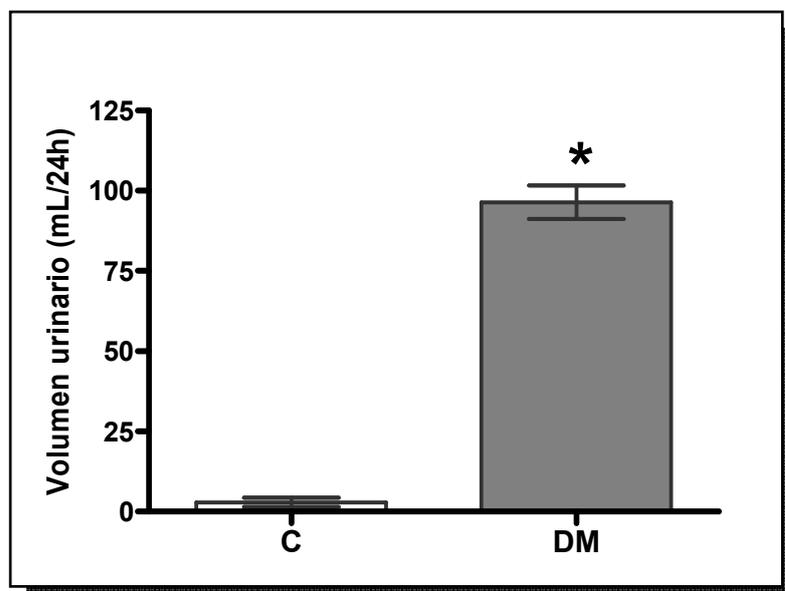
**Figura 9.** Ingesta de agua durante 24h, de ratas control (C) y diabéticas (DM), a los 7 días del tratamiento (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.



**Figura 10.** Ingesta de alimento durante 24h, de ratas control (C) y diabéticas (DM), a los 7 días del tratamiento (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

#### 1.1.4 Volumen urinario

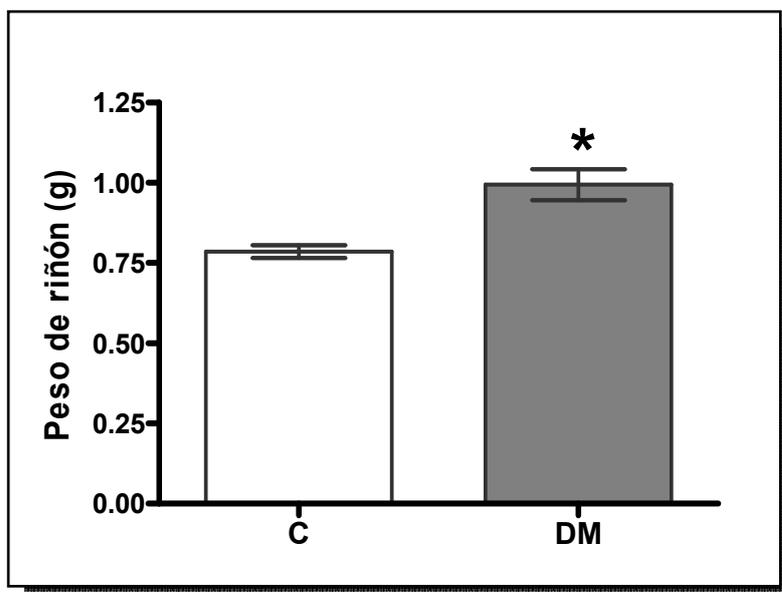
El volumen urinario de 24 h aumentó en el grupo de ratas diabéticas (96.4  $\pm$  5.2 mL) con respecto al grupo control (2.8  $\pm$  1.4 mL) (Figura 11).



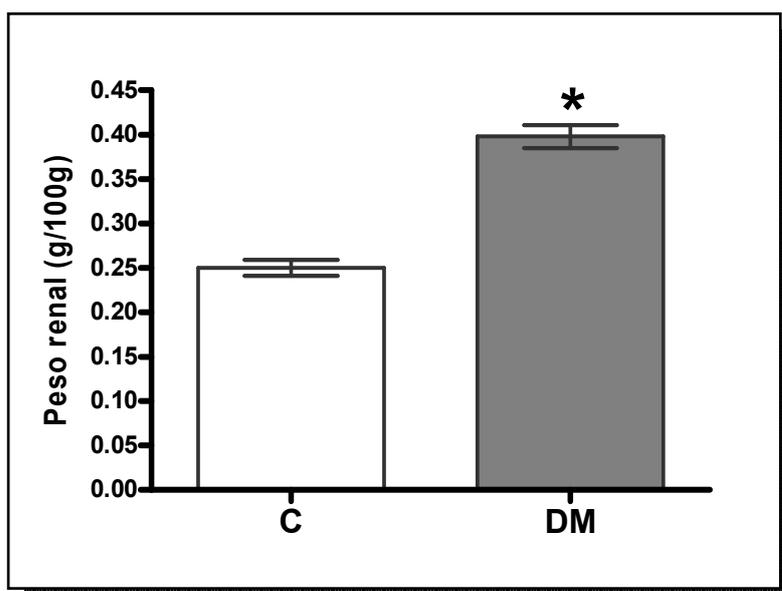
**Figura 11.** Registro del volumen urinario de 24h, de ratas control (C) y diabéticas (DM), a los 7 días de la inducción de la diabetes (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

### 1.1.5 Hipertrofia renal

Se obtuvo el registro del peso de los riñones encontrando un aumento de la masa renal (Figura 12) en las ratas diabéticas ( $0.99 \pm 0.05$ ) con respecto al grupo control ( $0.78 \pm 0.02$ ), esto se puede observar en el cociente del peso del riñón/ peso corporal ( $0.40 \pm 0.01$  contra  $0.36 \pm 0.01$  respectivamente) (Figura 13).



**Figura 12.** Registro del peso del riñón de ratas control (C) y diabéticas (DM), a los 7 días de la inducción de la diabetes (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

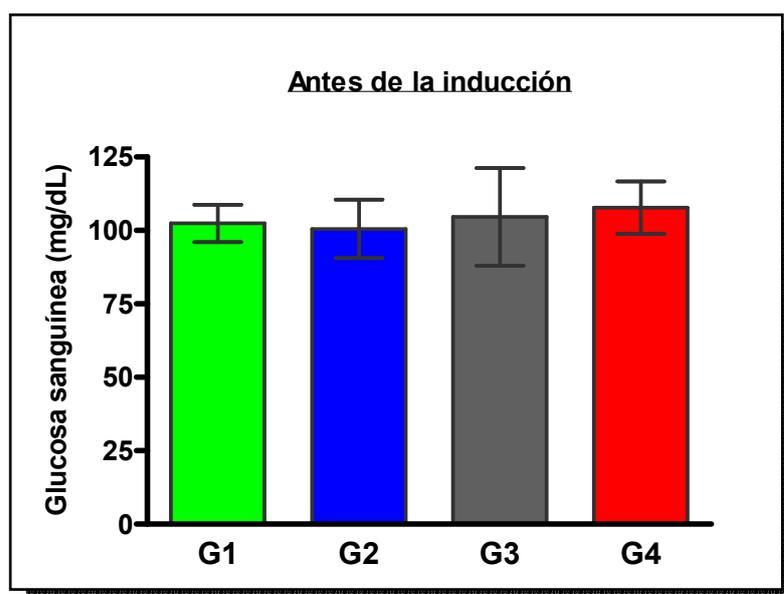


**Figura 13.** Peso del riñón corregido por el peso corporal de ratas control (C) y diabéticas (DM), a los 7 días del tratamiento (n=5). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

