



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOMEDICINA (UBIMED)



Participación de la sintasa y del receptor a tromboxano en la regulación del tono vascular renal de ratas durante la diabetes.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

DANTE RUBÉN VARGAS RESÉNDIZ

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Patricia Castro Moreno

SINODALES:

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

Dra. María del Rocío Bautista Pérez

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dr. Cesar Díaz Pérez

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2019





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.



Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular (Laboratorio 3), en la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. Patricia Castro Moreno y el apoyo del Dr. Maximiliano Ibarra Barajas. Los apoyos de financiamiento para este proyecto fueron otorgados por la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN221615).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido ser parte de ella, por todas las oportunidades que me ha otorgado y por todas aquellas personas con quienes construí recuerdos inolvidables. *¡Por mi raza hablará el espíritu!*

A la Dra. Patricia Castro Moreno, por haber estado a mi lado y brindarme sus consejos en todo momento, por darme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad. Gracias por su paciencia y dedicación, sin su valioso apoyo no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, por todo el apoyo que me otorgó durante este proceso, por compartir conmigo su conocimiento y experiencia, y por haberme permitido formar parte de su laboratorio, mi querido laboratorio 3.

A mis sinodales, Dra. María del Rocío Bautista Pérez, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Dr. Cesar Díaz Pérez, por sus invaluable consejos que permitieron mejorar esta investigación.

Al personal de la Unidad de Biomedicina y el Bioterio, por las facilidades que me ofrecieron para que pudiera llevar a cabo este trabajo de investigación.

De manera muy especial, quiero agradecer **a la química farmacobióloga María de los Ángeles Tamayo Cedeño, a la compañía Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. y a la empresa Abcam** por la valiosa donación del anticuerpo anti-thromboxane A₂ receptor (ab134959).

Dedicatoria

Con mucho cariño para:

María Guadalupe Reséndiz Cervantes, mi madre.

Mamá, gracias por estar siempre a mi lado, podría decirte mil cosas sobre lo que siento por tí, de la conexión que tenemos cuando con solo una mirada sabes lo que me pasa y lo que necesito, que con solo una caricia puedes tranquilizar mis tormentos.

Gracias por compartir conmigo tu conocimiento y experiencia, por tus desvelos y lágrimas, gracias por haber estado conmigo en mis momentos más oscuros y llenos de dolor. Tú fuiste la luz en mi camino y siempre supe que podía contar contigo en cualquier momento. Gracias, porque sé que no existe un amor tan profundo y tan verdadero, que nunca nadie me va a transmitir esa paz y tranquilidad como cuando tomas mi mano.

Y, sobre todo, gracias mamá, porque sé que donde sea que esté y a donde quiera que vaya, tú siempre cuidarás de mí, porque el amor de una madre es infinito y porque a pesar de que haya pasado el tiempo siempre seguiré siendo tu hijo. Te amo.

A mis hermanos.

Alex, Roberto, Itzel y María Inés, estoy feliz por los momentos que hemos pasado juntos, gracias por ser mis cómplices siempre que los necesitaba. No pude tener mejores hermanos que ustedes.

A mis maestros y amigos.

Por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su compañía no habría llegado a este nivel. A quienes brindaron dedicación al impartir su cátedra de tal forma que lo aprendido sea utilizado en la vida real, por su apoyo, Gracias.

A Dios.

Por darme vida, salud y sabiduría.

Índice general

ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Epidemiología.....	3
I.2. Hiperglucemia y diabetes.....	5
I.2.1. <i>Clasificación de la diabetes</i>	5
I.2.2. <i>Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina</i>	7
I.2.3. <i>Complicaciones asociadas a la diabetes</i>	8
I.3. Nefropatía diabética.....	10
I.3.1. <i>Fisiopatología de la nefropatía diabética</i>	10
I.4. Ruta metabólica del ácido araquidónico y vía de las ciclooxigenasas.....	10
I.4.1. <i>Tromboxano sintasa</i>	13
I.4.2. <i>Tromboxano A₂</i>	15
I.4.3. <i>Receptor de tromboxano</i>	16
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos particulares.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Animales.....	22
6.2. Inducción de la diabetes experimental.....	22
6.3. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y a I-Bop.....	23

6.4. Expresión de la enzima tromboxano sintasa y el receptor de tromboxano	24
7. RESULTADOS	26
7.I. Cuantificación de glucosa en sangre.....	26
7.2. Peso corporal.....	27
7.3. Peso e índice de masa renal.....	27
7.4. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en riñones de ratas Wistar.....	28
7.5. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal inducida por fenilefrina después de 1 semana de evolución de la diabetes.....	29
7.6. Efecto de la inhibición de la tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal inducida por fenilefrina después de 4 semanas de evolución de diabetes.....	30
7.7. Expresión a nivel de proteína de la tromboxano sintasa.....	32
7.8. Curvas concentración-respuesta al agonista del receptor de tromboxano (I-Bop)	33
7.9. Expresión a nivel de proteínica del receptor de tromboxano.....	34
7.10. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal en respuesta a I-Bop después de 1 semana de evolución.....	35
7.II. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal en respuesta a I-Bop después de 4 semanas de evolución.....	36
8. DISCUSIÓN	37
9. CONCLUSIONES	47
10. PERSPECTIVAS	48
11. REFERENCIAS	49

Índice de figuras y tablas

Figura 1.	Transporte de glucosa (diabetes tipo 1).....	6
Figura 2.	Transporte de glucosa (diabetes tipo 2).....	7
Figura 3.	Liberación de ácido araquidónico.....	11
Figura 4.	Ruta del ácido araquidónico.....	12
Figura 5.	Modelo de la enzima tromboxano sintasa.....	13
Figura 6.	Organización de gen <i>Tbxas1</i> humano.....	14
Figura 7.	Mecanismo de reacción propuesto para la enzima tromboxano sintasa ..	15
Figura 8.	Mecanismo de contracción vascular mediado por el receptor de tromboxano.....	17
Figura 9.	Glucosa en sangre después de 1 y 4 semanas con diabetes	26
Figura 10.	Peso corporal después 1 y 4 semanas con diabetes	27
Figura 11.	Índice de masa renal después 1 y 4 semanas con diabetes.....	28
Figura 12.	Presión de perfusión inducida por fenilefrina en riñones de ratas de 1 y 4 semanas con diabetes.....	29
Figura 13.	Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión inducida con fenilefrina en riñones de ratas de 1 semana con diabetes.....	30
Figura 14.	Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión inducida con fenilefrina en riñones de ratas de 4 semanas con diabetes.....	31
Figura 15.	Abundancia relativa de la enzima tromboxano sintasa en corteza renal de ratas de 1 y 4 semanas con diabetes	32
Figura 16.	Presión de perfusión inducida por I-Bop en riñón de ratas de 1 y 4 semanas con diabetes.....	33
Figura 17.	Abundancia relativa del receptor de tromboxano en corteza renal de ratas de 1 y 4 semanas con diabetes.....	34
Figura 18.	Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión inducida con I-Bop en riñones de ratas de 1 semana con diabetes.....	35

Figura 19. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión inducida con I-Bop en riñones de ratas de 4 semanas con diabetes.....	36
Figura 20. Propuesta sobre los mecanismos de dilatación e incremento de TXA ₂ mediado por los receptores de tromboxano endoteliales.....	45
Figura 21. Propuesta sobre los mecanismos de dilatación y amplificación de la contracción vascular renal, así como el efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa con Ozagrel.....	46
Tabla 1. Estimaciones mundiales sobre la prevalencia de la diabetes.....	3
Tabla 2. Listado de los 10 países con mayor número de adultos con diabetes.....	4
Tabla 3. Efecto de fenilefrina en la potencia (EC ₅₀) y la eficacia (E _{max}).....	31
Tabla 4. Efecto de I-Bop en la potencia (EC ₅₀) y la eficacia (E _{max}).....	36

Abreviaturas

°C	Grados Celsius	GLUT 2	Proteína transportadora de glucosa 2
μl	Microlitros	GLUT 4	Proteína transportadora de glucosa 4
12-HTT	Ácido 12-hidroxi-5, 8, 10-heptadecatrienoico	GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
20-HETE	Ácido 20-hidroxiicosatetraenoico	GNE	Glicosilación no enzimática
8-iso-PGF_{2α}	Isoprostano de prostaglandina F _{2α}	GTP	Guanosín trifosfato
AA	Ácido araquidónico	h	Horas
ACV	Accidente cerebrovascular	I.P.	Intraperitoneal
ADA	American Diabetes Association	I-Bop	Agonista del receptor a tromboxano
ATP	Adenosín trifosfato	IDF	International Diabetes Federation
Ca²⁺	Calcio	IMR	Índice de masa renal
Ca²⁺ + CaM	Calcio-calmodulina	IP3	Inositol-1, 4, 5-trifosfato
CMLV	Células de músculo liso vascular	kb	Kilobases
COX-1	Ciclooxigenasa 1	kDa	Kilodaltones
COX-2	Ciclooxigenasa 2	kg	Kilogramos
COXs	Ciclooxigenasas	l	Litro
DAG	Diacilglicerol	Log	Logaritmo
dl	Decilitro	LOXs	Lipooxigenasas
DNA	Ácido desoxirribonucleico	M	Molar
E.E.	Error estándar	MDA	Malondialdehído
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial	mg	Miligramos
EO	Estrés oxidativo	min	Minutos
EROs	Especies reactivas de oxígeno	mM	Milimolar
FMD	Federación Mexicana de Diabetes	mmHg	Milímetros de mercurio
g	Gramos	mmol	Milimol
GCS	Guanilato ciclasa soluble		

NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina	PLA₂	Fosfolipasa A ₂
NFD	Nefropatía diabética	PLCβ	Fosfolipasa C β
NO	Óxido nítrico	PLs	Fosfolipasas
NOX	NADPH Oxidasa	P.P.	Presión de perfusión
°C	Grados centígrados	RI	Receptores de insulina
ONOO⁻	Peroxinitrito	RNA	Ácido ribonucleico
Oza	Ozagrel	rpm	Revoluciones por minuto
P.P.	Presión de Perfusión	s.f.	Sin fecha
PGD₂	Prostaglandina D ₂	SRI-1	Sustrato del receptor de insulina 1
PGDS	Prostaglandina D ₂ sintasa	SRI-2	Sustrato del receptor de insulina 2
PGE₂	Prostaglandina E ₂	STZ	Estreptozotocina
PGES	Prostaglandina E ₂ sintasa	Tbxas1	Gen de tromboxano sintasa
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}	TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
PGFS	Prostaglandina F _{2α} sintasa	TP	Receptor de tromboxano
PGG₂	Prostaglandina G ₂	TPα	Receptor de tromboxano subtipo α
PGH₂	Prostaglandina H ₂	TPβ	Receptor de tromboxano subtipo β
PGI₂	Prostaciclina	TXA₂	Tromboxano A ₂
PGIS	Prostaciclina sintasa	TXAS	Tromboxano sintasa
PKC	Proteincinasa C	TXB₂	Tromboxano B ₂
PKG	Proteincinasa G	WB	Western blot

RESUMEN

El tromboxano A₂ (TXA₂) es un potente vasoconstrictor que contribuye en la regulación de la hemodinamia renal. En la diabetes, los niveles de TXA₂ se incrementan, lo que se ha relacionado con el desarrollo de la nefropatía diabética, sin embargo, aún no es clara la participación del TXA₂ de la enzima tromboxano sintasa (TXAS), que es la que lo sintetiza y de su receptor (receptor TP) en el daño renal causado por la diabetes. Por tanto, se estudió si la diabetes modifica el papel de la TXAS y la participación funcional del receptor TP en la regulación del tono vascular renal de ratas Wistar, mediante curvas concentración-respuesta a los agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 (fenilefrina) y del receptor TP (I-Bop) en presencia y ausencia de un inhibidor de la TXAS (Ozagrel), además se cuantificó la TXAS y el receptor TP a nivel de proteína en cortezas renales de ratas con 1 y 4 semanas de diabetes inducida con estreptozotocina (STZ). Las ratas con STZ, mostraron incremento de glucosa y masa renal. La fenilefrina provocó disminución de la presión de perfusión (P.P.) en riñones con 1 semana de diabetes, mientras a las 4 semanas se incrementó. La presencia del Ozagrel en ambas edades disminuyó significativamente la respuesta a fenilefrina. El I-Bop produjo mayor vasoconstricción en riñones de los grupos diabéticos, mientras que la inhibición de la TXAS con Ozagrel redujo casi por completo la respuesta contráctil. Por otra parte, la expresión de la enzima TXAS y el receptor TP incrementaron en cortezas de los dos grupos diabéticos. Estos resultados sugieren que durante la evolución de la diabetes hay modificación en la síntesis del TXA₂ causado por el incremento de la TXAS a nivel endotelial, lo que da lugar, al aumento en la cantidad y actividad contráctil del receptor TP, además, es posible que la presencia del receptor TP en el endotelio vascular favorezca la producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), no obstante, el incremento de la síntesis de TXA₂ parece ser su principal función. Por último, proponemos un fenómeno de amplificación de la contracción vascular, como resultado del incremento en la expresión de la TXAS en musculo liso, el cual podría ser uno de los mecanismos responsables del desarrollo del daño renal durante la diabetes.

ABSTRACT

Thromboxane A₂ (TXA₂) is a potent vasoconstrictor, contributes to the renal hemodynamics regulation. TXA₂ levels increases during diabetes, which has been related to the development of diabetic nephropathy, however, the role TXA₂, the thromboxane synthetase (TXAS) and the receptor to thromboxane (TP) in kidney damage is unclear. We study the effects of diabetes in the TXAS enzyme and the functional participation of the TP receptor in the regulation of renal vascular tone of Wistar rats. Streptozotocin-Induced diabetes (STZ) model was used in male Wistar rats, the evolution of diabetes was allowed for 1 and 4 weeks, then the right kidney was isolated and perfused, concentration-response curves were constructed to phenylephrine (α 1 adrenergic agonist) and I-Bop (TP agonist), with or without TXAS inhibitor (Ozagrel). In cortex renal TXAS and TP, quantification was performed by immunodetection. In diabetics rats, glucose and renal mass index were increased. In kidneys with 1 week of diabetes, phenylephrine decreased perfusion pressure, while at 4 weeks it increased. The Ozagrel, in both ages significantly decreased the response to phenylephrine. In kidneys of diabetic groups, I-Bop produced greater vasoconstriction, while TXAS inhibition with Ozagrel reduced the contractile response almost completely. TXAS enzyme and TP receptor expression increased in cortices of both diabetic groups. These results suggest that during the evolution of diabetes there is modification in the synthesis of TXA₂ caused by the increase in TXAS at the endothelial level, which results in the increase in the amount and contractile activity of the TP receptor, in addition, it is possible that the presence of the TP receptor in the vascular endothelium favors the production of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂), however, the increase in the synthesis of TXA₂ seems to be its main function. Finally, we propose a phenomenon of amplification of vascular contraction, as a result of the increase in the expression of TXAS in smooth muscle, which could be one of the mechanisms responsible for the development of renal damage during diabetes.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Epidemiología

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que afecta entre 415 y 422 millones de personas adultas (1 de cada 11 individuos) en todo el mundo (IDF, 2015). De acuerdo con el *Atlas de la Diabetes* de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2015), si esta tendencia continúa, en 2040 unos 642 millones de personas adultas (1 de cada 10), tendrán diabetes (tabla 1).

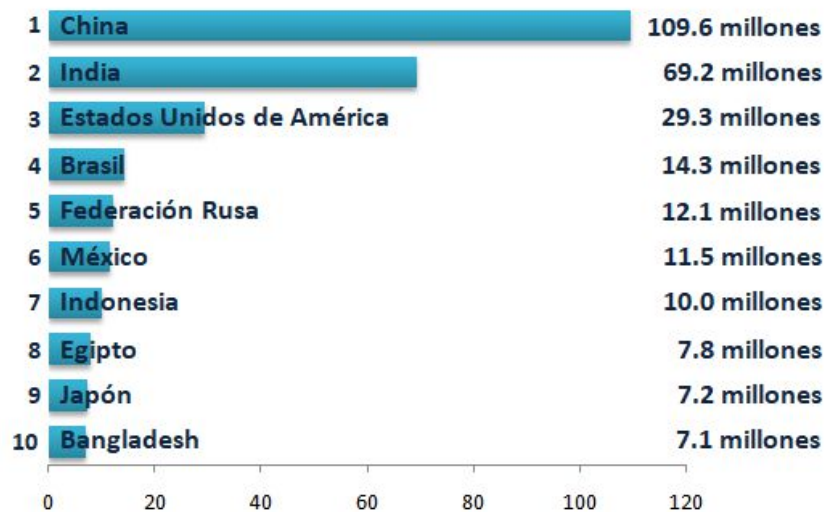
Tabla 1. Estimaciones mundiales sobre la prevalencia de la diabetes para 2015 y 2040. *Modificado del Atlas de la Diabetes de la IDF (2015) p50.*

	2015	2040
Población mundial total	7,300 millones	9,000 millones
Población adulta (20-79 años)	4,720 millones	6,160 millones
Población infantil (0-14 años)	1,920 millones	-
Diabetes (20-79 años)		
Prevalencia mundial	8.8% (7.2-11.4%)	10.4% (8.5-13.5%)
Número de personas con diabetes	415 millones (340-536 millones)	642 millones (521-829 millones)
Número de muertes por diabetes	5.0 millones	-

En el año 2015, la diabetes provocó alrededor de 5 millones de muertes, al incrementar el riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular, de las cuales 3.7 millones ocurren en personas de entre 20 y 70 años de edad. Cabe señalar que el porcentaje de muertes atribuibles a una glucemia elevada o la diabetes en menores de 70 años de edad es superior en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos (Mora-Morales, 2014; OMS, 2016).

En México, alrededor del 9 % de la población de entre 20 y 69 años padece diabetes (FMD, 2017), esto significa que en nuestro país existen más de 11.5 millones de personas con diabetes, siendo el sexto país a nivel mundial con el mayor número de personas enfermas (tabla 2) (IDF, 2015).