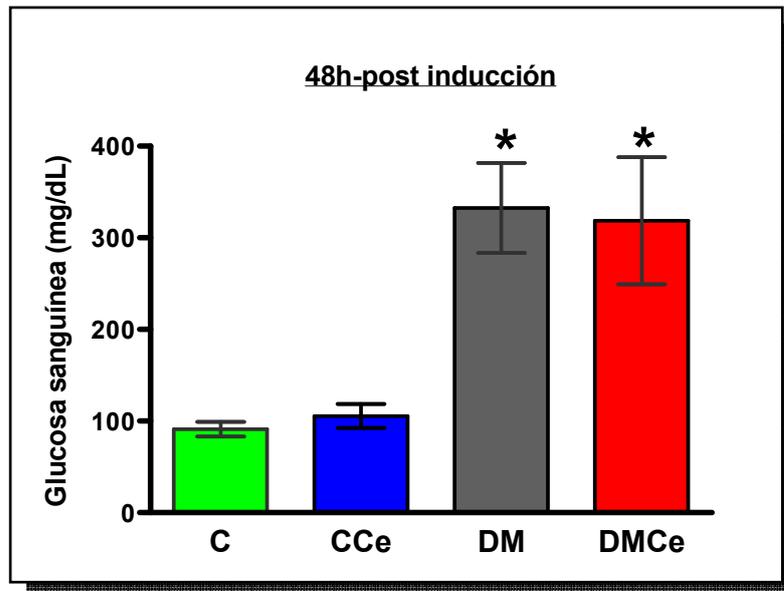
Una vez terminada la serie experimental anterior, se formaron nuevos grupos de ratas control, diabéticas y se incluyeron los grupos experimentales tratados con celecoxib. A estos grupos además, se les cuantificó el área celular del túbulo proximal, la proteinuria, el cociente DNA/proteínas, la excreción de prostaglandinas y la expresión de COX-2 en la corteza renal.

## 1.2 Efecto del celecoxib sobre la glucemia

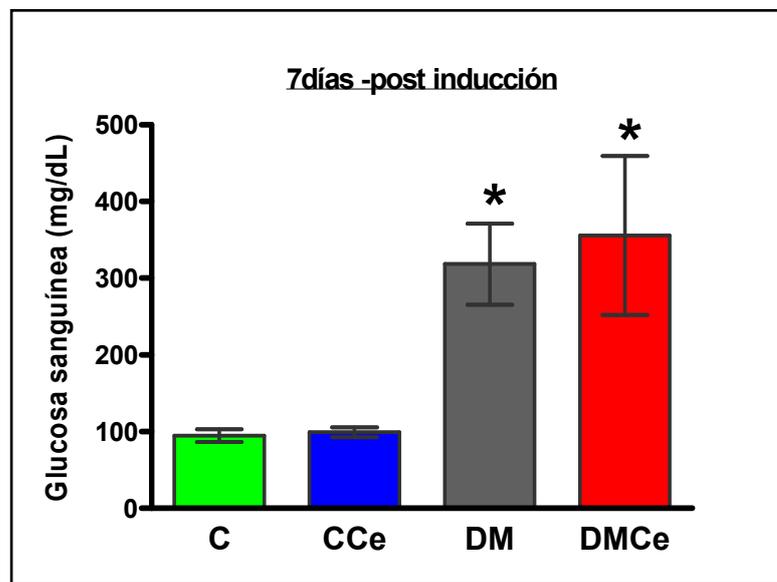
La concentración de glucosa sanguínea se cuantificó a diferentes tiempos. Los resultados mostraron que antes de la inducción de la diabetes con STZ, los niveles de glucosa no presentaron cambios considerables en todos los grupos experimentales (Figura 14), a las 48h después de la administración de SZT los grupos DM y DMCe registraron un aumento de la concentración de glucosa ( $332 \pm 49$  y  $318 \pm 69$ , respectivamente) con respecto a los grupos C y CCe ( $91 \pm 8$  y  $105 \pm 13$ , respectivamente) (Figura 15), a los siete días se observó que los grupos DM y DMCe mantuvieron un aumento de la glucosa con respecto a los grupos C y CCe (Figura 16).



**Figura 14.** Concentración de glucosa basal de los grupos de ratas control (G1), control celecoxib (G2), diabéticas (G3) y diabéticas celecoxib (G4) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05



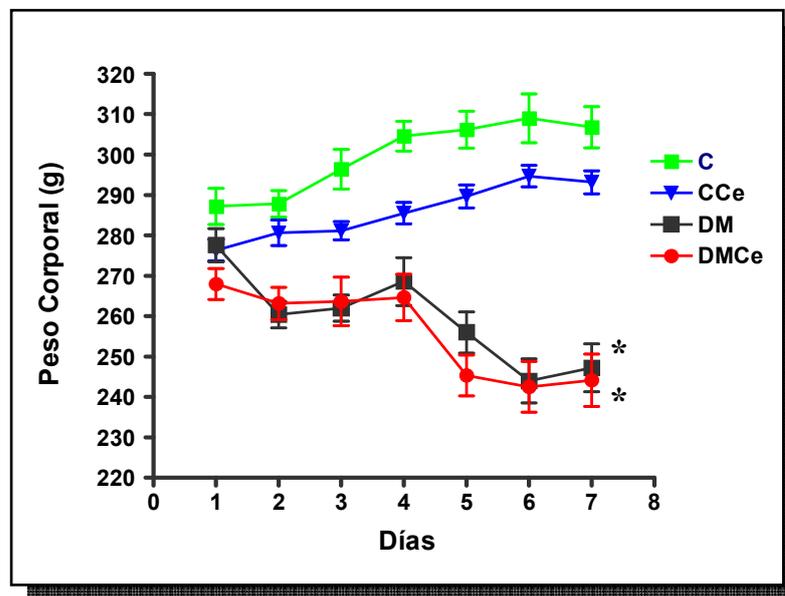
**Figura 15.** Concentración de glucosa sanguínea a las 48 horas de la inyección de estreptozotocina en los diferentes grupos de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05



**Figura 16.** Concentración de glucosa sanguínea a los 7 días de la inyección de estreptozotocina de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05

### 1.3 Efecto del celecoxib sobre el peso corporal

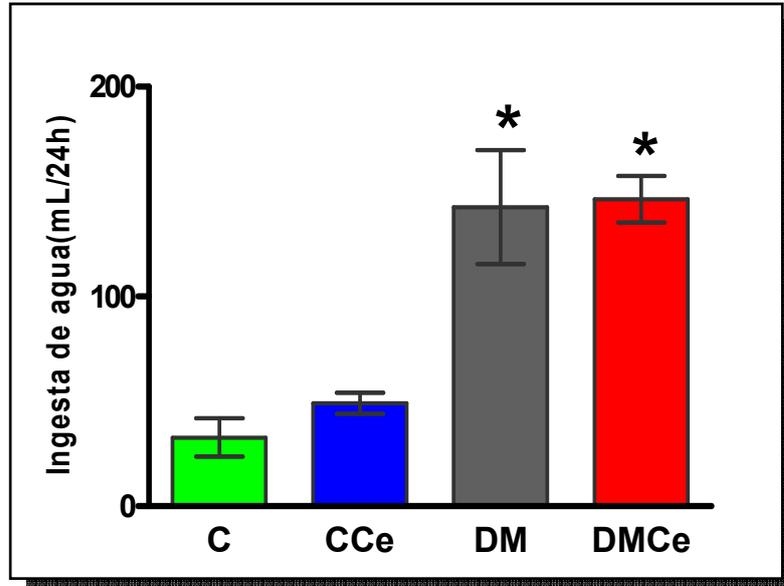
En la figura 17 se muestra el peso corporal de los grupos experimentales en un periodo de siete días. En los grupos DM y DMCe se observó disminución del peso, siendo el peso al final del experimento de  $247 \text{ g} \pm 5.9$  y  $244.2 \text{ g} \pm 6.4$  respectivamente, comparado con los grupos C y CCe ( $306.8 \text{ g} \pm 5.1$  y  $293.2 \text{ g} \pm 2.8$ , respectivamente).



**Figura 17.** Peso corporal diario de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), en un periodo de siete días posteriores a la inducción de diabetes mellitus. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

### 1.4 Efecto del celecoxib sobre la ingesta de agua

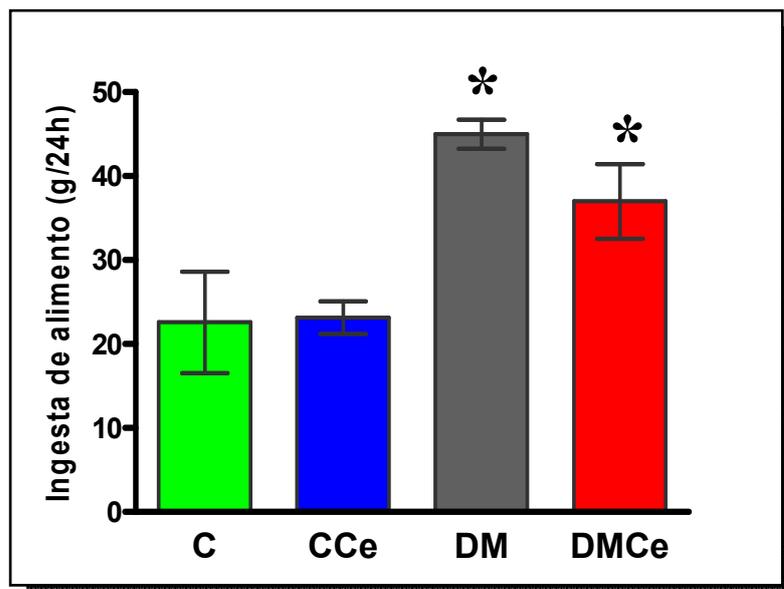
La ingesta de agua fue menor en los grupos C ( $33 \pm 9 \text{ mL}$ ) y CCe ( $49 \pm 5 \text{ mL}$ ) que en los grupos DM ( $142 \pm 27 \text{ mL}$ ) y DMCe ( $146 \pm 11 \text{ mL}$ ), figura 18.



**Figura 18.** Ingesta de agua durante 24h, de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), a los 7 días del tratamiento. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

### 1.5 Efecto del celecoxib sobre la ingesta de alimento

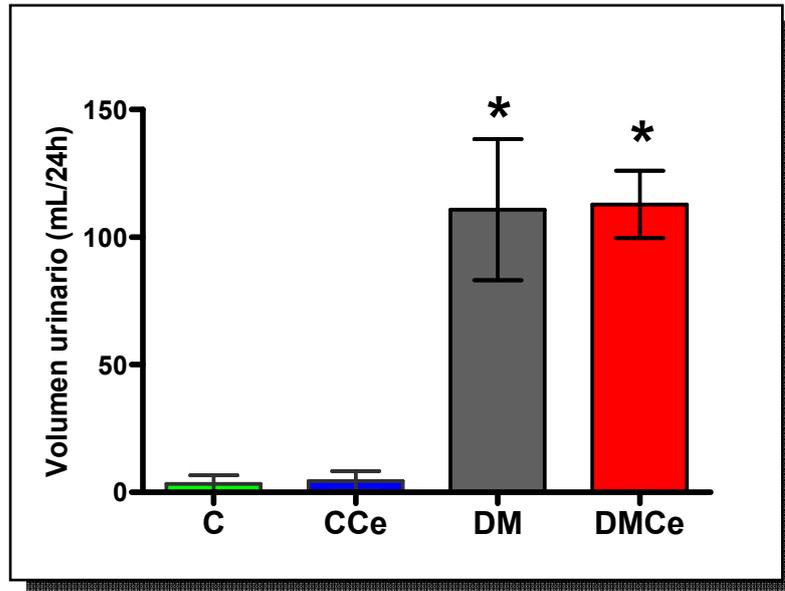
La ingesta de alimento en los grupos C y CCe fue  $22.6 \pm 6.1$  y  $23.1 \pm 2$  g respectivamente, mientras que en los grupo DM fue  $45 \pm 1.7$ g y en el grupo DMCe fue  $37 \pm 4.42$ g (Figura 19).



**Figura 19.** Ingesta de alimento durante 24 h, de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), a los 7 días de inducción de la DM. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

## 1.6 Efecto del celecoxib sobre el volumen urinario

El volumen urinario fue mayor en las ratas diabéticas con y sin tratamiento de celecoxib ( $112.8 \text{ mL} \pm 5.4$  y  $110.8 \text{ mL} \pm 12.3$ ) comparados con las ratas control con y sin celecoxib ( $4.4 \text{ mL} \pm 1.5$  y  $3.4 \text{ mL} \pm 1.5$ ) (Figura 20).

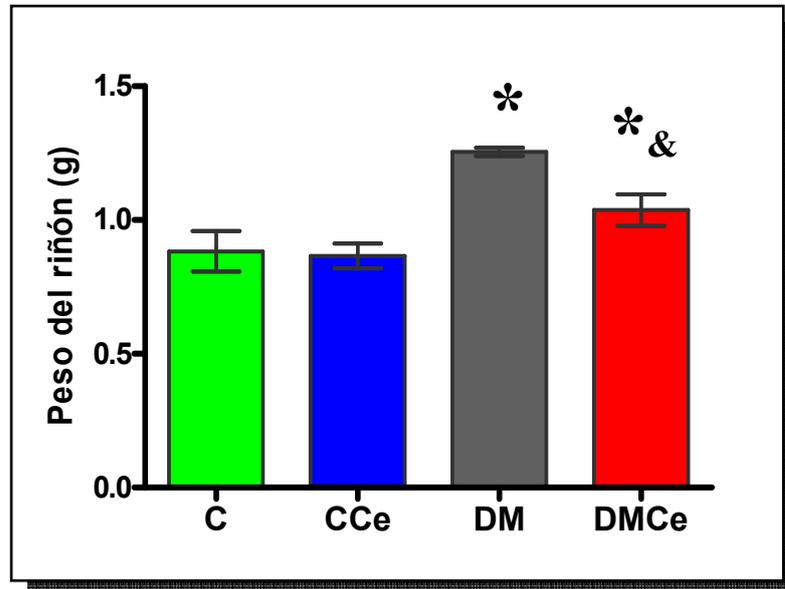


**Figura 20.** Volumen urinario durante 24 h, de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), a los siete días de la inducción de la DM. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

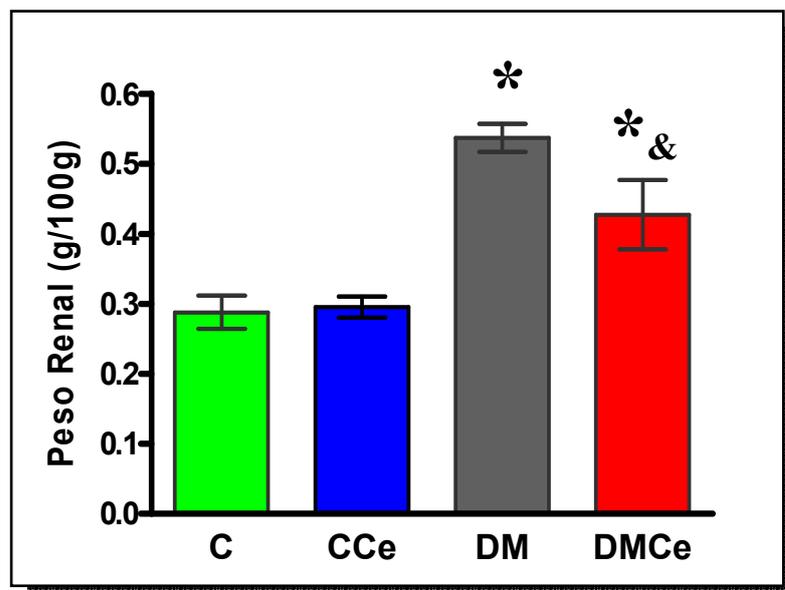
## 1.7 Efecto del celecoxib sobre la hipertrofia renal