Tabla 2. Listado de los 10 países con mayor número de adultos con diabetes. *Modificado del Atlas de la Diabetes de la IDF (2015) p17.*



Desde el año 2000, en México, la diabetes ocupa el primer lugar de defunciones por año (Rojas, 2015), tanto en hombres como en mujeres, las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales (Secretaría de Salud, 2010).

Los costos económicos asociados al tratamiento y sus complicaciones representan una grave carga para los servicios de salud y para los pacientes (Secretaría de Salud, 2010), representando un gasto en el 2012 de 3,430 millones de dólares para su atención (FMD, 2017).

I.2. Hiperglucemia y diabetes

La glucosa, es el principal monosacárido que se encuentra en la sangre. Proviene de los alimentos que se ingieren, y es la principal fuente de energía del cuerpo. Si los valores basales de glucosa en sangre aumentan, con cifras mayores a 126 mg/dl y se mantienen en estas condiciones por varios días, se denomina hiperglucemia (Guyton & Hall, 2006), estos incrementos de glucosa provocan distintas alteraciones en el organismo, que pueden ir desde un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática (GNE), hasta un incremento del estrés oxidativo (EO) causado por la oxidación de la glucosa (Triana, 2001); con el paso del tiempo, estas alteraciones se hacen más severos, y aunado a factores externos como una alimentación inadecuada, el sedentarismo o el tabaquismo se desarrolla la enfermedad conocida como diabetes (Cases, 2002; OMS, 2016).

La diabetes puede presentarse de manera silenciosa, lo que significa, que en ocasiones no se manifiestan síntomas para hacer un diagnóstico, pero con el tiempo puede haber tendencia a infecciones en la piel, aumento de la sed y el apetito, pérdida de peso e incremento en la producción de orina (ADA, 2015; Ministerio de Salud, s.f.), e incluso generar afecciones más graves en órganos como el riñón, el corazón, el hígado o bien una falla multiorgánica (Sánchez & Genta, 2007; Sanbán, 2014).

I.2.1. Clasificación de la diabetes

La diabetes, generalmente se clasifica en tres tipos: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional, siendo las dos primeras las más comunes (OMS, 2016; Secretaria de Salud, 2016).

En la diabetes tipo 1, los islotes pancreáticos son atacados por un infiltrado de células inmunológicas auto-reactivas (insulinitis) que se sitúa alrededor de estos, provocando un cambio homeostático tanto en el componente celular inmunológico como en el endócrino, lo que provoca la muerte de las células β , (figura 1), lo que conlleva a la deficiencia absoluta de insulina (Manrique *et al.*, 2017), la cual presenta una sintomatología que es clásica de la diabetes: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y una progresiva cetosis que puede acabar en cetoacidosis, si no se instaura un tratamiento adecuado con insulina exógena (Ministerio de Sanidad & Ministerio de Economía, 2012).

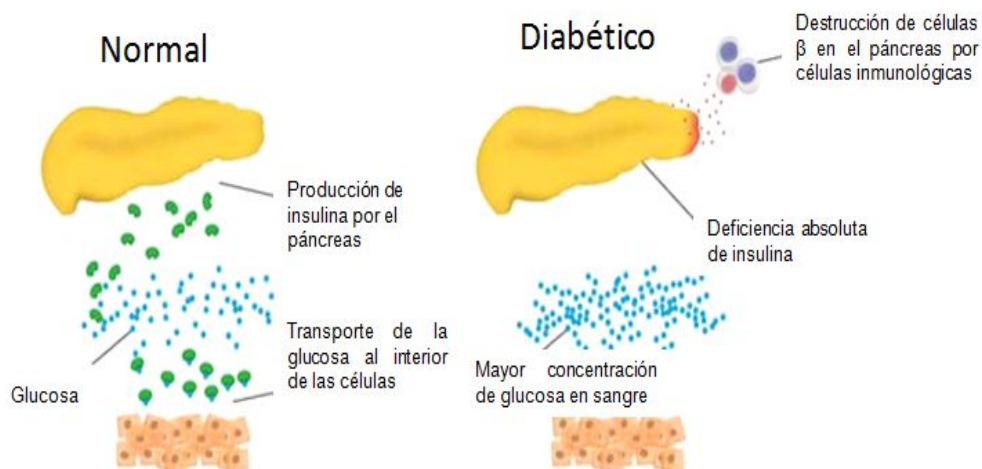


Figura 1. Alteración en el transporte de glucosas provocada por la diabetes tipo 1. *Modificado de <http://bit.ly/1Yjy0q>.*

Por otra parte, la diabetes tipo 2, denominada del adulto o no insulino dependiente, es un trastorno metabólico que se caracteriza por un defecto en la producción de la insulina y una tendencia progresiva a la resistencia de esta hormona (figura 2), debido a diversas alteraciones como el defecto en la translocación de la proteína transportadora de glucosa

4 (GLUT4) o por modificaciones en la actividad del receptor de insulina (RI), los sustratos del RI (SRI-1 y SRI-2) o la cinasa de fosfoinositol trifosfato (Zamora-Valdés *et al.*, 2004).

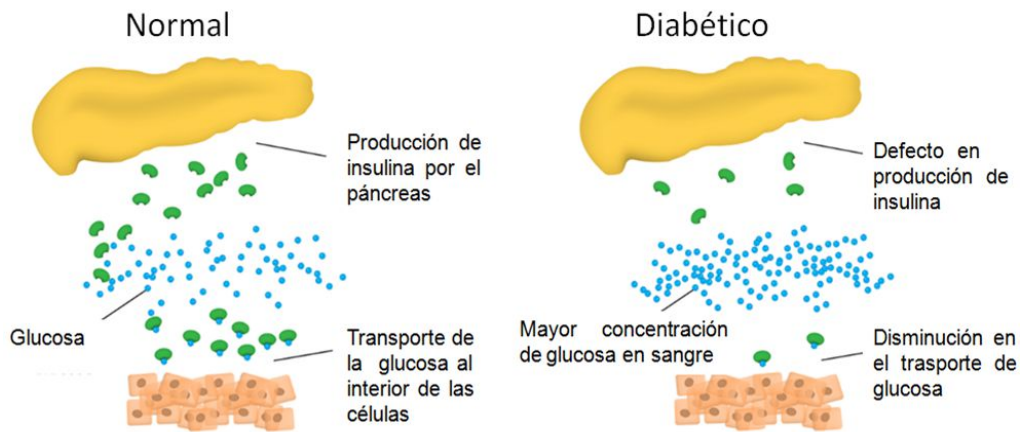


Figura 2. Alteración en el transporte de glucosa provocada por la diabetes tipo 2. *Modificado de <http://bit.ly/2qTRkNY>.*

I.2.2. Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina.

La diabetes puede inducirse farmacológicamente mediante la administración de estreptozotocina (STZ), que destruye de manera selectiva las células β del páncreas. Este fármaco obtenido a partir del hongo *streptomyces achomogenes*, posee una estructura similar a la glucosa, por lo que el paso al interior de la célula se lleva a cabo por la proteína transportadora de glucosa 2 (GLUT 2) (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

La STZ tiene una porción metilnitrosourea, lo que le confiere una actividad alquilante que fragmenta el DNA de las células β del páncreas. En el intento de reparar el DNA, la enzima DNA-polimerasa se sobreestimula, lo que genera una disminución en NAD^+ celular, y posteriormente unos escasos en las reservas de ATP. Finalmente, el agotamiento de las reservas de energía termina provocando la necrosis celular, y aunque

la estreptozotocina también metila proteínas, la metilación del DNA es la responsable de la muerte de las células β (Wei *et al.*, 2003). Por otra parte, la formación de aniones de superóxido es el resultado de la acción de la STZ sobre las mitocondrias de las células β , debido a que incrementa la actividad de la xantina oxidasa, lo que indica que la STZ inhibe el ciclo de Krebs y disminuye sustancialmente el consumo de oxígeno, por lo que estos efectos contribuyen fuertemente a la deficiencia en la producción de ATP mitocondrial. (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

El modelo de diabetes inducida por estreptozotocina permite investigar las causas, diagnóstico y tratamiento de la diabetes, así como sus complicaciones a nivel celular o molecular que dañan los distintos tejidos y órganos del cuerpo; este modelo refleja las diferentes condiciones fisiopatológicas de la diabetes humana incluyendo las complicaciones a nivel cardiovascular (Figueroa *et al.*, 2013).

1.2.3. Complicaciones asociadas a la diabetes

Las complicaciones de la diabetes se dividen en varios tipos, de los cuales se enfatizan las complicaciones vasculares, clasificadas en macrovasculares y microvasculares (Feriz, 2015).

Las complicaciones macrovasculares principales son la aterosclerosis, proceso fisiopatológico inicial de todas las complicaciones macrovasculares (NHLBI, 2016); la cardiomiopatía diabética, la cual es un conjunto de alteraciones en la estructura y la función del miocardio que llevan al desarrollo de una falla cardíaca (Feriz, 2015) y los accidentes cerebrovasculares, que ocurre cuando uno de los vasos sanguíneos que

irrigan la zona cerebral se rompe (accidente cerebrovascular hemorrágico) o se obstruye (accidente cerebrovascular isquémico), evitando que el flujo sanguíneo llegue al cerebro (Giral, 2013).

En las complicaciones microvasculares, la diabetes provoca un deterioro del sistema vascular que termina siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes que la presentan. Este deterioro vascular engloba la alteración de los lechos capilares, causante de las complicaciones microvasculares (Sánchez, 2010).

Las principales alteraciones microvasculares relacionadas con la diabetes son la retinopatía diabética, que ocurre cuando hay cambios en los vasos sanguíneos en la retina. Estos vasos pueden hincharse y dejar escapar fluidos, o inclusive taparse completamente. (Janigian, 2013); la neuropatía diabética, que es un grupo heterogéneo de alteraciones del sistema nervioso periférico que puede expresarse en cualquier localización corporal con alteraciones sensitivas, motoras, autonómicas o mixtas; y la nefropatía diabética (NFD) (Serviddio, 2008; Sánchez, 2010) la cual es de gran interés en este trabajo, ya que esta enfermedad constituye una de las complicaciones más importantes de la diabetes con repercusiones definidas en la calidad de vida de los pacientes y en el pronóstico global de la enfermedad (Torres & Zacarías, 2002).

I.3. Nefropatía diabética

Esta enfermedad es considerada la complicación microvascular más grave de la diabetes. De la totalidad de pacientes con diabetes, entre el 40 y 50 % tiene la

probabilidad de desarrollar NFD, con riesgo de llegar a insuficiencia renal terminal con necesidad de diálisis y trasplante renal. (Girach *et al.*, 2006; Serna, 2009).

La NFD se manifiesta con alteraciones en la filtración glomerular y un aumento de la excreción urinaria de albumina (microalbuminuria). Lo habitual es que la albuminuria progrese con una tasa del 2.8 % anual a macroalbuminuria, que puede llegar a alcanzar el rango nefrótico. (Serna *et al.*, 2009; Sánchez, 2010).

1.3.1. Fisiopatología de la nefropatía diabética

Las primeras alteraciones en los pacientes con NFD, posiblemente son un mecanismo compensatorio para prevenir la pérdida urinaria de agua y electrolitos, sobrecarga que generará daño glomerular (Zerbini *et al.*, 2006; Serna *et al.* 2009); lo que, disminuye el área de filtración glomerular con pérdida progresiva de la función renal. Por último, se observa glomeruloesclerosis y enfermedad renal terminal (Serna *et al.* 2009). Estos cambios son secundarios a la hiperglucemia que activa diferentes vías metabólicas, hemodinámicas y hormonales que promueven el daño renal (Raes *et al.*, 2007), entre las que destaca la vía de las ciclooxigenasas (COXs) y las diversas alteraciones en la producción de prostanoïdes (Serna *et al.* 2009, Cervantes, 2014).

1.4. Ruta metabólica del ácido araquidónico y vía de las ciclooxigenasas

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado, cuya oxidación origina mediadores lipídicos que reciben el nombre de eicosanoides. La producción de AA puede ser mediada por la estimulación de diferentes receptores como los adrenoreceptores y los receptores a angiotensina II (AT1), los cuales activan la fosfolipasa A₂ citosólica

(PLA₂), que es la principal enzima involucrada en la liberación de AA de las membranas celulares (figura 3) (Guzmán-Hernández *et al.*, 2015). Posteriormente el AA puede ser oxidado por dos rutas principales, la vía de las 5-lipooxigenasa (LOX) y la vía de las ciclooxigenasa (COX) (Campbell & Halushka, 1996).

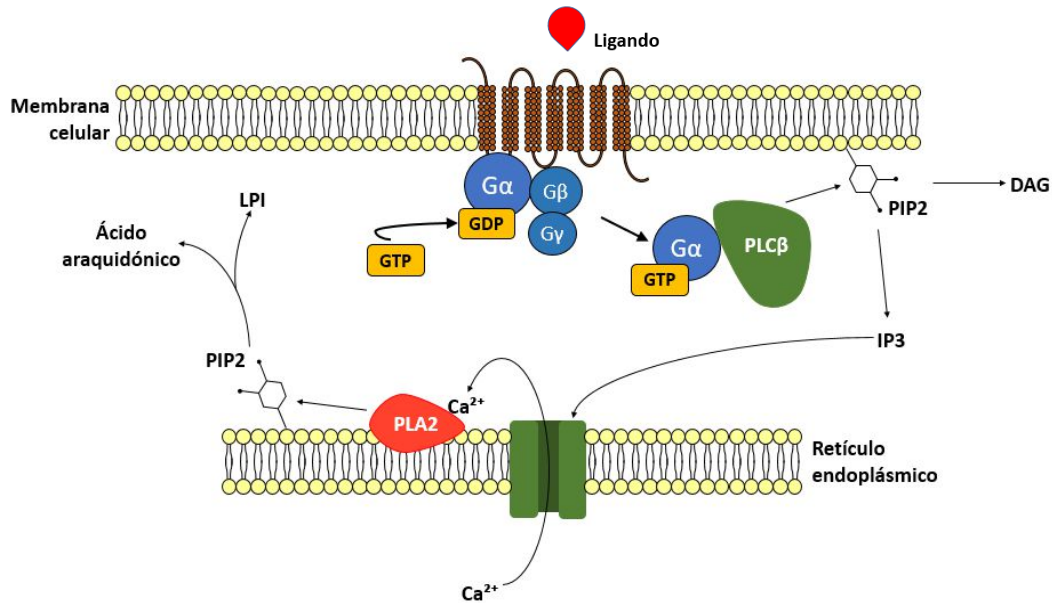


Figura 3. Liberación de ácido araquidónico mediante la estimulación de un receptor acoplado a una proteína G. G α , G β y G γ = subunidades de la proteína G, GTP= guanósín trifosfato, GDP= guanósín difosfato, PLC β = fosfolipasa C β , PIP₂= fosfatidilinosito difosfato, DAG= diacilglicerol, IP₃= inositol trifosfato, Ca²⁺= calcio intracelular, cPLA₂= fosfolipasa C₂, LPI= lisofosfatidilinositol, de donde fue tomado, dar el crédito al autor.

Las COXs o prostaglandinas endoperóxido sintasas, son proteínas de membrana que catalizan la formación de diversos prostanoides a partir del AA. En la actualidad se conocen dos isoformas de la COX, la COX 1 y la COX 2; estas isoformas conservan un 60% de homología en sus aminoácidos, (tomado de Guzmán-Hernández *et al.*, 2015).

La COX 1 y la COX 2, son las enzimas limitantes de la ruta oxidativa del AA; a través de la actividad bis-oxigenasa estas isoenzimas transforman el AA en prostaglandina G₂

(PGG_2), posteriormente, debido a la actividad de peroxidasa de las COXs, la PGG_2 (que se encuentra de forma inestable) se convierte en la prostaglandina H_2 (PGH_2), que es el sustrato de todas las sintasas de prostanoides, las cuales incluyen la prostaciclina sintasa (PGIS), la prostaglandina D_2 sintasa (PGDS), la prostaglandina E_2 sintasa (PGES), la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintasa (PGFS) y la tromboxano A_2 sintasa (TXAS) (Meresman & Olivares, 2012), cada una de estas sintasas produce su respectivo metabolito de naturaleza lipídica (figura 4).

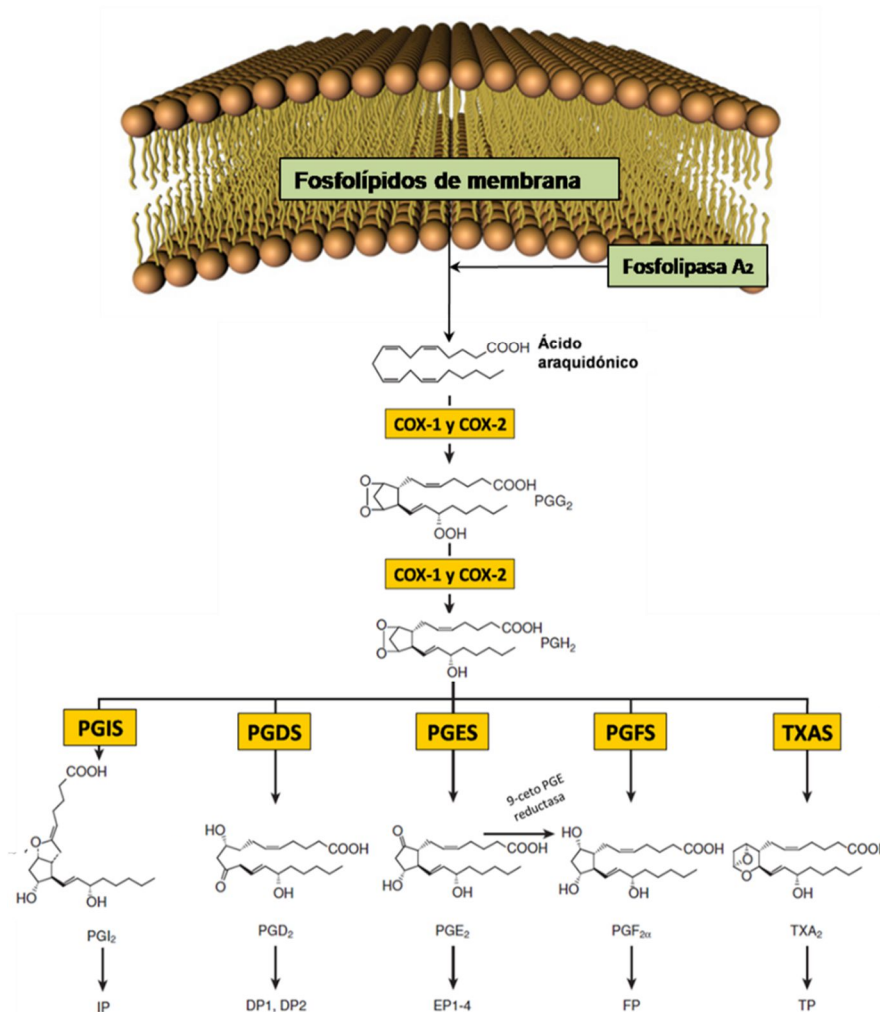


Figura 4. Ruta oxidativa del ácido araquidónico. Modificado de Brenner & Rector, 2016. p356.

1.4.1. Tromboxano sintasa

La TXAS es una proteína de 533 aminoácidos y un grupo prostético hemo que forma parte de la superfamilia citocromo P450 (figura 5), tiene un peso molecular cercano a los 60 kDa (Wang & Kulmacz, 2002; Brenner & Rector, 2016) y posee una vida media de aproximadamente 28 h (Wang & Kulmacz, 2002; Nüsing & Ullrich, 1992).

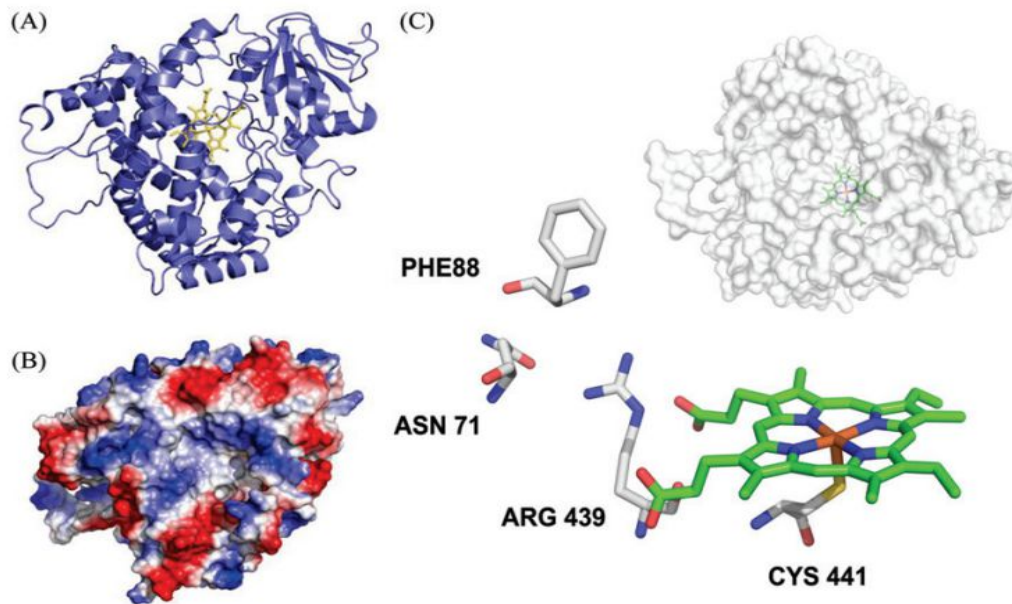


Figura 5. (A) Modelo teórico de la enzima TXAS mostrando las estructuras secundarias (α -hélices, β -plegadas en color violeta y el grupo hemo en amarillo). (B) Mapa de potencial electrostático de TXAS (positivo y negativo en azul y rojo, respectivamente). (C) Estructura globular del modelo de TXAS resaltando el grupo hemo vinculado a Cys 441 con residuos circundantes Phe 88, Asn 71 y Arg 439, Tomado de Sathler *et al.*, 2013.

En el humano, el gen que codifica para esta enzima es el gen *Tbxas1*, el cual es de copia única y está ubicado en el cromosoma 7q34-35. La secuencia de este gen está formada por 193 kb, y se han identificado 13 exones y cinco intrones grandes (dos de 45 kb, y los tres restantes de 37, 25 y 17 kb respectivamente) (figura 6), lo que lo convierte en el mayor gen del citocromo P450 que se haya caracterizado hasta la fecha; el gen *Tbxas1*

se transcribe como un RNAm de 2.1 kb (0.14 kb de región 5' no traducida, 1.6 kb de región codificante y 0.4 kb de región 3' no traducida) y su regulación se da principalmente a nivel transcripcional (Wang & Kulmacz, 2002).

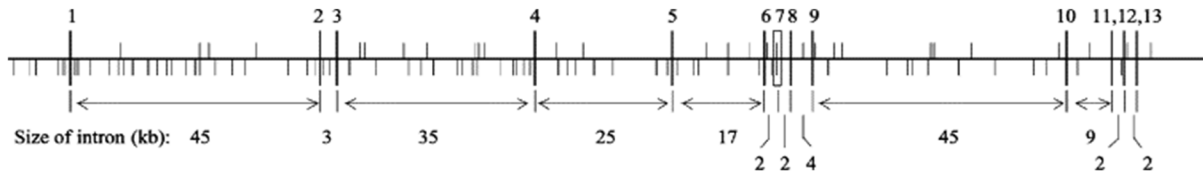


Figura 6. Organización del gen *Tbxas1* humano. Los exones se muestran como líneas verticales largas. Los sitios *Bam*HI están indicados por las líneas verticales grises superiores y los sitios *Eco*RI por las líneas verticales grises inferiores. El tamaño de los intrones está indicado en la parte inferior. Tomado de Wang & Kulmacz, 2002.

Aunque el RNAm de la TXAS se expresa principalmente en células hematopoyéticas, incluyendo plaquetas, macrófagos y leucocitos, también se expresa en varios tejidos, particularmente en pulmón, hígado, bazo, próstata, placenta, timo y riñón (Wang & Kulmacz, 2002). En el riñón, el gen *Tbxas1* se localiza en los podocitos y en las células de la vasculatura renal (Remuzzi *et al.*, 1992; Brenner & Rector, 2016).

La enzima TXAS cataliza dos reacciones distintas a partir de la PGH_2 :



La primera reacción es una fragmentación de PGH_2 para formar el ácido 12-hidroxi-5, 8, 10-heptadecatrienoico (12-HHT) y malondialdehído (MDA), y la segunda es una isomerización sobre la PGH_2 (figura 7), dando como resultado la producción de tromboxano A_2 (TXA_2).

Ambas reacciones tiene un proceso similar, el cual comienza con la interacción del grupo hemo de la TXAS y el oxígeno unido al carbono 9 (C-9) de la PGH₂ (Paso 1 en la figura 7), posteriormente el grupo hemo férrico experimenta una transición rédox de Fe (III) en reposo a Fe (IV) al romper el enlace entre los oxígenos de la PHG₂, generando radicales libres (Paso 2 de la figura 7), y el último paso antes de la síntesis de los productos finales es nuevamente la ruptura de un enlace ahora entre el C-10 y el C-11 (Paso 3 en la figura 7) (Wang & Kulmacz, 2002; Hecker & Ullrich, 1989).

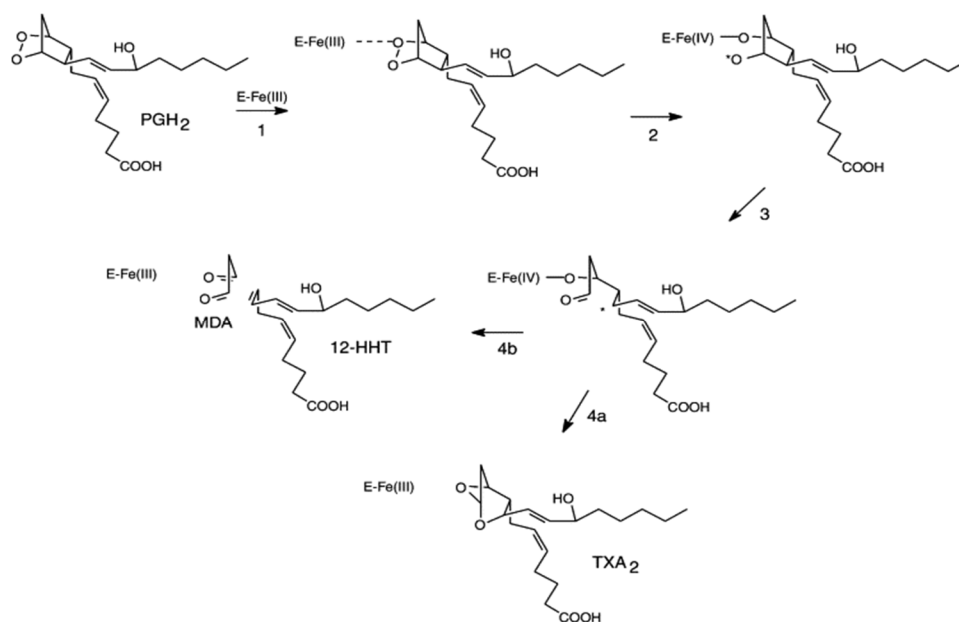


Figura 7. Mecanismo de reacción propuesto para la TXAS. Tomado de Wang & Kulmacz, 2002.

1.4.2. Tromboxano A₂

El TXA₂ es un potente mediador de la agregación plaquetaria, la broncoconstricción y la vasoconstricción, con una vida media muy corta (aproximadamente 30 segundos) (Kontogiorgis & Hadjipavlou-Litina, 2010). Debido a su naturaleza efímera, funciona principalmente como un mediador autocrino o paracrino en los tejidos cercanos que

rodean su sitio de producción (Rodríguez, 1986); en el riñón, fisiológicamente, el TXA₂ está involucrado en la hemodinamia y la hemostasia renal mediante la regulación de la contracción vascular (Cediel *et al.*, 2002; Nápoles & Nápoles, 2012), además, también puede contribuir de manera importante en el daño renal, debido a que una marcada vasoconstricción reduce el flujo sanguíneo, el TXA₂ también estimula la contracción de las células mesangiales, y por lo tanto puede tener efectos directos en la filtración glomerular y la proteinuria que son independientes de sus efectos sobre la vasculatura renal (Thomas & Coffman, 1998).

Por otro lado, si el TXA₂ no se une a su receptor (receptor TP), se hidroliza para dar paso al TXB₂, que es un metabolito más estable pero biológicamente inactivo (Muñoz, 1999).

1.4.3. Receptor de tromboxano A₂

El TXA₂ lleva a cabo su función al unirse con el receptor de tromboxano A₂ (TP), el cual se distribuye de manera prioritaria en las plaquetas (Remuzzi *et al.*, 1992), también exhibe una amplia distribución en diferentes órganos. En el riñón se localiza en la corteza renal, especialmente en glomérulos, arterias y arteriolas, además, también se ha reportado en células de transicionales de la papila renal y en menor cantidad en la medula renal (Thomas & Coffman, 1998).

El receptor TP es una proteína de 7 dominios transmembranales acoplado a la proteína G_q, por lo que su estimulación genera un cambio conformacional en la subunidad α de la proteína G_q, provocando la liberación la subunidad α y por ende la activación de la

fosfolipasa C β (PLC β). Cuando la PLC β se activa, hidroliza un fosfolípido de membrana llamado fosfatidilinositol-4, 5-difosfato (PIP2) para generar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP3). El DAG activa en forma directa miembros de la proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP3 estimula la liberación de calcio (Ca $^{2+}$) desde las reservas del retículo endoplásmico incrementando la concentración citoplásmica (Matadamas-Zárate *et al.*, 2009; Blumenthal & Garrison, 2012). El aumento de Ca $^{2+}$ en el interior de la célula permite la unión de la proteína calmodulina con cuatro iones de Ca $^{2+}$, formando el complejo Ca $^{2+}$ /calmodulina, que causa contracción mediante la estimulación de la cinasa de cadena ligera de miosina sensible a Ca $^{2+}$ /calmodulina para producir fosforilación de la subunidad reguladora de la miosina, una proteína contráctil (figura 8) (Blumenthal & Garrison, 2012).

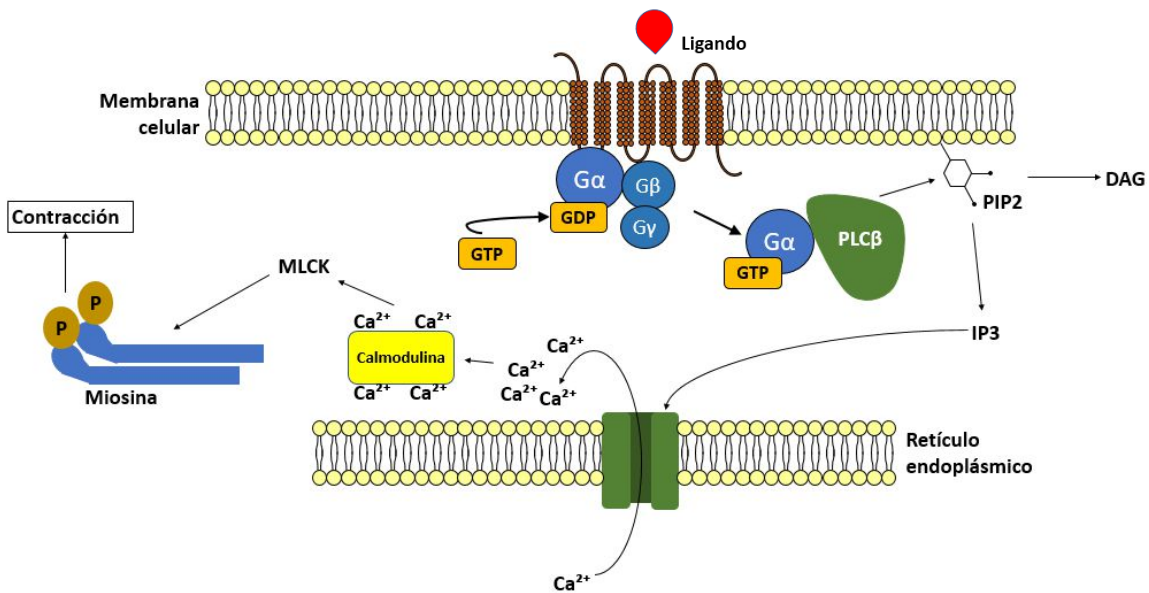


Figura 8. Mecanismo de contracción vascular mediado por el receptor TP. G α , G β y G γ = subunidades de la proteína G, GTP= guanósín trifosfato, GDP= guanósín difosfato, PLC β = fosfolipasa C β , PIP2= fosfatidilinosito difosfato, DAG= diacilglicerol, IP3= inositol trifosfato, Ca $^{2+}$ = calcio intracelular, MLCK= Cinasa de la cadena ligera de la miosina, P= grupo fosfato. Cita

En el humano existen dos isoformas del receptor a tromboxano (TP α y TP β), que surgen a través de corte y empalme diferencial de ARNm. La transcripción de las isoformas es impulsada a través de promotores distintos, lo que sugiere que cada una posee por lo menos una función independiente, lo cual aún no está del todo claro (Smyth, 2010).

2. ANTECEDENTES

El TXA₂ es un potente mediador de la vasoconstricción involucrado en la regulación de la hemodinamia y el remodelamiento vascular renal (Cediel *et al.*, 2002; Nápoles & Nápoles, 2012). En condiciones patológicas, la síntesis de TXA₂ incrementa significativamente sobrepasando los niveles fisiológicos, esto provoca un aumento en la vasoconstricción, que con el paso del tiempo promueve el desarrollo del daño renal (Centeno *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2011), sin embargo, el mecanismo que subyace en este proceso es aún desconocido.

En nuestro laboratorio (Eroza, 2016) se demostró que durante la evolución de la diabetes se modifica la síntesis de prostanoïdes, reduciendo la producción de prostaglandinas vasodilatadoras, y favoreciendo la liberación de vasoconstrictores como el TXA₂, causando el aumento del tono vascular que contribuye de manera importante a la desregulación del flujo renal. Por otra parte, se ha reportado que, en condiciones de hipoxia, la enzima NADPH oxidasa (NOX) incrementa la expresión de la TXAS (Muzaffar, 2011); sabiendo que la diabetes frecuentemente se relaciona con la hipoxia celular en la vasculatura (Bento & Pereira, 2011), lo que nos hizo pensar que, durante la diabetes, el aumento de los niveles de TXA₂ puede ser el resultado de la sobreexpresión de la TXAS.

Si bien es cierto que, la expresión de TXAS en el riñón en condiciones normales son bajas con relación a otras sintasas de prostanoïdes, el desarrollo de alguna patología, puede inducir su sobreexpresión y modificar el panorama general de la enfermedad (Tsutsumi *et al.*, 1997).

Por otro lado, la hipoxia que se produce durante la hipertensión pulmonar neonatal provoca el incremento de las concentraciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular, como resultado del aumento de la sensibilidad y reactividad de los receptores TP (Hinton *et al.*, 2006); en estas circunstancias la unión de los receptores TP con el TXA_2 causa una mayor contracción en la vasculatura, hecho que puede favorecer los procesos que determinan el daño a nivel vascular; en el mismo sentido, la diabetes afecta de manera directa la condición general de la vasculatura, por lo que es posible que, en la diabetes se presente un fenómeno similar que altere la respuesta contráctil a través de los receptores TP y que además la localización vascular tanto de TP como de la TXAS se modifiquen.

El aumento constante de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROs), generadas entre otros mecanismos, por la unión de los receptores TP con el TXA_2 , regula positivamente la expresión de los receptores TP; además, las ROS forman una variedad de isoprostanos que, por su lado, pueden elevar aún más la biosíntesis de receptores TP (Wilson *et al.*, 2009), esto nos sugiere que, parte del aumento en la respuesta de contracción observado a lo largo de la diabetes puede ser ocasionada por el incremento en la expresión del receptor TP a nivel de proteína.