Al determinar la hipertrofia renal mediante el registro del peso del riñón se encontró que en los animales diabéticos la masa renal aumentó. En el grupo de animales diabéticos tratado con celecoxib la masa renal disminuyó sin embargo fue mayor que lo registrado en los grupos C y CCe (Figura 21). Se pesaron ambos riñones de cada animal en el día del sacrificio y se realizó la corrección con el peso corporal total obteniéndose el peso renal por 100 g de peso corporal. Se encontró que el peso renal de las ratas diabéticas (DM) ( $0.54 \pm 0.02 \text{ g}$ ) es mayor que en los grupos control (C) ( $0.29 \pm 0.02 \text{ g}$ ) y control

con celecoxib (CCe) ( $0.29 \pm 0.01$ ) y que el tratamiento de las ratas diabéticas con celecoxib (DMCe) lo disminuyó ( $0.43 \pm 0.05$ ) (Figura 22).



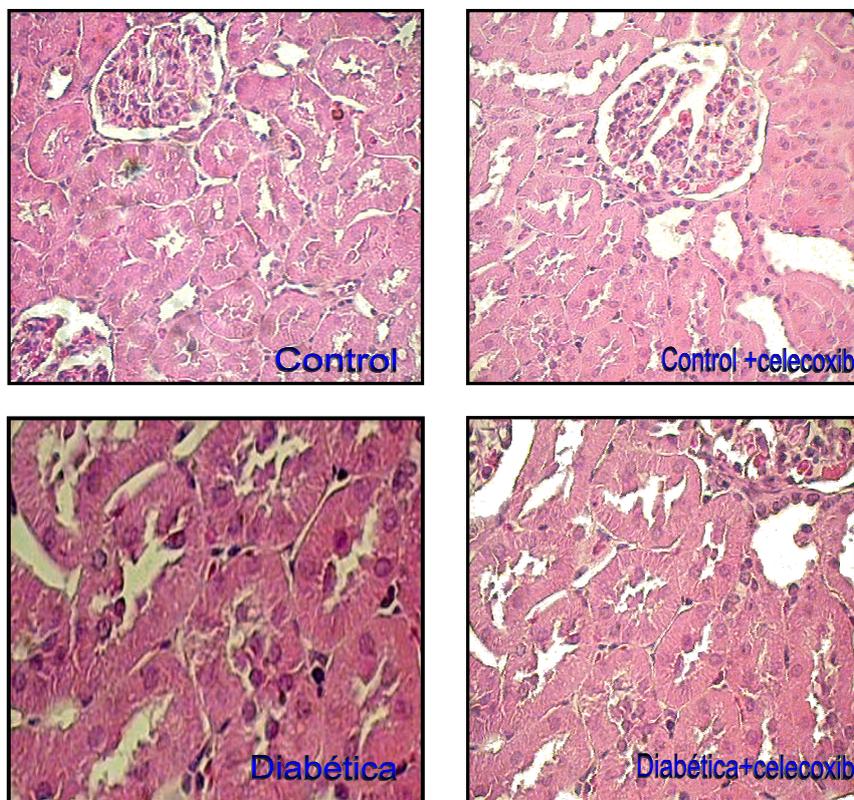
**Figura 21.** Análisis de la hipertrofia renal. Registro del peso del riñón de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), a los siete días de tratamiento. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.



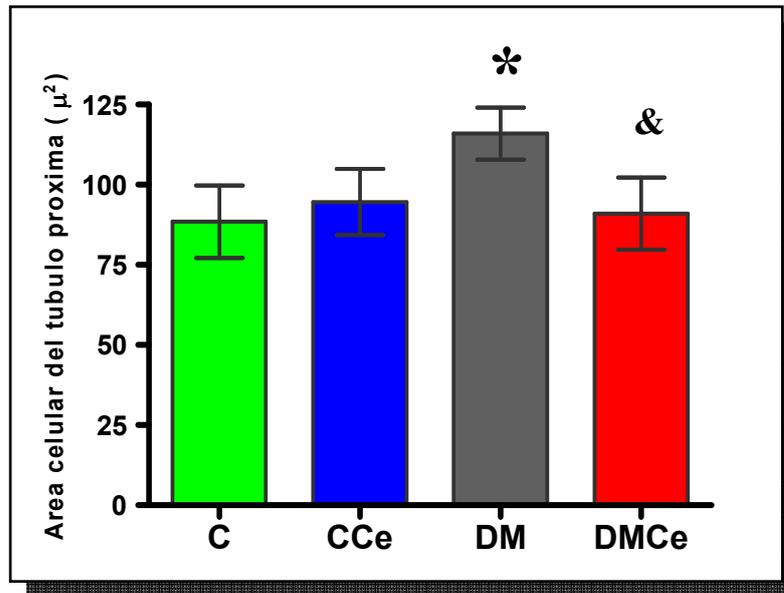
**Figura 22.** Análisis de la hipertrofia renal. Peso del riñón corregido por el peso corporal de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6), a los siete días de tratamiento. Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.

### 1.7.1 Efecto del celecoxib sobre el área celular del túbulo proximal

Se realizaron cortes histológicos de la corteza renal (Figura 22) para cuantificar el área de las células tubulares proximales en los diferentes grupos experimentales. Los datos mostraron un aumento en el grupo DM ( $115.98 \pm 8.08 \mu^2$ ) en comparación con el resto de los grupos experimentales que presentaron valores de  $88.46 \pm 11.32 \mu^2$  en el grupo C,  $94.63 \pm 10.28 \mu^2$  en el grupo CCe y  $90.99 \pm 11.23 \mu^2$  en el grupo DMCe (Figura 23).

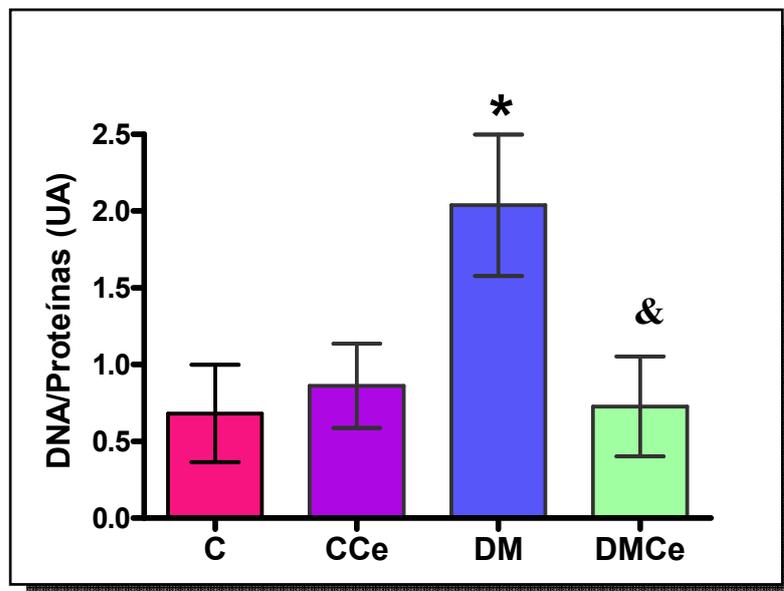


**Figura 23.** Cortes histológicos de la corteza renal a los siete días de la inducción de la DM.



**Figura 24.** Área celular del túbulo proximal renal a los siete días de la inducción de la diabetes de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.