Diversos estudios, han reportado la presencia de los receptores TP a nivel endotelial durante patologías que afectan los tejidos vasculares (Nie *et al.*, 2000; Ashton & Ware, 2004); a diferencia de lo que sucede en las células del musculo liso vascular (CMLV), la activación de los receptores TP a nivel endotelial no regula directamente los procesos de contracción, sino que, en este caso aumenta la producción de TXA₂ (Gluais *et al.*, 2006), posiblemente a través del incremento de Ca²⁺ intracelular y la sobreexpresión de la TXAS, por lo que es probable que, durante la diabetes, la localización del receptor TP también se vea favorecida en el endotelio, lo que resultaría en un proceso que promueve la vasoconstricción mediante el aumento de síntesis de TXA₂.

3. JUSTIFICACIÓN

La nefropatía diabética constituye una de las complicaciones más significativas con repercusiones en la calidad de vida de los pacientes y en el pronóstico global de la enfermedad, y aunque los avances en el conocimiento de esta enfermedad son cada vez más precisos, las rutas bioquímicas que intervienen durante esta complicación aún no están del todo claras.

Muchos estudios reportan alteraciones en la vía de las ciclooxigenasas durante el desarrollo de la diabetes y la nefropatía diabética; dentro de estas alteraciones destaca la sobreproducción del tromboxano A₂ y una aparente desregulación funcional de su receptor, por lo que el estudio de la enzima que sintetiza el TXA₂ (la sintasa de TXA₂) y el receptor TP resulta de gran interés, dado que investigar específicamente las alteraciones de la vía del tromboxano en el riñón de ratas diabéticas, nos dará pauta

para conocer si una sobre activación de toda la vía puede estar contribuyendo al daño renal conforme evoluciona la enfermedad; y así mismo proponer nuevas y mejores alternativas farmacológicas para prevenir o tratar la el daño renal provocado por la diabetes diabética.

4. HIPÓTESIS

Si la cantidad de tromboxano incrementa durante la evolución de la diabetes, la respuesta vasocontráctil renal a TXA_2 incrementará como resultado de la sobreexpresión del receptor TP y de la sintasa de tromboxano, lo que contribuye al desarrollo del daño renal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Evaluar si la evolución de la diabetes modifica la participación de la sintasa (TXAS) y del receptor a tromboxano (TP) en la regulación del tono vascular renal de ratas durante dos etapas de la diabetes (1 y 4 semanas)

5.2. Objetivos particulares:

- Evaluar la participación de la TXAS en la respuesta vascular a fenilefrina en riñones de ratas Wistar diabéticas.

- Analizar la participación del receptor TP en la respuesta vascular a I-Bop en riñones de ratas Wistar diabéticas.
- Evaluar la participación de la TXAS en la respuesta vascular a I-Bop en riñones de ratas Wistar diabéticas.
- Determinar la expresión de la TXAS y el receptor TP a nivel de proteína en la corteza renal de ratas diabéticas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Las ratas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas, libres de patógenos, a temperatura (20°C + 2°C) y con humedad relativa de 40-60%, con ciclos de luz-oscuridad 12/12 h, agua y alimento *ad libitum* (dieta estándar de purina SA, México). El mantenimiento y los procedimientos experimentales para el cuidado de ratas se realizaron de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México; se dividieron en 4 grupos experimentales: 2 grupos controles y 2 grupos diabéticos.

6.2. Inducción de la diabetes experimental

Previo a la inducción de la diabetes y con el fin de verificar que todas las ratas fueran normoglucémicas, se midió la glucosa en sangre periférica con un glucómetro (Accu-

Chek® Performa). La inducción de la diabetes se llevó a cabo por la administración de una dosis única de 65mg/kg del fármaco estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich®) vía intraperitoneal (I.P.). A los grupos controles se les administró únicamente el vehículo (amortiguador de citratos) a un pH de 4.5, a una concentración de 50mM (Furman, 2015).

Posterior a 72 horas después de la inducción, se midió la glucosa para comprobar hiperglucemia en las ratas administradas con STZ. Se permitió la evolución de la diabetes durante 1 y 4 semanas, tiempo en el cual se volvió a medir la glucosa y sólo las ratas que presentaron valores >200 mg/dl se consideraron experimentalmente diabéticas (Furman, 2015).

6.3. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y a I-Bop

Cada una de las ratas se pesó y se anestesió con una dosis única de pentobarbital sódico (60 mg/kg vía I.P.) para hacer la disección del riñón derecho. A través de una laparatomía abdominal; el riñón fue localizado tras una disección en planos, interrumpiendo el flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior y de la aorta abdominal por arriba y por abajo de la convergencia con la arteria mesentérica. Después se introdujo una cánula por la arteria mesentérica hasta llegar a la arteria renal derecha y se realizó una perfusión *in situ* con solución buffer Krebs-Henseleit compuesta por (mM) NaCl, 118; KCL, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.026 y glucosa 6.05, a 37 °C, pH 7.4 y oxigenación constante (95% O₂, 5% CO₂) (Nobakht-Haghighi et al., 2018; Castro-Moreno et al., 2012).

Posteriormente el riñón se aisló y se montó en un sistema tipo Langendorff, donde se perfundió continuamente con un flujo de 10 ml/min (Uchino, 1991) con solución Krebs-

Henseleit. Se permitió que la presión de perfusión (P.P.) se estabilizara por 1 hr, al término de ese lapso se despolarizó la membrana agregando solución de Krebs alto en potasio 80 mM hasta alcanzar la presión máxima (control de contracción máxima, independiente de receptor), posterior a esto se volvió a estabilizar la P.P. durante 30 min.

Se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Cas. 61-76-7, Sigma-Aldrich®), un agonista α 1-adrenérgico, comenzando con una concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ($10 \mu\text{l}$) hasta llegar a $1 \times 10^{-1} \text{M}$ en intervalos espaciados por un factor de $10^{1/2}$, en presencia y ausencia de Ozagrel ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) (Sigma-Aldrich®), inhibidor selectivo de la enzima tromboxano sintasa.

Para cumplir con el segundo objetivo, se realizó el mismo procedimiento, en este caso se usó el agonista selectivo del receptor TP, I-Bop (Cayman Chemical®), comenzando con una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ hasta llegar a $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en presencia y ausencia de Ozagrel ($1 \times 10^{-7} \text{M}$).

Las P.P. se registraron con una unidad de adquisición de datos (MP100A-CE, Biopac® systems, inc.) y se analizaron con el software AcqKnowledge 3.9.1 (Biopac® systems, inc.). Al finalizar estos experimentos, a los riñones se les quitó el exceso de solución de perfusión y se pesaron para calcular el índice de masa renal.

6.4. Expresión de la enzima tromboxano sintasa y el receptor de tromboxano

Para realizar estos experimentos se utilizó un grupo diabético ($n=5$) y un grupo control ($n=4$) para cada tiempo de evolución de la diabetes (1 y 4 semanas).

Los riñones de estos animales se perfundieron con PBS durante 3 minutos, posteriormente se cortaron de manera longitudinal y se tomaron ~50 mg de corteza, los cuales se colocaron en 1ml de solución RIPA con inhibidor de proteasas (Minicomplete Roche®). Cada muestra se trituró con un homogeneizador Polytron (PT 10-35), se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recolectó y en 10 µl se determinó la concentración de proteínas, por el método modificado de Lowry. El resto del sobrenadante se separó en alícuotas de 90 µl y se adicionaron 10 µl de buffer de Laemmli. Después, se realizó la separación de las proteínas (100 µg) mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (80 Volts para concentrar la muestra y 100 Volts para separar), después que las proteínas se separaron, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinil dieno (PVDF) (Amersham Biosciences®) por electrotransferencia (60 min, 15V).

Para la detección de la enzima tromboxano sintasa se utilizó un anticuerpo policlonal 1:200 (ab39362, abcam®), incubado toda la noche a 4 °C, y como anticuerpo secundario se utilizó anti-Rabbit HRP 1:2000 (65-6120, Invitrogen®) unido a peroxidasa. Para determinar la expresión del receptor TP se usó un anticuerpo monoclonal a una concentración 1:500 (ab134959, abcam®), incubado a 4 °C durante toda la noche. Como proteína de referencia en ambos casos se usó actina, utilizando un anticuerpo anti β-actina (1:1000) (D6A8, Santa Cruz).

Para visualizar las bandas con las proteínas de interés, se hizo una reacción con Luminol (Santa Cruz Biotechnology®) y se captaron en una película de detección (Fujifilm®, Cat 4741012976), la cual se reveló y fijó con reactivos Carestream® (REF1900943 y 1838374). Las imágenes en las películas se digitalizaron con un fotodocumentador (BIO-

RAD®) y la intensidad de las bandas se determinó por análisis de imágenes con el software Multi-Gauge 3.0 (Fujifilm); por último, se realizó una gráfica mostrando la abundancia relativa de la enzima en corteza renal, al relacionar la intensidad de pixeles (proteína de interés/ β -actina).

7. RESULTADOS

7.1. Cuantificación de glucosa en sangre

La glucosa en sangre se midió después de 1 y 4 semanas de la inducción de la diabetes experimental; en el grupo control, el promedio de los valores de glucosa en sangre fue de 96 ± 5 mg/dl, tanto en ratas de 1 como de 4 semanas, por otra parte, en los grupos experimentales el promedio superó los 400 mg/dl de glucosa en ambos tiempos estudiados, observando una diferencia estadísticamente significativa entre ratas controles y ratas diabéticas. (figura 9).

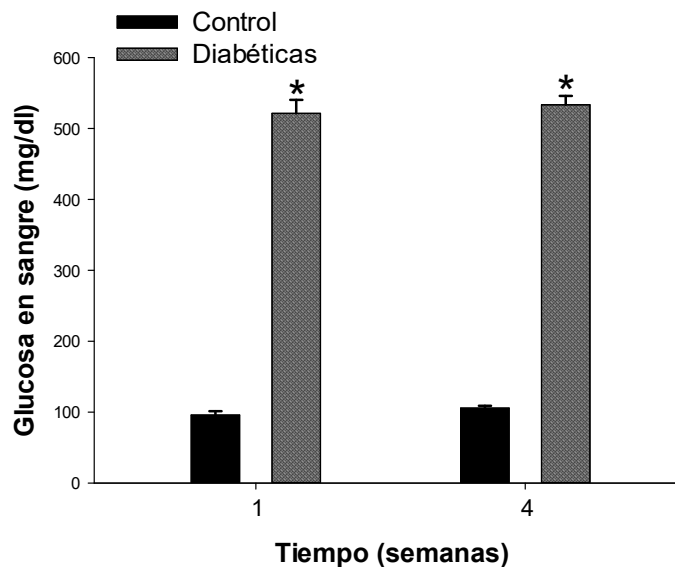


Figura 9. Glucosa en sangre después de 1 y 4 semanas con diabetes. Las gráficas muestran la media \pm E.E. (n por grupo=10-16), * $p < 0.05$ vs control.

7.2. Peso corporal

Las ratas fueron elegidas al azar para formar cada grupo y el valor medio del peso de las ratas al inicio del experimento fue de $277.5 \text{ g} \pm 11.5$ en los grupos control y 281.9 ± 13.2 en los grupos diabéticos; conforme pasaron los tiempos establecidos para el estudio, dichos pesos se modificaron en todos los grupos. El peso corporal de las ratas control fue de $336 \text{ g} \pm 8$ para el grupo de 1 semana y $357 \text{ g} \pm 7$ para el grupo de 4 semanas; por otro lado, las ratas diabéticas de 1 semana de evolución pesaron en promedio $280 \text{ g} \pm 6$, mientras que las ratas de 4 semanas con diabetes registraron valores de $249 \text{ g} \pm 11$ (figura 10)

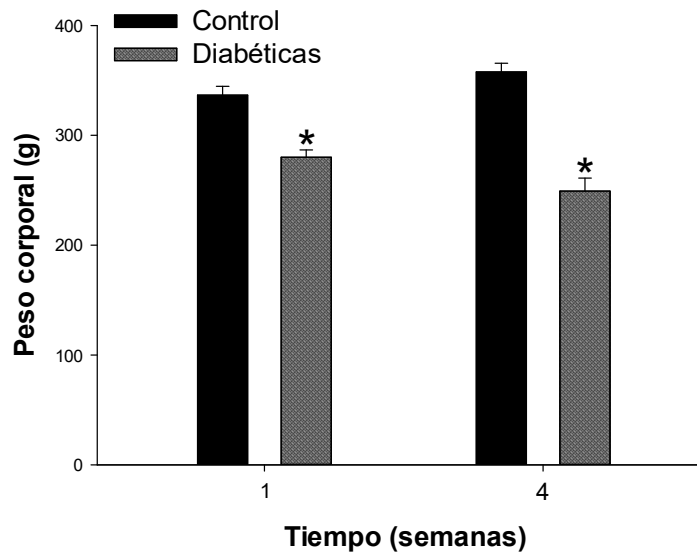


Figura 10. Peso corporal después 1 y 4 semanas con diabetes. Las gráficas representan la media \pm E.E. (n por grupo = 10-16), * $p < 0.05$ vs control.

7.3. Peso e índice de masa renal

El peso promedio de los riñones del grupo diabético después de 1 semana de evolución ($1.618 \text{ g} \pm 0.05$) presentó una diferencia significativa con respecto su grupo control (1.45 g)

± 0.04); los riñones de ratas de 4 semanas con diabetes mostraron la misma tendencia ($1.71\text{g} \pm 0.04$) en relación con el grupo control ($1.24\text{g} \pm 0.03$). Con base a los pesos de cada riñón se calculó el índice de masa renal (IMR), que se describe como la relación del peso renal/peso corporal multiplicado por 100. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos de los grupos control y diabéticos, siendo las ratas diabéticas las que presentaron un mayor IMR en relación con su respectivo grupo control.

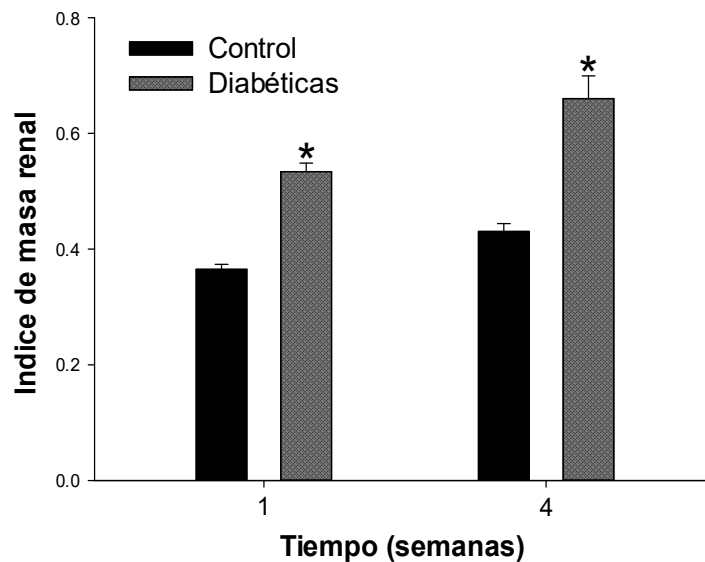


Figura 11. Índice de masa renal después de 1 y 4 semanas con diabetes. Las gráficas representan la media \pm E.E. (n por grupo = 10-16), * $p < 0.05$ vs control.

7.4. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en riñones de ratas Wistar

En los experimentos de órgano aislado, la administración de fenilefrina provocó en los riñones de todos los grupos experimentales, un incremento en la P.P. dependiente de la concentración, hasta alcanzar un efecto máximo. En los riñones de ratas con 1 semana de evolución, el efecto de la fenilefrina en la contracción de la vasculatura renal del grupo

diabético se observa como una ligera disminución en la P.P. con respecto a su grupo control, fenómeno observado exclusivamente a altas concentraciones del agonista fenilefrina (figura 12a; tabla 3). Sin embargo, el efecto de fenilefrina sobre la respuesta contráctil se invierte en los riñones de ratas de 4 semanas con diabetes, mostrando un aumento significativo de la presión de perfusión en relación con su grupo control (figura 12b; tabla 3).

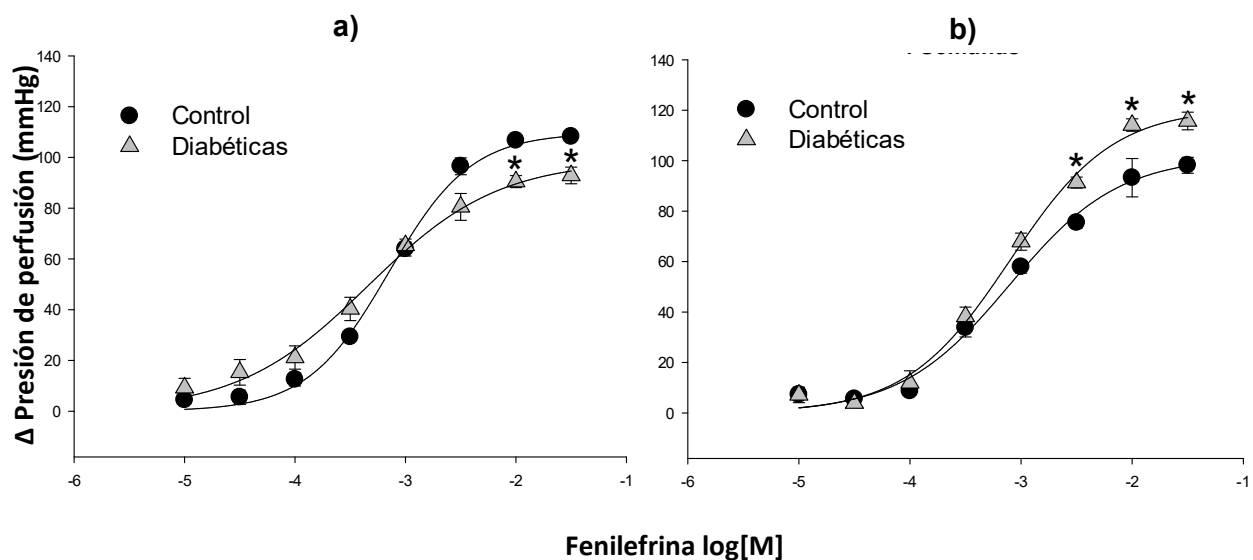


Figura 12. Presión de perfusión en riñón inducida por fenilefrina. a) 1 semana de evolución de diabetes y b) 4 semanas de evolución. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

7.5. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal inducida por fenilefrina después de 1 semana de evolución de la diabetes.