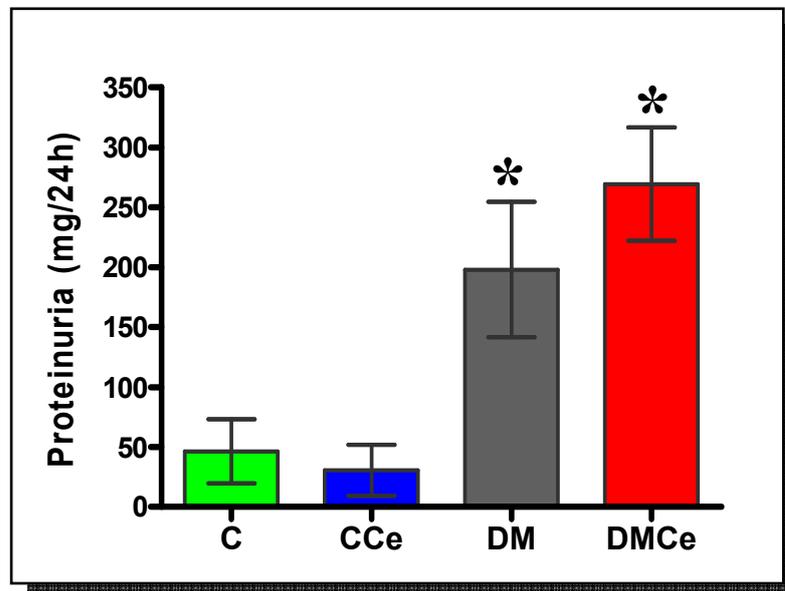
En la figura 25 se observa que aumentó el cociente DNA/ proteínas en el grupo DM, en el grupo DMCe hubo una disminución de este, alcanzando niveles similares a los de los grupos C y CCe.



**Figura 25.** Análisis de la hipertrofia renal. Cociente DNA/Proteínas de los riñones de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.

### 1.7.2 Efecto del celecoxib sobre la proteinuria

Se midió la cantidad de proteínas totales en un volumen urinario de 24 h; se observó que las ratas diabéticas y diabéticas con tratamiento de celecoxib presentaron niveles más altos de proteinuria ( $198.2 \pm 23$  y  $269.34 \pm 19$  mg/24h, respectivamente) en comparación con los grupos control ( $46.3 \pm 10.9$  mg/24h) y CCe ( $30.3 \pm 9.5$  mg/24h) (Figura 26).

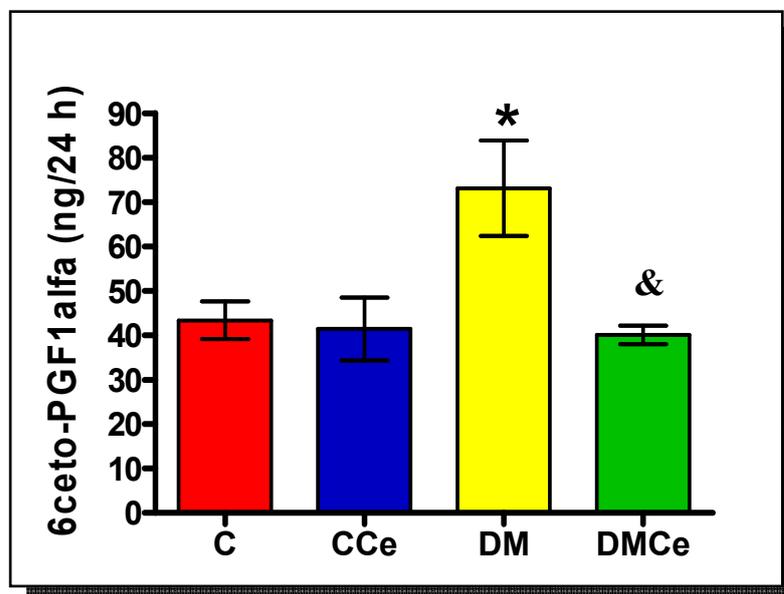


**Figura 26.** Excreción de proteína total en orina de ratas control (C), control + celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas + celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

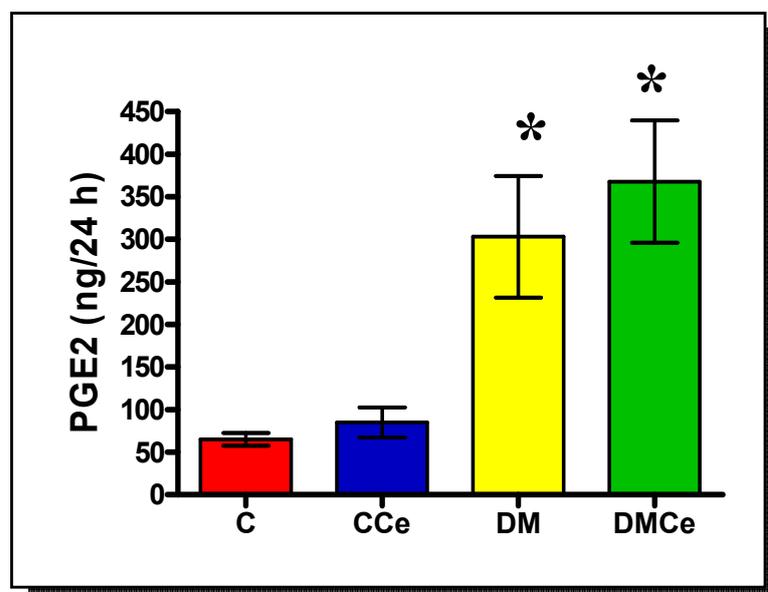
### 1.8 Efecto del celecoxib sobre los niveles urinarios de $PGI_2$ , $PGE_2$ y $TXA_2$

La cuantificación de prostaglandinas mostró aumento de  $PGI_2$  ( $73.101 \pm 26.379$  ng/24h),  $PGE_2$  ( $303.057 \pm 175.064$  ng/24h) y  $TXA_2$  ( $7.317 \pm 2.639$  ng/24h) en el grupo DM, siendo mayor el aumento de  $PGE_2$ . En

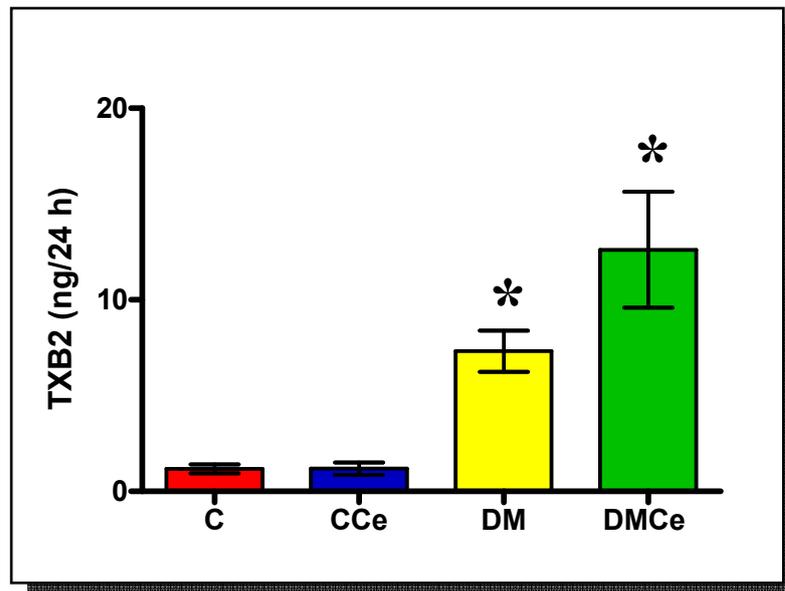
el grupo DMCe se observó disminución de PGI<sub>2</sub> (40.077±5.192 ng/24h), las concentraciones de PGE<sub>2</sub> (367.796±175.667 ng/24h) y de TXA<sub>2</sub> (12.610±7.411 ng/24h) no se modificaron de manera importante (Figuras 27, 28 y 29).