La inhibición de la TXAS con Ozagrel, no generó ningún cambio en la contracción vascular inducida por fenilefrina en los riñones control de las ratas de 1 semana, respecto

al grupo control (figura 13a; tabla 3). Sin embargo, el bloqueo de la TXAS en los riñones del grupo diabético de la misma edad, la respuesta contráctil a altas concentraciones de fenilefrina disminuyó de manera significativa en relación al grupo diabético en ausencia del inhibidor (figura 13b; tabla 3).

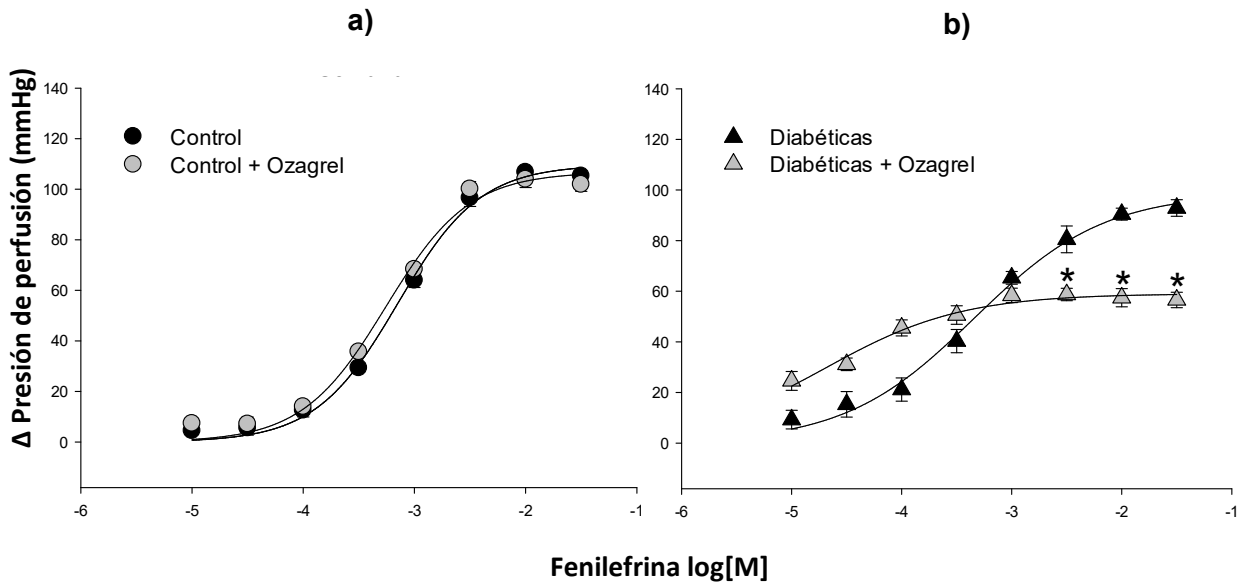


Figura 13. Efecto de la inhibición de la TXAS con Ozagrel en la presión de perfusión inducida con fenilefrina en riñones de ratas de 1 semana con diabetes. a) grupo control y b) grupo diabético. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

7.6. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal inducida por fenilefrina después de 4 semanas de evolución de diabetes.

En riñones de ratas control, el Ozagrel no modificó la contracción vascular inducida por fenilefrina (figura 14a; tabla 3); sin embargo, al inhibir la TXAS en el grupo diabético de 4 semanas de evolución, la respuesta contráctil inducida por el agonista adrenérgico

disminuyó de manera significativa en comparación con el grupo diabético sin el inhibidor (figura 14b, tabla 3).

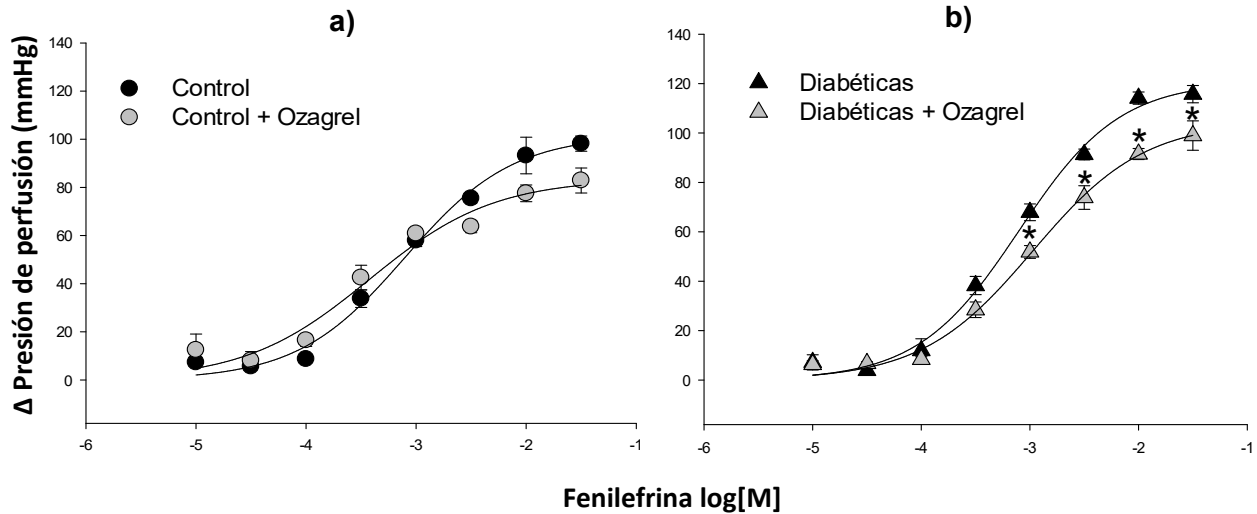


Figura 14. Efecto de la inhibición de la TXAS con Ozagrel en la presión de perfusión inducida con fenilefrina en riñones de ratas de 4 semanas con diabetes. a) grupo control y b) grupo diabético. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

Tabla 3. Efecto de fenilefrina en la potencia (EC_{50}) y la eficacia (E_{max}). Los valores representan la media \pm E.E. de 5-6 ratas por grupo. $P < 0.05$ **Diabético vs Diabético + Ozagrel.

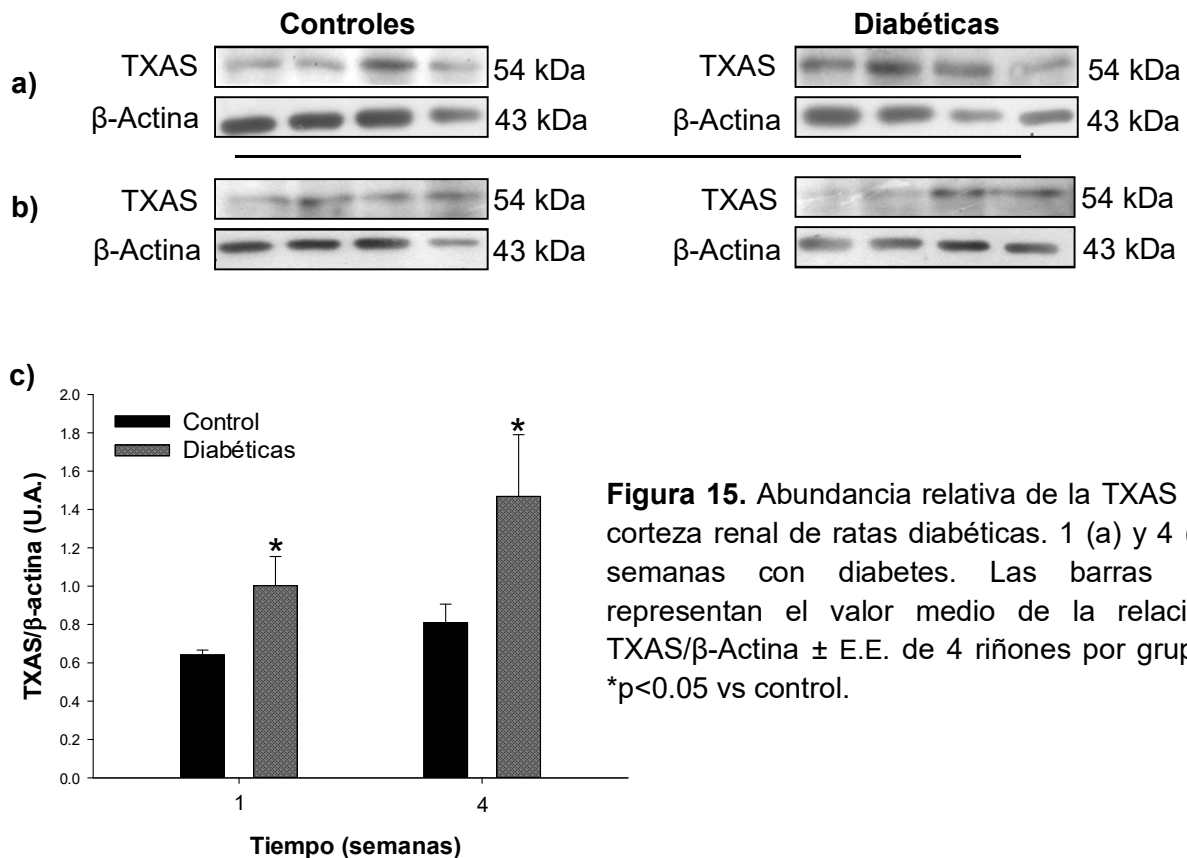
	Control	Control + Ozagrel	Diabético	Diabético + Ozagrel
1 semana de edad				
EC_{50} (M)	7.2×10^{-4}	5.5×10^{-4}	4.6×10^{-4}	2×10^{-5}
E_{max} (mmHg)	109.7 ± 3	106.8 ± 4	98.8 ± 3.9	$59 \pm 1.7^{**}$
4 semanas de edad				
EC_{50} (M)	7.9×10^{-4}	4×10^{-4}	7.9×10^{-4}	1×10^{-3}
E_{max} (mmHg)	100.7 ± 4.8	91.6 ± 6.5	120.9 ± 4.4	$104.7 \pm 4.1^{**}$

Estos datos nos sugieren que, durante la diabetes, tanto en etapas iniciales (1 semana), como en etapas avanzadas (4 semanas) existe un incremento mayor actividad de TXA2,

quizá como resultado de la expresión de la TXAS a nivel de proteína, por lo que decidimos realizar la cuantificación relativa por inmunodetección de la enzima TXAS, obteniendo los resultados que se describen a continuación.

7.7. Expresión a nivel de proteína de la enzima de la tromboxano sintasa

La abundancia relativa de la enzima TXAS en la corteza renal se cuantificó mediante inmunodetección con la técnica de Western Blot (WB); para ello se utilizaron 4 riñones por cada grupo y un anticuerpo específico. El peso molecular de la TXAS detectado por el anticuerpo fue de 54 kDa. La expresión de la TXAS en riñones de ratas de 1 semana con diabetes fue significativamente mayor que su respectivo grupo control (figura 15a y 15c); mientras que, en riñones de ratas de 4 semanas, la abundancia relativa de la enzima es todavía mayor con respecto a los controles (figura 15b y 15c).



Otra posible alteración en esta vía causada por la diabetes, es el incremento de la respuesta contráctil y/o expresión del receptor a tromboxano (TP), por tanto, probamos el agonista del receptor TP (I-Bop), sobre la vasculatura renal para analizar la respuesta de vascular dependiente de este receptor.

7.8. Curvas concentración-respuesta al agonista del receptor de tromboxano (I-Bop)

En estos experimentos evaluamos la P.P. renal en respuesta a I-Bop. La estimulación del receptor TP con I-Bop provocó un aumento en la respuesta contráctil en los riñones de los grupos diabéticos respecto a los grupos control (figura 16a y 16b; tabla 4); cabe destacar que la presión registrada en el grupo diabético de 4 semanas fue mayor que la del grupo diabético de 1 semana.

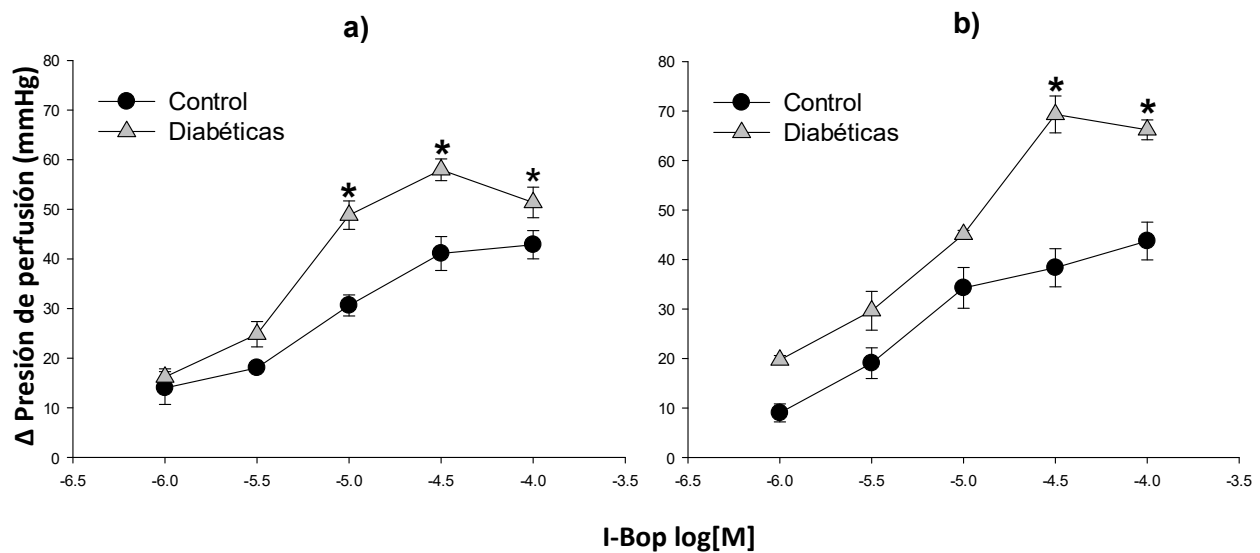


Figura 16. Presión de perfusión inducida por I-Bop en riñón de ratas. a) 1 semana de evolución de diabetes y b) 4 semanas de evolución. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

De manera interesante, los resultados obtenidos en las curvas de concentración-respuesta a I-Bop nos indican un posible incremento en la expresión a nivel de proteína del receptor TP, por lo que se decidió cuantificar mediante la técnica de WB para determinar si efectivamente existe una sobreexpresión de este receptor durante desarrollo de la diabetes.

7.9. Expresión a nivel de proteína del receptor de tromboxano

La expresión del receptor TP en la corteza renal se realizó usando con un anticuerpo específico, y fue detectado a los 37 kDa aproximadamente. Los resultados muestran que, en los riñones de las ratas diabéticas de 1 semana, la expresión del receptor TP aumenta en comparación con su grupo control (figura 17a y 17c), y a las 4 semanas, el incremento de la expresión del receptor TP es mayor a la de las ratas diabéticas de 1 semana (figura 17b y 17c).

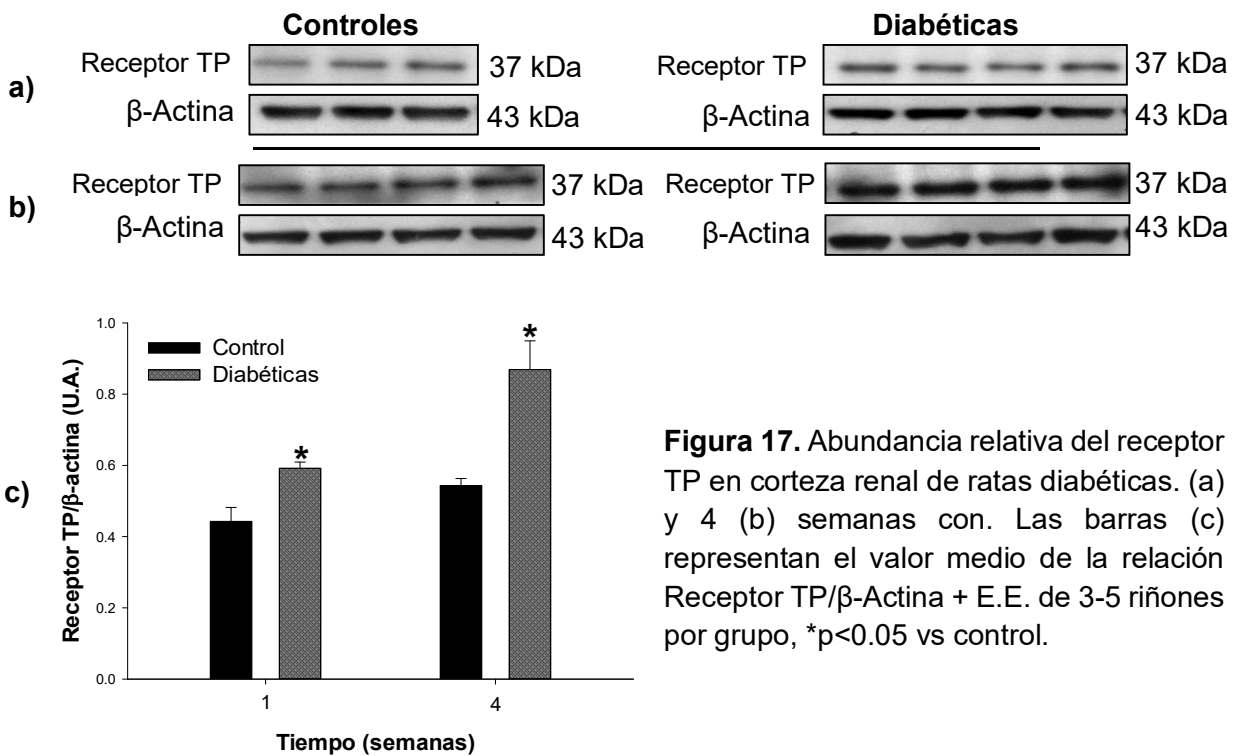


Figura 17. Abundancia relativa del receptor TP en corteza renal de ratas diabéticas. (a) y 4 (b) semanas con. Las barras (c) representan el valor medio de la relación Receptor TP/ β -Actina + E.E. de 3-5 riñones por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

De acuerdo a varios estudios como el de Ashton & Ware (2004), es posible que, durante la diabetes, la localización del receptor TP se incremente en el en endotelio vascular, favoreciendo la liberación de TXA_2 , por lo que realizamos curvas de concentración-respuesta en riñones de ratas utilizando el agonista del receptor TP en presencia del inhibidor selectivo de la TXAS.

7.10. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal en respuesta a I-Bop después de 1 semana de evolución.

La contracción vascular que se observó en los riñones de las ratas control de 1 semana en presencia de Ozagrel, no presentó ninguna diferencia con respecto a la mostrada por los riñones de las ratas del grupo sin el inhibidor (figura 18a; tabla 4). De modo contrario a lo observado en los grupos controles, en los grupos diabéticos, el bloqueo de la TXAS provocó la disminución de la p.p. en comparación con los riñones de las ratas diabéticas sin Ozagrel (figura 18b; tabla 4).

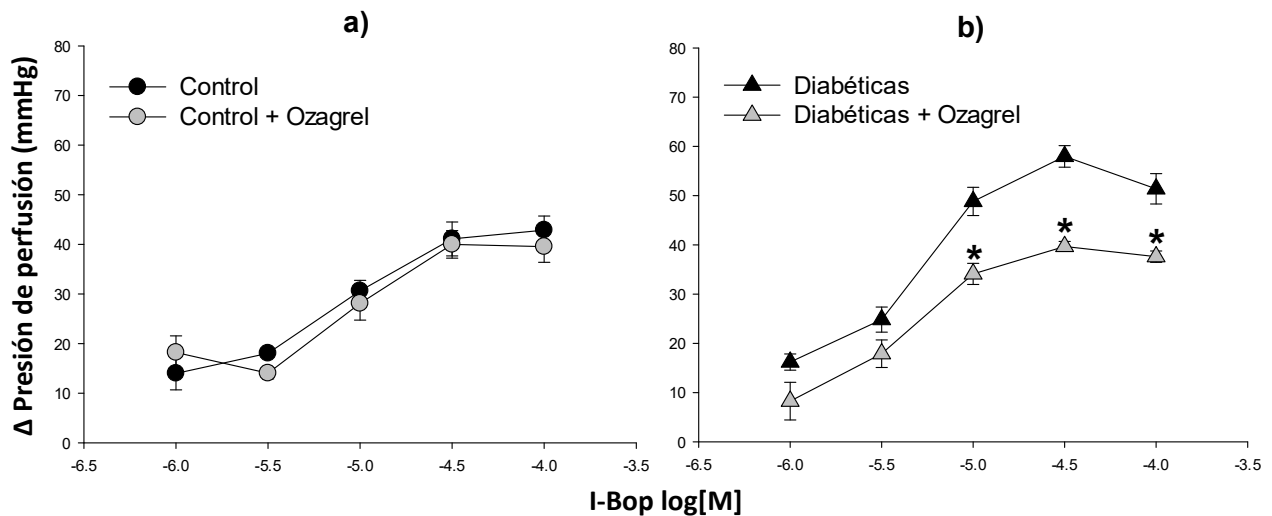


Figura 18. Presión de perfusión inducida por I-Bop en riñón de ratas con 1 semana de evolución. Las gráficas muestran el efecto de la inhibición de la TXAS con Ozagrel. a) grupo control y b) grupo diabético. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

7.11. Efecto de la inhibición de la enzima tromboxano sintasa en la presión de perfusión renal en respuesta a I-Bop después de 4 semanas de evolución.

De manera similar a lo que sucedió en los experimentos con los riñones de ratas con 1 semana de evolución, la inhibición de la TXAS en el grupo control no provocó ningún cambio en la p.p. (figura 19a; tabla 4). Sin embargo, al perfundir los riñones de las ratas con 4 semanas de diabetes, el Ozagrel disminuyó casi por completo la respuesta de contracción con relación al grupo diabético sin el inhibidor (figura 19b; tabla 4).

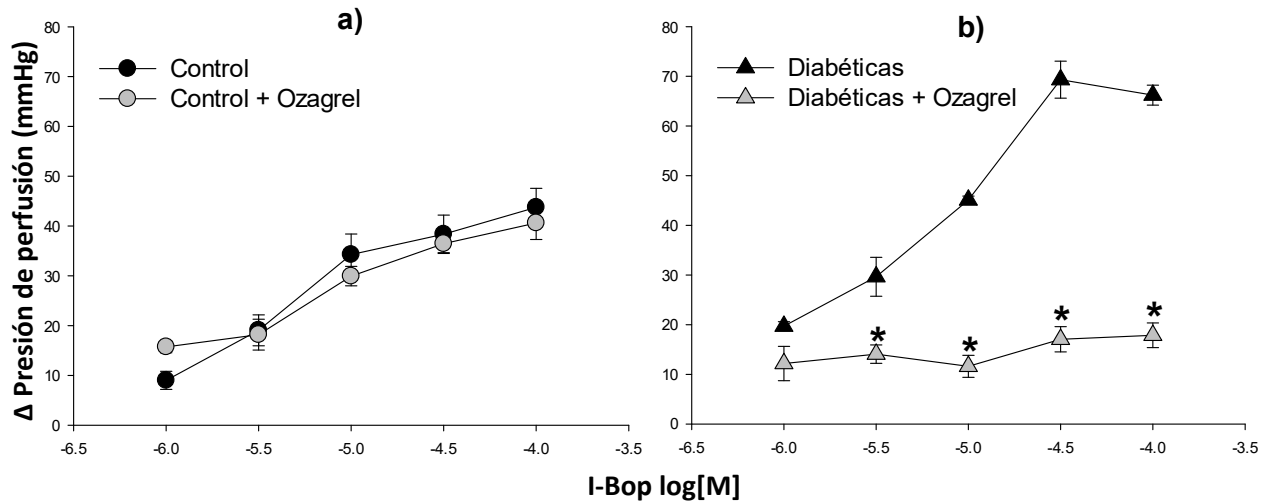


Figura 19. Efecto de Ozagrel en la presión de perfusión inducida por I-Bop en riñones de ratas con 4 semanas de evolución. a) grupo control y b) grupo diabético. Los datos representan el valor promedio \pm E.E. de 4-5 experimentos por grupo, * $p < 0.05$ vs control.

Tabla 4. Efecto de I-Bop en la potencia (EC_{50}) y la eficacia (E_{max}). Los valores representan la media \pm E.E. de 5-6 ratas por grupo. $P < 0.05$ **Diabético vs Diabético + Ozagrel.

	Control	Control + Ozagrel	Diabético	Diabético + Ozagrel
1 semana de edad				
EC_{50}	4.3×10^{-6}	3.8×10^{-6}	3.9×10^{-6}	3.6×10^{-6}
E_{max}	42.9 ± 3	40 ± 3.2	58 ± 3.9	$39.7 \pm 1.3^{**}$
4 semanas de edad				
EC_{50}	4.1×10^{-6}	$.7 \times 10^{-6}$	4.8×10^{-6}	Valor no calculado &
E_{max}	43.8 ± 3.1	40.6 ± 2.5	69.3 ± 2.9	$17.9 \pm 1.4^{**}$

& Valor estadísticamente no calculable.

8. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado un incremento en la concentración de tromboxano (TXA₂) durante la diabetes (Centeno *et al.* 2018; Eroza, 2016; Tang *et al.* 2011), el cual juega un papel importante en la vasoconstricción, en la agregación plaquetaria y en la apoptosis de células endoteliales (Muzaffar *et al.*, 2011), si bien, se ha descrito la modificación en la síntesis de este metabolito durante el daño renal (Okomura *et al.*, 2003), aún no está del todo clara la participación de la tromboxano sintasa (TXAS), por lo que en este estudio se evaluó el efecto de la inhibición de la TXAS sobre la respuesta contráctil de la vasculatura renal, así como su expresión a nivel de proteína en dos etapas de la diabetes (1 y 4 semanas), por otra parte, se determinó la actividad del receptor a tromboxano (receptor TP) en la respuesta vasocontráctil renal mediada por un agonista exógeno, además de su abundancia relativa durante la diabetes, ya que en trabajos anteriores (Zhang *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2007; Angulo *et al.*, 2006), se ha mencionado un aparente aumento en la señalización del receptor TP, que podría contribuir de manera crucial al mal funcionamiento y deterioro renal.

La diabetes inducida farmacológicamente, es un modelo que permite el estudio de los mecanismos moleculares que condicionan la evolución de esta enfermedad, así como sus complicaciones y los órganos que afecta de manera irreversible como los riñones, que son de los órganos con mayor repercusión (King, 2012). Este modelo experimental presenta las características de la diabetes humana, ya que después de los tiempos de evolución de la enfermedad, las ratas que fueron inducidas con estreptozotocina presentaron hiperglucemia persistente (glucosa en sangre > 400 mg/dl) (figura 8), y como

bien se sabe, cuando la glucemia sobrepasa la capacidad de reabsorción de los túbulos renales condiciona la eliminación de glucosa por la orina (glucosuria) (NORD, 2018). La glicosuria exige el aumento de la ingesta de agua y esto determina la poliuria. La pérdida de agua, por su lado provoca la sed exagerada o polidipsia (Fernández & Pérez, 2014; Calagua-Quispe *et al.*, 2012); a su vez, la incapacidad de los tejidos para utilizar la glucosa como material energético obliga a los organismos a recurrir a otras sustancias, consumiendo las reservas de proteínas y lípidos, aumentando así el apetito, lo que deriva en la polifagia. La movilización excesiva de las grasas por falta del metabolismo dependiente de insulina y el catabolismo incrementado de las mismas condujo a los animales a la pérdida de peso (figura 9), respecto a los grupos controles (King, 2012; Murillo *et al.*, 2004). Además, la diabetes altera el índice de masa renal (figura 10), lo cual indica, que desde la primera semana esta patología provoca daños a nivel renal, ya que el aumento en el tamaño de los riñones (renomegalia), es considerado como el primer estadio de la nefropatía diabética (Serna *et al.*, 2009).

En las curvas concentración-respuesta, la presión de perfusión (P.P.) basal tanto en los grupos controles como en los diabéticos de 1 y 4 semanas fue similar (95 ± 5 mmHg en los grupos control y 97 ± 4 mmHg en los grupos diabéticos), lo que nos indica que no hay alteración en la liberación de metabolitos vasomediadores que modifiquen el flujo en estas condiciones, a diferencia de cuando hay un estímulo contráctil, como fue el caso de la administración de bolos del agonista fenilefrina, en donde la respuesta de los riñones de las ratas de una semana con diabetes provocó una menor P.P. con respecto a su grupo control (figura 11a), esto puede deberse a que en las primeras etapas de la diabetes se observa un aumento en la producción de moléculas vasodilatadoras

endoteliales como el óxido nítrico (NO) (Stadler *et al.*, 2003), que contrarrestan el efecto vasopresor de la fenilefrina; además, se ha descrito que la sobreproducción de NO regula positivamente la síntesis de la COX-2, a través de las vías de señalización dependientes de MAP-cinasa (Yang *et al.*, 2006), lo que deriva en un incremento en las concentraciones de su principal subproducto, la prostaciclina (PGI₂), que es un potente mediador de la vasorelajación (Batlouni, 2009), lo que indica que ambos mecanismos probablemente sean una manera de oponerse a la vasoconstricción que se genera durante las primeras etapas del deterioro renal.

En contraste a lo que se observó después de una semana con diabetes; a las 4 semanas, el desarrollo de la diabetes aparentemente modificó la síntesis de moléculas renales tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras, dado que el efecto de la fenilefrina en la vasculatura renal aumentó (figura 11b); se ha descrito anteriormente que con el paso del tiempo la diabetes daña el tejido endotelial vascular, lo cual no solo lleva a una deficiencia en la producción de NO y PGI₂, sino también promueve la síntesis de agentes vasoconstrictores como el TXA₂ y la prostaglandina H₂ (PGH₂) (Zou *et al.*, 2002; Konieczkowski & Skrinska, 2001; Battilana, 1997). Además, la hiperglucemia a largo plazo se asocia con una mayor concentración de radicales libres como el anión superóxido, que es químicamente inerte, pero cuando se combina con el NO a una velocidad de difusión limitada, se convierte en una especie reactiva de oxígeno (EROs) conocida como peroxinitrito, (Yao & Brownlee, 2010; Zou, 2007). La formación de peroxinitrito, además de disminuir la biodisponibilidad de NO (Palm *et al.*, 2005), también puede inactivar la sintasa de prostaciclina disponible por medio de la nitración de sus

residuos de tirosina (Zou *et al.*, 2002), lo que resulta en la incapacidad para contrarrestar el efecto de los agentes vasoconstrictores.

Con las curvas de concentración-respuesta a fenilefrina en presencia del inhibidor de la sintasa de tromboxano (Ozagrel) pudimos demostrar que el TXA₂ es uno de los factores que contribuyen en la alteración de la regulación vascular durante el desarrollo del daño renal, ya que el bloqueo de la TXAS atenuó la vasoconstricción producida por los bolos de fenilefrina en los riñones de las ratas diabéticas de 1 semana (figura 12b). Cabe mencionar que a concentraciones bajas de fenilefrina la respuesta de contracción fue mayor en comparación al grupo sin inhibidor, aunque este efecto no es significativo, esto podría ser causado por la unión de la PGH₂ con el receptor TP para compensar la falta de TXA₂, sin embargo, al haber una vasoconstricción mayor que sobrepasa la respuesta fisiológica, la producción principalmente de PGI₂ se favorece, que junto a la liberación de NO produce una relajación vascular que contrarresta este efecto presor (De la Cruz *et al.*, 2000), y aunque este fenómeno solo se ha reportado en células endoteliales retinianas y células vasculares humanas (De la Cruz *et al.*, 2000; Patrono 1990), cabe la posibilidad de que en células de la vasculatura renal esté sucediendo este mismo fenómeno.

A las 4 semanas, la inhibición de la TXAS atenuó la respuesta contráctil a fenilefrina de manera significativa, no obstante, el efecto causado por el inhibidor es menor respecto al observado a 1 semana; aunque la inhibición de la TXAS promueve la liberación de NO y PGI₂, es posible que la producción de moléculas relajantes descienda como consecuencia del daño endotelial (Zou *et al.*, 2002; Konieczkowski & Skrinska, 2001), o

bien, por el incremento de EROS y el aumento constante de metabolitos constrictores independientes de la TXAS como la angiotensina II y los isoprostanos (Chamorro, 2009; Abuissa *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2003). Sin embargo, tampoco descartamos la posible participación de otros metabolitos, ya que se ha descrito al menos en plaquetas, que la inhibición de la TAXS con análogos imidazol, como es el caso del Ozagrel, aumentan la formación de PGG₂ y por consecuencia, se eleva la concentración de PGH₂, la cual se une y activa los receptores TP; de igual manera se incrementa la síntesis de PGE₂, PGF_{2α} y PGD₂, que por su cuenta favorecen la constricción vascular al unirse con sus respectivos receptores (Patrono, 1990; Quilley *et al.* 1989).

Por otro lado, comprobamos que la diabetes, al igual que otras patologías (Endoh *et al.*, 1997; Tsusumi *et al.*, 1997) provoca la sobreexpresión renal de la enzima TXAS desde etapas tempranas (figura 14); si bien, el gen *TBXAS1* que codifica para esta sintasa en condiciones normales es poco expresado en riñón a diferencia de pulmón, hígado y útero donde es muy abundante, cuando se presenta alguna nefropatía se produce una sobreexpresión de la TXAS (Tsusumi *et al.*, 1997), hecho que podría explicar el aumento en la concentración de TXA₂, lo cual probablemente sea un mecanismo para compensar trastornos sistémicos como la propia polidipsia y el decaimiento de la tasa de filtración glomerular causada por la diabetes (Almaguer *et al.* 2012; Fioretto & Mauer, 2007), no obstante, este incremento no solo participa en la regulación de la hemodinamia renal, sino que a su vez produce daño vascular a nivel endotelial, lo que deriva en la incapacidad para regular el flujo renal, siendo así un mecanismo autopertuante (Muzaffar *et al.*, 2011).

La activación de los receptores TP y su señalización son factores determinantes que contribuyen a la compleja regulación de la contracción vascular (Féléto et al. 2010) y para analizar su participación en la contracción vascular renal durante la diabetes se plantearon protocolos de experimentación con el agonista selectivo I-Bop. Se realizaron curvas concentración-respuesta a I-Bop en riñones aislados y perfundidos, en donde pudimos observar una respuesta de contracción mayor en riñones de las ratas diabéticas de 1 semana (figura 16a); a pesar de que al inicio de la diabetes las concentraciones de NO y PGI₂ incrementan (Stadler et al., 2003), la activación del receptor TP produjo un aumento en la P.P., lo que sugiere que, además de la TXA₂ derivado de la TXAS el receptor TP también modifica su participación en la regulación del tono vascular durante la evolución de la diabetes. Por otro lado, a las 4 semanas, la constricción vascular causada por I-Bop se eleva aún más que en la primera semana de estudio (figura 16b), esto indica que, además de la incapacidad del endotelio para producir sustancias vasodilatadoras en etapas avanzadas de esta enfermedad (Zou et al., 2002; Konieczkowski & Skrinska, 2001), el aumento de la vasoconstricción renal puede ser provocada por un fenómeno de hiperactividad por parte de los receptores TP. El aumento en la actividad del receptor TP, en parte, puede ser provocada por una mayor afinidad por el TXA₂, o bien, por un incremento en la cantidad de receptores en las células del tejido vascular, por lo que, en este caso, se analizó la expresión del receptor a nivel de proteína mediante inmunodetección.