**Figura 27.** La excreción de PGI<sub>2</sub> se cuantificó a través de su metabolito 6-ceto PGF1alfa, durante 24 h a los siete días del tratamiento de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media ± DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.



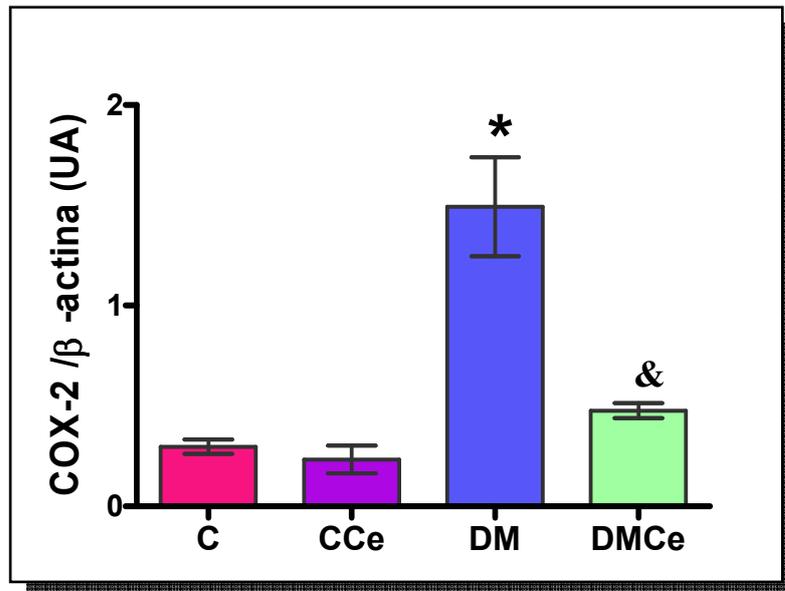
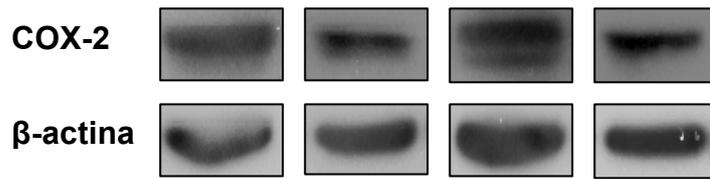
**Figura 28.** Excreción de PGE<sub>2</sub> durante 24 h a los siete días del tratamiento de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media ± DE, \*P<0.05.



**Figura 29.** La excreción de TXB2 se cuantificó a través de su metabolito TXB2 durante 24h a los siete días del tratamiento de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=6). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05.

### **1.9 Efecto del celecoxib sobre la expresión de COX- 2**

Se determinó la expresión de la COX-2 a nivel de proteína en la corteza renal mediante la técnica de Western Blot. Se encontró mayor expresión de COX-2 en la corteza renal de las ratas diabéticas (DM) en comparación con las ratas del grupo control (C) y control con celecoxib (CCe). En las ratas diabéticas tratadas con celecoxib se encontró menor expresión de COX-2 en comparación con las ratas diabéticas (DM), alcanzado niveles similares a los de los grupos C y CCe (Figura 30).



**Figura 30.** Análisis de Western Blot para la expresión proteica de COX-2 en corteza renal, a los siete días de la inducción de la diabetes de ratas control (C), control celecoxib (CCe), diabéticas (DM) y diabéticas celecoxib (DMCe) (n=4). Los valores expresan la media  $\pm$  DE, \*P<0.05, &P<0.05 solo contra DM.

## 2 DISCUSIÓN

El estudio de la DM se ha realizado a través de diversos modelos experimentales, uno de los más utilizados por su reproducibilidad es el modelo por administración de STZ (Szkudelski, T., 2001), que destruye de manera selectiva las células  $\beta$  del páncreas.

En el presente estudio se observó que a las 48 h, después de la administración de STZ, los animales presentaban los signos y síntomas de la DM, tales como: aumento de la concentración de glucosa sanguínea, también se observó pérdida de peso corporal, aumento en la ingesta de agua, alimento y del volumen urinario. Estos cambios son debidos a que la acumulación excesiva de glucosa en la sangre, producto de la insuficiencia insulínica provocada por la administración de STZ, genera hiperosmolaridad en la sangre, lo que produce pérdida de grandes cantidades de agua (poliuria) y electrolitos; la disminución de agua y electrolitos activa el mecanismo regulador de la ingestión de agua y da lugar a la polidipsia. Adicionalmente hay un aumento en la ingesta calórica, debido a la falta intracelular de glucosa, por lo que el organismo utiliza las reservas de proteínas y grasas endógenas para formar glucosa, que provoca una consecuente pérdida de peso. Sin embargo, al no poder metabolizarse completamente la glucosa, ésta se sigue acumulando en la sangre.

La cuantificación de la masa renal y el peso del riñón corregido por el peso corporal se utilizaron como indicadores para medir el daño renal, las ratas diabéticas mostraron aumento de estos parámetros a pesar de la disminución del peso corporal, lo que indica una incipiente hipertrofia renal. Kamesaki y colaboradores (1998) encontraron que las concentraciones altas de glucosa

inducen la expresión de 2 inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (p21Cip1 y p27Kip1) que inhiben el tránsito de la fase G1 a la S del ciclo celular, que provoca un incremento en la masa renal sin que se desencadene una proliferación celular debido a un aumento del contenido del RNA y proteínas sin cambios en la síntesis de DNA. Esto induce al proceso de la hipertrofia temprana, que a su vez propicia el estrés oxidativo y eventualmente proteinuria, fibrosis, esclerosis, apoptosis, hasta llegar a la etapa de riñón terminal (Satriano, 2007).

Numerosos estudios se han enfocado a suprimir la producción de PG's en la ND a través de la inhibición de la actividad de la enzima COX-2 lo que en parte ha contribuido a la disminución en la progresión de la enfermedad. En este estudio administramos celecoxib (inhibidor selectivo de la COX-2), tanto al grupo de ratas diabéticas como a las control, observándose que ambos grupos DMCe y DM presentaron un aumento en la concentración de glucosa, ingesta de agua, ingesta de alimento, volumen urinario y disminución del peso corporal con respecto a los grupos control con y sin celecoxib (C y Cce). Esto indica que el celecoxib no modifica la DM pues no tiene efecto hipoglucemiante.

Al cuantificar la proteinuria no se encontraron cambios importantes de esta en los grupos de ratas con celecoxib con respecto a los grupos control, esto se puede deber a una inhibición incompleta de la COX-2 relacionada con la duración del experimento (7 días) y la vía de administración.

Los datos observados en la hipertrofia renal en las ratas diabéticas sin tratamiento muestran aumento de la masa renal, del cociente DNA/proteínas y del área celular del túbulo proximal, estos datos están de acuerdo con los reportados por Thomson y colaboradores (2001), quienes también proponen

que la hiperfiltración glomerular resulta de la hipertrofia del túbulo proximal, por aumento de la ornitina descarboxilasa renal (enzima relacionada con la síntesis de poliaminas involucradas en procesos de hipertrofia). Otro aspecto a considerar es la acción de la ANG II sobre la hipertrofia renal, ya que ha sido reportado que los receptores AT1 en las ratas diabéticas se encuentra sobre-expresados.

Se observó que el peso renal, el cociente DNA/proteínas y el área celular del túbulo proximal disminuyeron en el grupo de ratas diabéticas tratadas con celecoxib, alcanzando valores similares a los grupos control. Esto se debe a que el celecoxib inhibe a la COX-2 como se muestra en la figura 30, que activa la síntesis de prostaglandinas (en especial de la PGE<sub>2</sub>) produciendo vasodilatación aferente y aumento de la TFG, que es un factor importante que contribuye a desencadenar la hipertrofia renal. Esto demuestra que los tratamientos con inhibidores de la COX-2 tienen cierto grado de beneficio en la nefropatía (Brenner, 2001; Sánchez, 1999), ya que al inhibir la COX-2 se estaría inhibiendo indirectamente la liberación de renina y la producción de Angiotensina II.

En estadios tempranos de la diabetes se produce hipertrofia tubular proximal (Thomson et al., 2001) que provoca alteración en el transporte tubular proximal ya que se produce aumento en la reabsorción de Na<sup>+</sup> a través del cotransportador Sodio-Glucosa (Vallon et al., 2003), de esta manera disminuye el NaCl luminal que llega a la mácula densa (MD), lo que activa la retroalimentación tubuloglomerular, dando como resultado un incremento de la tasa de filtración glomerular y restaurar la entrega de fluido y electrolitos en el

túbulo distal a través de la disminución de la resistencia arteriolar aferente (Hostetter et al, 1981; Zats et al. 1986; Ohishi et al,1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la excreción urinaria de PG'S se observó aumento de PGI<sub>2</sub> (73.101±26.379 ng/24h), PGE<sub>2</sub> (303.057±175.064 ng/24h) y TXA<sub>2</sub> (7.317±2.639 ng/24h) en el grupo DM siendo mayor el aumento de PGE<sub>2</sub>, lo que sugiere que en la DM se produce principalmente PGE<sub>2</sub> la cual esta asociada con incremento de la TFG. Hisashi y colaboradores (2002) mencionan que la PGE<sub>2</sub> es la principal prostaglandina en el riñón ya que está implicada en la fisiología renal, filtración glomerular, liberación de renina, reabsorción de sal tubular y en el transporte de agua. Sin embargo, cuando está aumentada su producción produce alteraciones hemodinámicas y daño en el tejido renal de ratas diabéticas. Varios trabajos aportan evidencia acerca de que el sistema renina-angiotensina juega un papel importante en el desarrollo de la ND, la PGE<sub>2</sub> puede ser uno de los mediadores que activen este sistema.

En el grupo DMce hubo una disminución en la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Figura 27), los niveles en la concentración de PGE<sub>2</sub> (Figura 28) y TXA<sub>2</sub> (Figura 29), no se modificaron de manera importante, lo que indica que la dosis utilizada de celecoxib no fue suficiente para inhibir directamente la la producción de PGE<sub>2</sub> ó de TXA<sub>2</sub> . Posiblemente los niveles de PGE<sub>2</sub> y de TXA<sub>2</sub> no se modifican por la participación de COX-1.

La expresión de la COX-2 en la corteza renal aumentó en ratas diabéticas comparada con los grupos control con y sin tratamiento de celecoxib. Estos datos concuerdan con lo reportado por Komers y colaboradores (2001), quienes observaron un incremento en la expresión

proteica de la COX-2 en la corteza renal de ratas diabéticas comparada con el grupo control. La COX-2 se localiza de manera constitutiva en el riñón en la MD (Harris et al., 1994; Nantel et al., 1999), y se le asocia con la regulación de la secreción de renina y del tono arteriolar aferente (a través de la retroalimentación tubuloglomerular) (Person et al., 1991). Se ha reportado que la superfamilia MAP cinasa, incluyendo las cinasas Erk1/2 y p38 son mediadoras de la activación de COX-2 en varias células.

El celecoxib disminuyó de manera importante la expresión de COX-2 en las ratas diabéticas tratadas pues se observó que alcanzaron niveles similares a los de los grupos control lo que se relaciona con la disminución de los niveles de PGI<sub>2</sub>. Esto nos sugiere que existe participación importante de las PG'S en el daño renal y se relaciona con la PGI<sub>2</sub>.

# 1 CONCLUSIONES

- Es posible el desarrollo experimental de hipertrofia renal a los 7 días de la inducción de la DM.
- El tratamiento con celecoxib atenúa la hipertrofia renal pero no la proteinuria en ratas diabéticas y disminuye la expresión de COX-2 en la corteza renal de ratas diabéticas.
- Las prostaglandinas principalmente vasodilatadoras sintetizadas por COX-2 juegan un papel importante en el proceso de hiperfiltración glomerular que contribuyen al desarrollo de hipertrofia renal en estadios tempranos. Esta información puede servir para discernir nuevas estrategias terapéuticas, que intervengan en los mediadores que están involucrados en los estadios tempranos de la nefropatía diabética.

# 1 BIBLIOGRAFÍA

Atkinson, M.A., Maclaren, N.K. 1994. The patogénesis of insulin dependent diabetes. *N Engl Journal Med.* 331:1428–1436.

Bonvalet, J.P., Pradelles, P., Farman, N. 1987. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along thenephron. *Am J Physiol.* 253(3 Pt 2):F377-87.

Brenner, B.M. 2003. The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAL study. *Kidney International.* 63(4):1499-507.

Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414 (6865):813-820.

Caramori M.L., Kim, Y., Huang, C., et al. 2002 Cellular basis of diabetic nephropathy: Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes.* 51:506-13.

Ceolotto, G., Gallo, A., Miola, M., et al. 1999. Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes.* 48:1316-22.

Christensen, P.K., Hansen, H.P., Parving, H.H. 1997. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney Int* 52(5):1369-74.

Cooper, M.E. 1998. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet.* 352: 213 - 219.

Cowley, A. 1994. Evolution of the medullipin concept of blood pressure control: a tribute to Eric Muirhead. *J Hypertension.* 12: S25–S34.

Cowley, A., Mattson, D., Lu, S and Roman, R. 1995. The renal medulla and hypertension. *Hypertension.* 25: 663–673.

De los Rios C.J.L., Santiago, P.B., Ávila, R.T. 2005. Valoración sistemática de la calidad de vida en pacientes con diabetes tipo 2 y nefropatía diabética. *Revista Médica del Hospital General de México.* 68 (3): 82-94.

DeWitt, D.L and Smith, W.L. 1998. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:1412–1416.

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2006 29: S43-48, 2006.

Doege, H., Schurmann, A., Babrenberg, G., Brauers, A., Joost, H. G. 2000. Glut 8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem.* 275 (21):16275-16280.

Doublier, S., Salvidio, G., Lupia, E., Ruotsalainen, V., Verzola, D., Deferrari, G., et al. 2003. Nephritin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes.* 52(4):1023-30.

Dubois, RN., Abramson, SB., Crofford, L., Gupta, RA., Simon, LS., Van De Putte, LB and Lipsky, PE. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063-1073.

ENSA. 2000. Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) *Arch Cardiol Mex* 2002; 72:71-84.

Fernández, M. 1996. Biología molecular de la diabetes mellitus. *Rev Endoc Nutr.* 4(3):55-62.

Ganda, O.P., Rossi, A.A., Like, A.A. 1976. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 25: 595-603.

Goodman G.A. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Vol II. MacGraw-Hill.

Guan, Y., Chang, M., Cho, W., Zhang, Y., Redha, R., Davis, L., Chang, S., DuBois, RN., Hao, CM and Breyer, M. 1997. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol.* 273:F18-26.