En los estudios de inmunodetección, efectivamente se observó un incremento en la expresión del receptor TP a nivel de proteína desde la primera semana con diabetes (figura 17). Es probable que la sobreexpresión del receptor TP en células de músculo

liso vascular (CMLV) facilite su unión con el TXA₂ (Chamorro, 2009), proceso que explicaría parte del aumento en la respuesta de contracción. Por otra parte, hay reportes que indican la presencia del receptor TP a nivel endotelial y que durante alguna patología vascular se favorece su expresión (Pfister, 2008; Ashton & Ware, 2004). La presencia del receptor TP en el endotelio, puede incrementar las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Matadamas-Zárate *et al.*, 2009; Blumenthal & Garrison, 2012); este proceso podría favorecer dos vías distintas: a) la formación del complejo calcio-calmodulina (Ca²⁺+CaM) (Borbiev *et al.*, 2001) o b) la activación de la PLA₂ (Leslie, 2004). La formación del complejo Ca²⁺+CaM a nivel endotelial activa la sintasa de NO endotelial (eNOS) para producir NO (Trovati & Anfossi, 1998); el cual puede difundirse a las CMLV (Herrera *et al.*, 2019) o interactuar con aniones de oxígeno (O₂⁻) y formar peroxinitrito (Yao & Brownlee, 2010; Zou, 2007), hecho que regula positivamente la COX 2 y provoca la síntesis de PGI₂ (Landino *et al.*, 1996), culminando en un proceso de vasodilatación (figura 20). Por otro lado, la activación de la PLA₂ promueve la liberación de ácido araquidónico (AA) de la membrana celular (Guzmán-Hernández *et al.*, 2015), hecho que, en condiciones fisiopatológicas puede favorecer la producción TXA₂ endotelial promoviendo la constricción vascular (figura 20); si bien, el receptor TP ubicado en las células del endotelio podrían estimular la síntesis de moléculas con funciones vasodilatadoras, con el desarrollo de la diabetes y el daño endotelial, la liberación de NO y PGI₂ no es completamente efectiva, por lo que la liberación de TXA₂, podría ser el papel más importante de los receptores TP endoteliales (Tang *et al.*, 2009; Camilleti *et al.*, 2000). Para poder analizar lo anterior, se realizaron curvas-concentración respuesta a I-Bop en presencia en presencia del inhibidor de la TXAS.

La administración de Ozagrel provocó la disminución de la respuesta de contracción en los riñones de las ratas con 1 semana de diabetes estimulados con I-Bop, sugiriendo que, durante esta patología, la síntesis de TXA₂ se favorece por la propia activación de los receptores TP (figura 21). Por otro lado, la respuesta del receptor TP se abatió casi por completo en los riñones de las ratas diabéticas de 4 semanas; como ya se ha demostrado anteriormente (De la Cruz *et al.*, 2000; Patrono 1990), la inhibición de la TXAS mejora la vasodilatación al promover la síntesis de PGI₂ y ON, sin embargo, es posible que con el daño endotelial este mecanismo no sea suficiente para contrarrestar el efecto de I-Bop, por lo que es probable que durante la diabetes se produzca un fenómeno de amplificación de la contracción causado por la sobreexpresión de la TXAS en las CMLV, el cual se previene con la inhibición de la TXAS (figura 21) (Muzaffar *et al.*, 2004); esta amplificación de la contracción puede comenzar con la activación del receptor TP de las CMLV causando el incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, activando así la PLA₂ (Guzmán-Hernández *et al.*, 2015); el aumento en la liberación de AA junto a la sobreexpresión de la TXAS favorece la producción de TXA₂ en las CMLV (figura 21) (Muzaffar *et al.*, 2004), que a su vez, se unirá a otro receptor TP comenzando el ciclo de nuevo, por lo que este fenómeno de amplificación podría ser uno de los mecanismo más importantes en el proceso de daño renal causado por la diabetes.

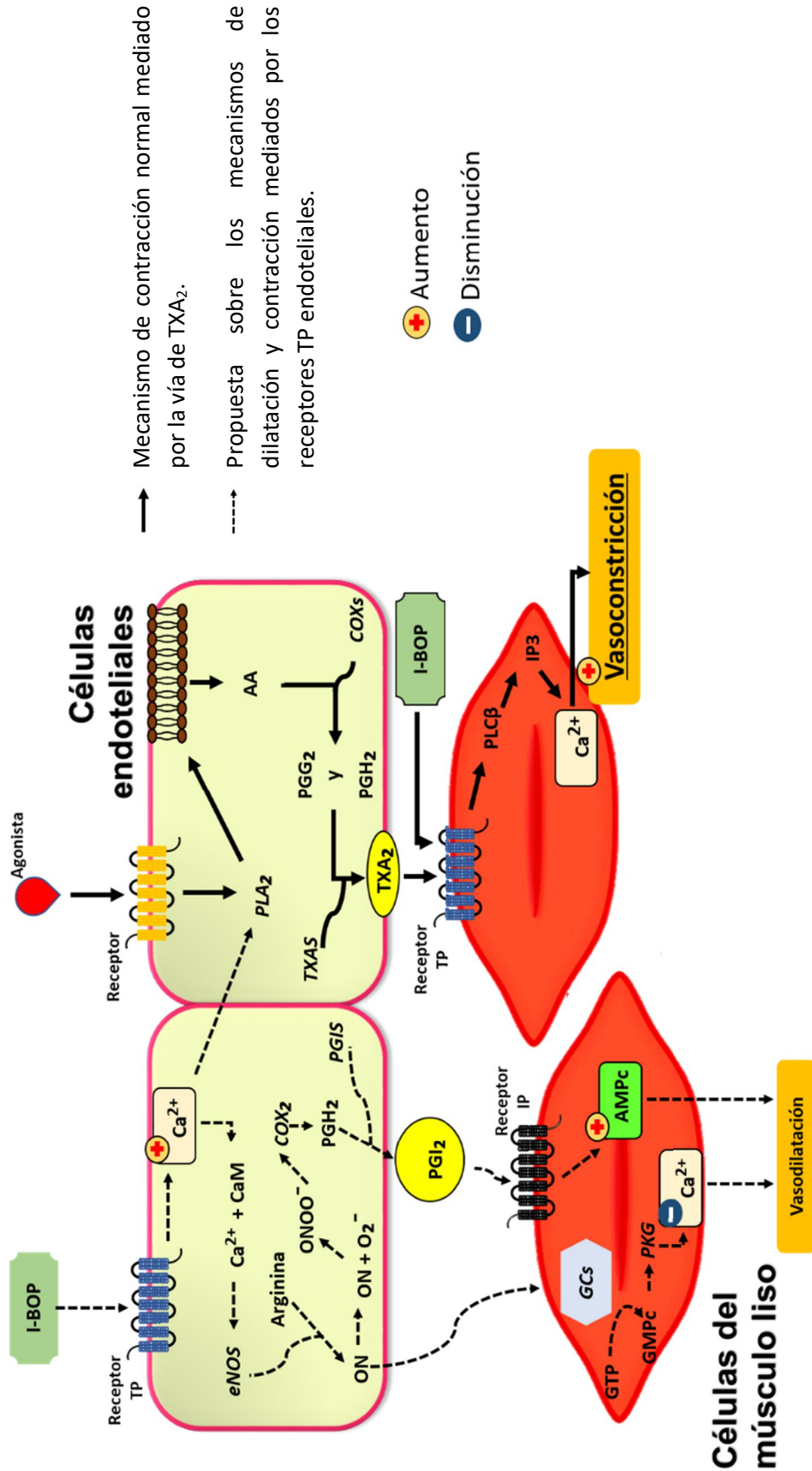
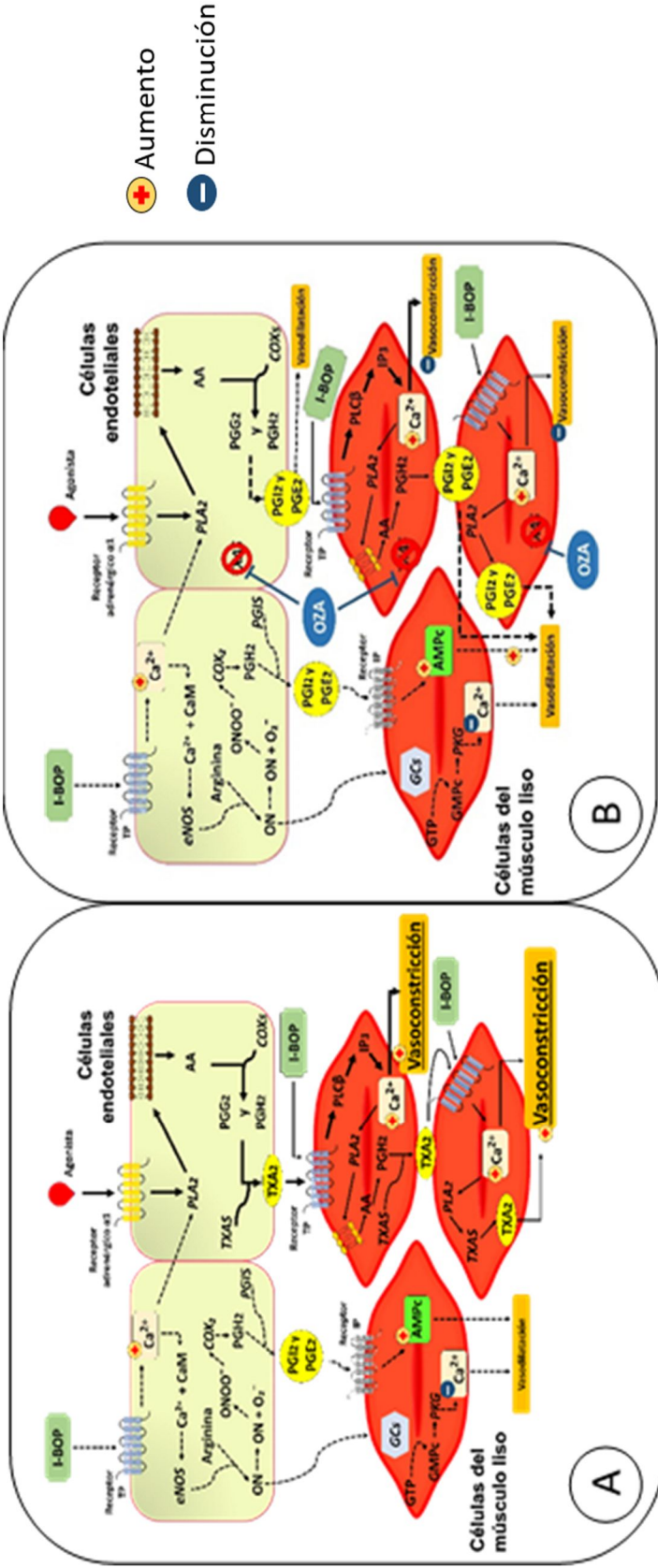


Figura 20. Propuesta sobre los mecanismos de dilatación e incremento de TXA₂ mediado por los receptores TP endoteliales. PLA₂= fosfolipasa A₂, AA= ácido araquidónico, COXs= ciclooxigenasas, PGG₂= prostaglandina G₂, PGH₂, prostaglandina H₂, TXAS= tromboxano sintasa, TXA₂= tromboxano A₂, PLCβ= fosfolipasa Cβ, IP₃= Inositol trifosfato, Ca²⁺= calcio intracelular, CaM= calmodulina, eNOS= guanosin trifosfato, GMPC= guanosin monofosfato cíclico, PKG= Proteína cinasa nítrico, ONOO⁻= peroxinitrito, GTP= guanilato ciclasa soluble, GTP= guanosin trifosfato, GMPC= guanosin monofosfato cíclico, PKG= Proteína cinasa G, COX₂= ciclooxigenasa 2, PGIS= prostaciclina sintasa, PGI₂= prostaciclina.



- Mecanismo de contracción normal mediado por la vía de TXA₂.
- Propuesta sobre los mecanismos de dilatación y contracción mediados por los receptores TP endoteliales.
- Propuesta sobre el fenómeno de amplificación de la contracción mediado por la vía del TXA₂.
- Inhibición de la TXAS con Ozagrel.

Figura 21. (A y B) Propuesta sobre los mecanismos de dilatación y amplificación de la contracción vascular renal mediada por la vía del TXA₂ durante la diabetes. **(B)** Propuesta sobre el efecto de la inhibición de la TXAS con Ozagrel en la vasculatura renal durante la diabetes. PLA₂= fosfolipasa A₂, AA= ácido araquidónico, COXs= ciclooxigenasas, PGG₂= prostaglandina G₂, PGH₂, prostaglandina H₂, TXAS= tromboxano sintasa, TXA₂= tromboxano A₂, PLCβ= fosfolipasa Cβ, IP₃= Inositol trifosfato, Ca²⁺= calcio intracelular, CaM= calmodulina, eNOS= sintasa de óxido nítrico endotelial, ON= óxido nítrico, ONOO⁻= peroxinitrito, GCs= guanilato ciclasa soluble, GTP= guanosín trifosfato, GMPC= guanosín monofosfato cíclico, PKG= Proteína quinasa G, COX₂= ciclooxigenasa 2, PGIS= prostaciclina sintasa, PGI₂= prostaciclina, PGE₂= prostaglandina E₂, OZA= ozagrel.

9. CONCLUSIONES

Con esta investigación concluimos que, el aumento de la concentración de TXA₂ renal observado en la diabetes, puede ser provocado tanto por la sobreexpresión TXAS como por la estimulación de los receptores TP en las células del endotelio vascular. Por otra parte, la respuesta vascular dependiente de los receptores TP aumenta durante esta enfermedad, aparentemente como resultado de una mayor cantidad de receptores TP en las CMLV. Además, nuestros datos sugieren fuertemente un mecanismo que promueve la síntesis de TXA₂ en las CMLV, fenómeno que puede estar contribuyendo en el daño renal causado por la diabetes.

10. PROPUESTAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos tres mecanismos dependientes de la vía del TXA₂ que podrían estar participando en el desarrollo del daño renal causado por la diabetes:

1. La síntesis de moléculas vasodilatadoras como el NO y la PGI₂ mediada por los receptores TP expresados en el endotelio, a través de la activación del complejo Ca²⁺ + CaM.
2. La liberación de TXA₂ por parte de los receptores TP endoteliales.
3. Un mecanismo de amplificación de la contracción vascular como resultado de la sobreexpresión de la TXAS en las CMLV.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo sugiere examinar con mayor detalle la liberación de los prostanoídes derivados de las ciclooxigenasas (COX) en respuesta a la estimulación de I-Bop en el modelo de riñón aislado, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de la sintasa de tromboxano (TXAS), y determinar su participación en el tejido renal durante la diabetes.

Es importante estudiar de forma más acertada la localización celular tanto de la TXAS como del receptor TP en la vasculatura renal, y determinar las alteraciones hemodinámicas que provocan durante la diabetes.

Es posible que el receptor TP pueda favorecer la liberación de sustancias vasorreguladoras como el NO, la PGI₂, y el TXA₂ al expresarse en células del endotelio vascular, por lo que es importante estudiar de manera más profunda el papel de los receptores TP endoteliales a lo largo de la diabetes.

Por último, sugerimos continuar analizando la participación de la TXAS en las CMLV, puesto que aparentemente son parte esencial de un fenómeno de amplificación de la contracción vascular, hecho que podría ser uno de los mecanismos más importantes del daño renal ocasionado por la diabetes.

12. REFERENCIAS

1. Abuissa, H., Jones, P., Marso, S. & O'Keefe, J. 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. Journal of the American College of Cardiology. 46(5), 821-826.
2. Almaguer, A., Soca, P., Será, C., Mariño, A. & Oliveros, R. 2012. Actualización sobre diabetes mellitus. Correo Científico Médico, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. 16(2).
3. American Diabetes Association (ADA). 2015. Hyperglycemia. Consultado el día 14 de mayo de 2017 en: <http://bit.ly/1vJd4Jo>
4. American Diabetes Association (ADA). 2016. Standards of medical care in diabetes. Consultado el día 14 de mayo de 2017 en: <http://bit.ly/1myCwSs>
5. American Diabetes Association (ADA). 2017. Basic information of diabetes. Consultado el día 23 de mayo de 2018 en: <https://bit.ly/1QVTi4E>
6. Angulo, J., Cuevas, P., Fernández, A., Allona, A., Moncada, I., Martín-Morales, A., La Fuente, J. & Sáenz, I. 2006. Enhanced thromboxane receptor-mediated responses and impaired endothelium-dependent relaxation in human corpus cavernosum from diabetic imponent men: role of protein kinase C activity. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 319(2), 783-789.
7. Batlouni, M. 2009. Anti-inflamatórios não esteróides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 94(4), 538-546.
8. Battilana, C. 1997. El riñón en la hipertensión arterial esencial. Revista Peruana de Cardiología. 23(3), 26-1.
9. Bautista, N. 2015. Papel diferencial de las isoformas de ciclooxigenasa y sintasa de óxido nítrico en la vasoconstricción a la fenilefrina en el lecho vascular renal y mesentérico de ratas macho y hembra. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.
10. Bento, C. & Pereira, P. 2011. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. Diabetologia. 54(8), 1946-1956.
11. Blumenthal, D. & Garrison, J. 2012. Farmacodinámica: mecanismos moleculares de acción de los fármacos. En: Goodman, L & Gilman, A. 2012. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12^{va} edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. 52-60.
12. Brenner, B. & Rector, F. 2016. The Kidney. 10Th edition. Ed. Elsevier. Estados Unidos. 356.

13. Calagua-Quispe, M., Falen-Boggio, J., Del Águila-Villar, C., Lu-de Lama, R. & Rojas-Gabulli, M. 2012. Características clínicas y bioquímicas de la diabetes mellitus tipo 2 (DMt2) en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Anuales de la Facultad de Medicina. 73(2), 141-146.
14. Camilletti, A., Moretti, N., Giacchetti, G., Fabiola, E., Martarelli, D., Mantero, F. & Mazzanti, L. 2001. Decreased nitric oxide levels and increased calcium content in platelets of hypertensive patients. American Journal of Hypertension. 14(4), 382-386.
15. Campbell & Halushka. 1996. Autacoides derivados de lípidos: Eicosanoides y factor activador de plaquetas. En: Goodman, L & Gilman, A. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^{na} edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. 643-660.
16. Cases, A. 2002. Enfermedad macro y microvascular en la diabetes mellitus tipo 2. Nefrología. 22(5), 406-411.
17. Cediél, E., Vázquez-Cruz, B., Navarro-Cid, J., De Las Heras, N., Sanz-Rosa, D., Cachofeiro, V. & Lahera, V. Role of endothelin-1 and thromboxane A₂ in renal vasoconstriction induced by angiotensin II in diabetes and hypertension. Kidney International: Hypertension and Renal Disease. 62(82), S2-S7.
18. Centeno, J., Miranda-Gómez, L., López-Morales, M., Jover-Mengual, T., Burguete, M., Marrachelli, V., Castelló-Ruiz, M., Aliena-Valero, A., Alborch, E. & Miranda, F. 2018. Diabetes modifies the role of prostanoids and potassium channels which regulate the hypereactivity of the rabbit renal artery to BNP. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 391(5), 501-511.
19. Cervantes, I. 2014. Evaluación de la expresión de COX-1, COX-2 y su relación con la activación del sistema renina-angiotensina en diferentes etapas de la evolución de la diabetes mellitus tipo 1. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
20. Chamorro, A. 2009. TP Receptor Antagonism: A New Concept in Atherothrombosis and Stroke Prevention. Cerebrovascular Diseases. 27(3), 20-27.
21. Davì, G., Santilli, F. & Vazzana, N. 2012. Thromboxane receptors antagonist and/or synthase inhibitors. In: Gresele, P., Born, G., Patrono, C. & Page, C. 2012. Antiplatelet agents. Handbook of Experimental Pharmacology. 2012(2109). 261-286.
22. Endoh, M., Kashem, A., Yamauchi, F., Yano, N., Nomoto, Y., Sakai, H. & Kurokawa, K. 1997. Expression of thromboxane synthase in kidney tissues from patients with IgA nephropathy. Clinical Nephrology. 47(3), 168-1.

23. Eroza, V. 2016. Participación de la ciclooxigenasa-1 en el daño vascular renal en un modelo experimental de diabetes en ratas. Tesis de maestría. Secretaría de la Defensa Nacional. Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.
24. Eschwege, E., Richard, J., Thibult, N., Ducimetière, P., Warnet, J., Claude, J. & Rosselin, G. 1985. Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels. The Paris Prospective Study, ten years later. Hormone and Metabolic Research. 15, 41-46.
25. Federación Mexicana de Diabetes. 2017. Diabetes en México. Consultado el día 16 de mayo de 2017 en: <http://bit.ly/2cjl6sm>
26. Félétou, M., Vanhoutte, P. & Verbeuren, T. 2010. The Thromboxane/Endoperoxide receptor (TP): The common villain. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 55(4), 317-332.
27. Feriz, K. 2015. Complicaciones macrovasculares de la DM. Servicio de Endocrinología Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia. 31-35.
28. Fernández, J. & Pérez, B. 2014. Poliuria y polidipsia. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. Asociación Española de Pediatría. 1, 81-89.
29. Figueroa, C., Pérez, I. & Mejía, R. 2013. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. Revistas de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 18, 3699-3707.
30. Fioretto, P. & Mauer, M. 2007. Histopathology of diabetic nephropathy. Seminars in Nephrology. 27(2), 195-207.
31. Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H., & Coffman, T. 2004. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. Hypertension. 43(2), 364-369.
32. Fundación para el Estudio, la Prevención y el Tratamiento de la enfermedad Vascular Ateroesclerótica (FEPREVA). 2012. Curso de capacitación de posgrado a distancia síndrome metabólico y riesgo vascular conjunto ABCBA. Facultad de Medicina. Buenos Aires, Argentina.
33. García, J. & Gómez-Reino, J. 2000. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. Revista Española de Reumatología, 27(1), 33-35.
34. Girach, A., Manner, D. & Porta, M. 2006. Diabetic microvascular complications: can patients at risk be identified? A review. International Journal Clinical Practice. 60(11), 1471-1483.
35. Giral, C. 2013. El Vínculo entre la diabetes y el accidente Cerebrovascular (ACV). DiabeTV. Boletín Informativo. Consultado el día 17 de mayo de 2017 en: <http://bit.ly/2n8Uxbl>

36. Guyton, A. & Hall, J. 2006. "Insulina, glucagón y diabetes mellitus". En: Guyton, A. & Hall, J. 2006. Tratado de Fisiología Médica. 11a Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 939-954.
37. Guzmán-Hernández, E., Segura-Cobos, D. & Ibarra-Barajas, M. 2015. Regulación de la liberación de renina durante la hipertensión renovascular. Revista de Biomédicas. 26, 33-40.
38. International Diabetes Federation (IDF). 2015. Diabetes Atlas, 7th edition.
39. Janigian, R. 2013. ¿Qué es la retinopatía diabética? American Academy of Ophthalmology. Consultado el día 17 de mayo de 2017 en: <http://bit.ly/2yqXRcV>
40. Kawabe, J., Ushikubi, F. & Hasebe, N. 2010. Prostacyclin in vascular diseases: recent insights and future perspectives. Circulation Journal. 74(5), 836-843.
41. King, A. 2012. The use of animal models in diabetes research. British Journal of Pharmacology. 166(3), 877-894.
42. Kontogiorgis, C. & Hadjipavlou-Litina, D. 2010. Thromboxane synthase inhibitors and thromboxane A2 receptor antagonists: a quantitative structure activity relationships (QSARs) analysis. Current Medicinal Chemistry. 17(28), 3162-3214.
43. Ledbetter, S., Jill, E., Noonan, D., Vogeli, G. & Hassel, J. 1990. Altered steady-state mRNA levels of basement membrane proteins in diabetic mouse kidneys and thromboxane synthase inhibition. American Diabetes Association. 39(2), 196-203.
44. Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 51(2), 216-226.
45. Mandal, A. 2017. Blood Sugar Normal Values: Blood sugar fluctuations. News Medical Life Sciences. Estados Unidos.
46. Mangaello, J., Djellas, Y., Borg, C., Antonakis, K. & Le Breton, G. 1999. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A₂ receptor- associated G α_{13} . Journal of Biological Chemistry. 274(39), 28000-28010.
47. Manrique, C., Silva, D. & Curtin, J. 2017. ¿Por qué se destruyen las células beta del páncreas? Asociación Mundial de Diabéticos. España. Consultado el día 5 de junio de 2017 en: <http://bit.ly/2n8KC5S>
48. Matadamas-Zárate, C., Hernández-Jerónimo J., Pérez-Campos, E. & Majluf-Cruz, A. 2009. Alteraciones plaquetarias en la diabetes mellitus tipo 2. Archivos de Cardiología de México. 79(2), 102-108.

49. MedlinePlus. 2017. Blood Sugar. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. National Library of Medicine, Estados Unidos. *Consultado el día 15 de junio de 2017 en:* <http://bit.ly/2NtSRHb>
50. MedlinePlus. 2017. Diabetes complications. National Library of Medicine, Estados Unidos. *Consultado el día 21 de mayo de 2017 en:* <http://bit.ly/321dFuO>
51. Meresman, G. & Olivares, C. 2012. Implicancia de las prostaglandinas en la fisiopatología de la endometriosis. SAEGRE. 19(3), 40-56.
52. Michel, F., Simonet, S., Vayssettes-Courchay, C., Bertin, F., Sansilvestri-Morel, P., Bernhardt, F., Paysant, J., Silvestre, J-S., Levy, B, Féléto, M., Verbeuren, T. 2008. Altered TP receptor function in isolated, perfused kidneys of nondiabetic and diabetic ApoE-deficient mice. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 294. F120-F129.
53. Ministerio de Salud. Sin Fecha. Diabetes. Dirección Nacional de promoción de la Salud y Control de enfermedades no transmisibles. Buenos Aires, Argentina. *Consultado el día 15 de mayo de 2017 en:* <http://bit.ly/2kiSyei>
54. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad & Ministerio de Economía y Competitividad. 2012. Guía de práctica clínica sobre diabetes mellitus tipo 1. Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia, Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco c/ Donostia-San Sebastián, 1 - 01010 Vitoria-Gasteiz.
55. Mogensen, C., Christensen, C. & Vittinghus, E. 1983. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. Diabetes. 32(2), 64-78
56. Mora-Morales, E. 2014. Estado actual de la diabetes mellitus en el mundo. Acta Médica Costarricense. 56(2), 44-46.
57. Muñoz, F. 1999. Alergia respiratoria en la infancia y adolescencia. Segunda edición. Ed. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona, España. 29-35.
58. Murillo, M., Fernández, L. & Tuneu, L. 2004. Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre diabetes. Ed. Madrid: Espai Gráfico Anagrafic. Universidad de Granada, España. 52-62.
59. Muzaffar, S., Shukla, N., Massey, Y., Angelini, G. & Jeremy, J. 2011. NADPH oxidase1 mediates upregulation of thromboxane A2 synthase in human vascular smooth muscle cells: Inhibition with iloprost. Cardiovascular Pharmacology. 658(2-3), 187-192.
60. Nápoles, D. & Nápoles, D. 2012. Hemostasia normal y coagulación intravascular diseminada en obstetricia. Medisan. 16(3), 401-428.

61. National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). 2016. What is atherosclerosis? Department of Health & Human Services. National Institutes of Health. *Consultado el día 16 de mayo de 2017 en:* <http://bit.ly/2dOzbOG>
62. National Organization for Rare Disorders (NORD). 2018. Glycosuria. *Consultado el día 7 de junio de 2018 en:* <https://bit.ly/2O2EU2N>
63. Negishi, M., Sugimoto, Y. & Ichikawa, A. 1993. Prostanoid receptor and their biological actions. Progress in Lipid Research. 32(4), 417-434.
64. Hecker, M. & Ullrich, V. 1989. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. European Journal of Biochemistry. 264(1), 141-150.
65. Nüsing, R. & Ullrich, V. 1992. Regulation of cyclooxygenase and thromboxane synthase in human monocytes. European Journal of Biochemistry. 206(1), 131-136.
66. Wang, L. & Kulmacz, R. 2002. Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 68-69, 409-422.
67. Okomura, M., Imanishi, M., Okomura, M., Hosoi, M., Okada, N., Konishi, Y., Morikawa, T., Miura, K., Nakatani, T. & Fujii, S. 2003. Role for thromboxane A₂ from glomerular thrombi in nephropathy with type 2 diabetic rats, Life Sciences. 72(24), 2695– 2705.
68. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. Diabetes. Centro de prensa. Nota descriptiva. *Consultado el día 13 de mayo de 2017 en:* <http://bit.ly/1pNe2SA>
69. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. Informe Mundial Sobre la Diabetes. Resumen de orientación.
70. Palm, F., Donald, G., Per-Ola, C., Hansell, P. & Liss, P. 2005. Reduced nitric oxide concentration in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats: Effects on renal oxygenation and microcirculation. American Diabetes Association. 54, 3282-3287.
71. Patrono, C. 1990. Thromboxane synthesis inhibitors and receptor antagonists. Thrombosis Research Supplement. 11, 15-23.
72. Quilley, J., Mcgiff, J. & Nasjletti, A. 1989. Role of endoperoxides in arachidonic acid-induced vasoconstriction in the isolated perfused kidney of the rat. British Journal of Pharmacology. 96, 111-116.
73. Raes, A., Donckerwolcke R., Craen, M., Hussein, M. & Vande-Walle, J. 2007. Renal hemodynamic changes and renal functional reserve in children with type I diabetes mellitus. Pediatric Nephrology. 22(11), 1903-1909.
74. Remuzzi, G., Fitzgerald, G. & Patrono, C. 1992. Thromboxane synthesis and action within the kidney. Kidney International. 41, 1483-1493.

75. Rodríguez, J. 1986. Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos: biosíntesis, metabolismo y mecanismos de acción. Química Clínica. 5(2), 139-144.
76. Rojas, M., Jiménez, A., Franco, A. & Aguilar, C. 2015. “*Epidemiología de la diabetes mellitus en México*”. En: Aguilar, C., Hernández, S., Hernández, M. & Hernández, J. 2015. Acciones para enfrentar la diabetes. Documento de postura Academia Nacional de Medicina de México, México. 1-25.
77. Sabán, J. & Sánchez, O. 2014. Abordaje global de la hiperglucemia intrahospitalaria como problema sanitario de gran impacto sobre la morbimortalidad y los costes. En: Sabán, J. 2014. Fisiopatología y manejo de la hiperglucemia intrahospitalaria. Ed. Diaz de Santos. Madrid-Buenos Aires-México, DF-Bogotá. 1-14.
78. Sánchez, D. 2010. Complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus tipo 2. Capítulo VI. En: Sánchez, A. 2010. Protocolos Diabetes Mellitus Tipo 2. Sociedad Española de Medicina Interna. 101-104.
79. Sánchez, S. & Genta, S. 2007. C13-Yacon: Un potencial producto natural para el tratamiento de la diabetes. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6(5), 162-164.
80. Sathler, P., Santana, M., Lourenço, A., Rodrigues, C., Abreu, P., Mendes, L. & Castro, H. 2013. Human thromboxane synthase: comparative modeling and docking evaluation with the competitive inhibitors Dazoxiben and Ozagrel. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 29(4), 527-531.
81. Secretaria de Salud. 2010. Norma Oficial Mexicana Nom-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
82. Secretaria de Salud. 2016. Diabetes: Información sobre tipos y medidas de prevención de la diabetes. Infografía. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.
83. Serna, L., Pineda, N., García, A., Aguirre, M., Alfaro, J., Balthazar, V. & Vanegas, J. 2009. Diabetic nephropathy. Revista de Medicina UPB. 28(1), 42-53.
84. Serviddio, D. 2008. Le complicate acute del diabete mellito. Medicina d’Urgenza, Università Degli Studi Di Foggia. Italia.
85. Singh, R., Singh, A., Alavi, N. & Leehey, D. 2003. Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. Journal of the American Society of Nephrology. 14, 873–880.
86. Smyth, E. 2010. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. Journal of Clinical Lipidology. 5(2), 209-219.

87. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. 2004. Complicaciones macrovasculares en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2(1), S23-s30.
88. Stadler, K., Jenei, V., von Bölcsházy, G., Somogyi, A. & Jakus, J. 2003. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 35(10), 1240-1251.
89. Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*. 50(6), 536-546.
90. Tang, E., Leung, F., Huang, Y., Félétou, M., So, K.-F., Man, R. & Vanhoutte, P. 2007. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *British Journal of Pharmacology*. 151(1), 15-23.
91. Thomas, D. & Coffman, T. 1998. A genetic approach for studying the role of thromboxane A₂ in the kidney. *Kidney International*. 54(67), S84-S87.
92. Torres, A. & Zacarías, R. 2002. Nefrología Diabética. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González*. 5(1-2), 24-32.
93. Triana, M. 2001. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Revista Cubana Angiología y Cirugía Vascul*. 2(2), 131-141
94. Tsutsumi, E., Takeuchi, K., Abe, T., Takahashi, N., Kato, T., Taniyama, Y., Ikeda, Y., Ito, S. & Abe, K. 1997. Rat kidney thromboxane synthase: cDNA cloning and gene expression regulation in hydronephrotic kidney. *Prostaglandins*. 53(6), 423-431.
95. Tsutsumi, E., Takeuchi, K., Abe, T., Takahashi, N., Kato, T., Taniyama, Y., Ikeda, Y., Ito, S. & Abe, K. 1997. Rat kidney thromboxane synthase: cDNA cloning and gene expression regulation in hydronephrotic kidney. *Prostaglandins*. 53(6), 423-431.
96. Uriu, K., Kaizu, K., Hashimoto, O., Komine, N. & Etoh, S. 1994. Acute and chronic effects of thromboxane A₂ inhibition on the renal hemodynamics in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney International*. 45(3), 794-802.
97. Walsh, M. & Kinsella, B. 2000. Regulation of the human prostanoid TP α and TP β receptor isoforms mediated through activation of the EP1 and IP receptors. *British Pharmacological Society*. 131(3), 601-609.
98. Wang, C., Luo, Z., Kohan, D., Wellstein, A., Jose, P., Welch, W., Wilcox, C. & Wang, D. 2015. Thromboxane prostanoid receptors enhance contractions, endothelin-1, and oxidative stress in microvessels from mice with chronic kidney disease. *Hypertension*. Vol. 65, N. 5. 1055-1063.

99. Wang, D., Chabrashvili, T. & Wilcox, C. 2004. Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: Roles of oxidative stress, thromboxane prostanoid receptors, and endothelium. Circulation Research. 94(11), 1436-1442.
100. Wei, M., Ong, L., Smith, M., Ross, F., Schmid, K., Hoey, A., Burstow, D. & Brown, L. 2003. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart, Lung and Circulation. 12(1), 44-50.
101. Wilson, D., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C. & Walsh, M. 2005 Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. Biochemical Journal. 389(3), 763-774.
102. Yang, T., Zhang, A., Pasumarthy, A., Zhang, L., Warnock, Z. & Schnermann, J. 2006. Nitric oxide stimulates COX-2 expression in cultured collecting duct cells through MAP kinases and superoxide but not cGMP. American Journal of Physiology Renal Physiology. 291(4), F891–F895.
103. Yao, D. & Brownlee, M. 2010. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. Diabetes. 59(1), 249-255.
104. Zamora-Valdés, D., Chávez-Tapia, N. & Méndez-Sánchez, N. 2004. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. Médica Sur. 11(3), 149-159.
105. Zerbini, G., Bonfanti, R., Meschi, F., Bognetti, E., Paesano, P., Gianolli, L., Querques, M., Maestroni, A., Calori, G., Del Maschio, A., Fazio, F., Luzi, L. & Chiumello, G. 2006. Persistent renal hypertrophy and faster decline of glomerular filtration rate precede the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. Diabetes. 55(9), 2620-2625.
106. Zhang, Y., Mi, M., Xie, YH., Wang, SW., Edvinsson, L. & Xu, CB. 2017. Downregulation of thromboxane A₂ receptor occurs mainly via nuclear factor-kappa B signaling pathway in rat renal artery. Advances in Pharmacological Sciences. 2017. 1-8.
107. Zou, M. 2007. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 82(1-4), 119-127.
108. Zou, M., Shi, C. & Cohen, R. 2002. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with that thromboxane/prostaglandin h₂ receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. Diabetes. 51(1), 198-203.