Haneda, M., Araki, S., Togaza, M., Sugimoto, T., Isono, M., Kikkawa, R. 1997. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int.* 60 (suppl): S66-S9.

Hao, CM., Yull, F., Blackwell, T., Kömhoff, M., Davis, LS and Breyer, MD. 2000. Dehydration activates an NF- $\kappa$ B-driven, COX-2 dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *J Clin Invest.* 106: 973-982.

Harris, MI. 1989. Impaired glucose tolerance in the U.S. population. *Diabetes Care.* 12: 464-474.

Harris, RC., McKanna, JA., Akai, Y., Jacobson, HR., Dubois, RN and Breyer MD. 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94: 2504-2510.

Harris, RC., Breyer, MD. 2001. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am Physiol Renal Physiol.* 281: F1-F11.

Herschman, H.R. 1999. Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv ExpMed Biol.* 469: 3–8.

Hisashi, M., Issei, T., Masashi, M., Akira, S., Kiyoshi, M., Seiji, M., Takayoshi, S., Kensei, Y., Rieko, I., Shuichi, O., Takayuki, M., Shu, N., Kazuwa, N. 2002. Prevention of Diabetic Nephropathy in rats by prostaglandin E receptor EP1-Selective Antagonist. *J Am Soc Nephrol.* 13: 1757-1765.

Hla, T., Bishop-Bailey, D., Liu, CH., Schaeffers, HJ and Trifan, OC.1999. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem CellBiol.* 31: 551–557.

Hostetter, T.H., Troy, J.L., and Brenner, B.M. 1981. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 19:410–415.

Hunter, S.J., Garvey, W.T. 1998. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system. *American Journal Med.* 105:331-345.

Iso, K., Tada, H., Kuboki, K., Inokuchi, T. 2001. Long-term effect of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on the development of incipient diabetic nephropathy in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 15:241-4.

Jensen, B., Schmid, C., and Kurtz, A.1996. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 271: F659–F669.

Khan, K.N., Stanfield, K.M., Harris, R.K, Baron, D.A. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy. *Ren Fail.* 23 (3-4): 321-330.

Kamesaki, H., Nishizawa, K., Michaud, G.Y., Cossman, J., Kiyono, T. 1998. TGF-beta 1 induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mRNA and protein in murine B cells. *Journal Immunol.* 160: 770-777.

Komers, R., Linsley, J.N., Oyama, T.T., Schutzer, W.E., Reed, J.F., Mader, S.L., Anderson, S. 2001. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 107: 889-998.

Kujubu, DA., Fletcher, BS., Varnum, BC., Lim, RW and Herschman HR.1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872.

Lee, A.Y., Chung, S.S. 1999 Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13:23-30.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:255-275.

Mauer, S.M., Steffes, M.W., Ellis, E.N., Sutherland, D.E.R., Brown DM, Goetz, F.C. 1984. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest.*74:1143–1155.

Mezzano, S., Droguett, A., Burgos, M.E., Ardiles, L.G., Flores, C.A., Aros, C.A., et al. 2003. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int .(Suppl 86):*S64-70.

Moller, D.E. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature.* 414(6865):821-827.

Mogensen, CE., Christensen, CK. 1984. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med.* 311:89-93.

Nemeth, J.F, Hochensang, P., Marnett, L.J, and Caprioli, R.M. 2001 Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry.* 40:3109–3116.

Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M., Kawada, J.1990. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.*127: 161-165.

O'Bryan, G.T., Hostetter, T.H. 1997. The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 17 (2):93-100.

Ohishi, K., Carmines, P.K. 1995. Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1559–1566.

Ortuño, J. 2001. Diabetes mellitus y Nefropatía Diabética ¿Cuál es la magnitud del problema? *Nefrología.* 21(3); 4-8.

Osterby, R., Gall, M.A., Schmitz, A., et al. 1993. Glomerular structure and function in proteinuric type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetología.* 36: 1064-1070.

Persson, A.E.G., Salomonsson, M., Westerlund, P., Greger, R., Schlatter, E., Gonzalez E. 1991. Macula densa function. *Kidney Int.*32: S39–S44.

Robbins, S.L. 2004. *Patología Humana. Séptima edición.* Elsevier España, S.A. pp. 641-647.

Rodby, R.A. 1997. Type II diabetic nephropathy: its clinical course and therapeutic implications. *Semin Nephrol.*17(2):132-147.

Sanchez, L.P., Salgado, L.M., Ferreri, N.R., Escalante, B. 1999 Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function after renal ablation. *Hypertension.*34:848-853.

Satriano, J. 2007. Kidney growth, hypertrophy and the unifying mechanism of diabetic complications. *Amino Acids*. 33: 331-339.

Seino, S., Seieno, M., Nishi, S., Bell, G.I. 1989. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci*. 86:114-8.

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

Schnermann, J., Traynor, T., Yang, T., et al. 1998. Tubuloglomerular feedback: New concepts and developments. *Kidney Int*. 54: S40-S45.

Sheetz, M.J. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 288(2):2579-88.

Shepherd, P.R., Khan, B.B. 1999. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med*. 22:248-257.

Simmons, D.L., Xie, W., Chipman, J.G., and Evett, G.E. 1991. Multiple cyclooxygenases: Cloning of an inducible form, in *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins and PAF Bailey*. *Journal Med*. 67-78.

Simmons, D.L., Botting, R.L., Hla, T. 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*. 56:387-437.

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of Rat Pancreas. *Physiol. Res*. 50:536-546.

Thomson, S.C., Deng, A., Bao, D., Satriano, J., Blantz, R.C., Vallon, V. 2001. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 217-224.

Tabatabaie, T., Vazquez, W.A., Moore, D.R., Kotake, Y. 2003. Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes: beta cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes*. 58: 1994-1999.

Vallon, V., Blantz, R.C., Thomson, S. 2003. Glomerular Hyperfiltration and the Salt Paradox in Early Type 1 Diabetes Mellitus: A Tubulo-Centric View. *J Am Soc Nephrol* 14: 530-537.

Wang, B., Balba, Y., Knutson, V.P. 1996. Insulin-induced in situ phosphorylation of the insulin receptor located in the plasma membrane versus endosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 227: 27-34.

Wellsknecht, M., Thorpe, S., Baynes, J. 1995. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*. 34: 15134-41.

Wojtaszek, P.A., Heasley, L.E., Berl, T. 1998. In vivo regulation of MAP kinases in *Ratus norvegicus* renal papilla by water loading and restriction. *J Clin Invest.* 102: 1874–1881.

Wolf, G. 2002. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hypertrophy: a proliferation of novel factors. *J Am Soc Nephrol* 13: 2611-2613.

Yakamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N and Yamamoto, S.1995. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor- interleukin-6 in the tumor necrosisfactor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *JBiol Chem.* 270: 31315–31320.

Yang, T., Schnermann, JB., and Briggs, JP.1999.Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 277: F1-9.

Yang, T., Singh, I., Pham, H., Sun, D., Smart, A., Schnermann, JB and Briggs, JP.1998.Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake.*Am J Physiol.* 274:F481-9.

Yao, B., Xu, J., Qi ,Z., Harris, R.C., Zhang, M.Z. 2006. Role of renal corical Cyclooxygenase-2 expresion in hyperfiltration in rats whith High-protein intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291:F368-F374.

Yasuda, T., Kondo ,S., Homma, T., Harris, R.C.1996.Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *Journal Clinical Investigate.*98(9):1991-2000.

Zatz, R., Dunn, B.R., Meyer, T.W., Anderson, S., Rennke, H.G., Brenner, B.M. 1986.Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest.* 77:1925-30.

Zimmet, P.Z. 1992. Challenges in diabetes epidemiology: from west to the rest. *Diabetes Care.*15: 232–252.