

# La Diabetes Experimental reduce la Producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos

EN GLOMÉRULOS AISLADOS DE RATA EN PRESENCIA DE AMPc Y DESONINA

Ma. Eugenia Mena Ramírez<sup>1</sup>, Ángel Sáenz Sánchez<sup>2</sup>, M. en C. Othier Gidalti Galicia Cruz<sup>3</sup>, Q.F.B. Alicia Quintana González<sup>3</sup>, Dr. Flavio Martínez<sup>4</sup>

## Palabras clave:

Diabetes mellitus, nefropatía diabética, glomerulopatía diabética, radicales libres, prostaglandinas, isoprostanos, adenosina y AMPc.

Running title: Adenosine and cAMP impaired isoprostanos synthesis in glomeruli from the diabetic rat.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es demostrar que la producción de especies reactivas de oxígeno representadas por los F<sub>8</sub>-isoprostanos, marcadores de estrés oxidativo, en los glomérulos de ratas normales y de ratas diabéticas, disminuyen al incrementar las concentraciones extracelulares de adenosina (ADO) y el adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Lo cual nos indica un mecanismo protector para los glomérulos por estas dos sustancias.

Con este propósito se aislaron los glomérulos de ratas normales y diabéticas, mediante la técnica de microtamizado a través de mallas de acero (Gloy J. 1997 ; Osamo I. ( Roman R.J. 1999) modificado en nuestro laboratorio. Paralelamente,

se determinó la viabilidad de los glomérulos, y se cuantificó la concentración de proteínas. Posteriormente, los glomérulos se expusieron a un reto oxidativo y se determinó la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos como marcador indirecto de daño por radicales libres, y se determinó el efecto protector de adenosina y AMPc extracelulares.

Los resultados demostraron que el incremento de la concentración extracelular de AMPc y adenosina disminuyó la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos en la suspensión de glomérulos expuestos a un reto oxidativo, más evidente en los glomérulos de las ratas control con respecto a los de las ratas diabéticas.

En conclusión el incremento en la concentración extracelular de AMPc y adenosina parece proteger a los glomérulos de ratas normales y de ratas diabéticas contra el estrés oxidativo, siempre y cuando las vías metabólicas intracelulares y extracelulares de ambos metabolitos, involucradas en este proceso se encuentren intactas.

## INTRODUCCIÓN

El AMPc es una molécula que actúa como segundo mensajero y es sintetizado a partir del metabolismo del ATP. En la misma vía metabólica mediante una fosfodiesterasa es transformado al nucleósido llamado adenosina, que actúa como autacoide con efectos hemodinámicos en el riñón. Las respuestas a la adenosina en este órgano

- 1 María Eugenia Mena Ramírez, Carrera de Medicina. Centro de Ciencias Biomédicas U.A.A. Tel. 9 12 78 48 e-mail. marufilaescafoidea@hotmail.com
- 2 Angel Sáenz Sánchez. Facultad de Medicina de la U.A.CH. Tel. 01-614-4-82-23-29. e-mail. drangelovski@hotmail.com
- 3 Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Medicina. Departamento de Farmacología.
- 4 Flavio Martínez MD, PhD. Departamento de Farmacología Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P. Avenida Venustiano Carranza 2405, 78210 - Los Filtrros, S.L.P. San Luis Potosí - México ( 01-444-8262345 Ext.526) ( 01-444-8176976) E.mail: martinej@uaslp.mx



dependen de la concentración del autacoide en el líquido extracelular. Una de las patologías más frecuentes en el riñón es la glomeruloesclerosis que se presenta después de un período de inflamación debida a infección o reacciones autoinmunes que afectan las células que conforman el glomérulo. Por ejemplo, se ha demostrado que la adenosina actúa sobre receptores específicos en los neutrófilos y las células endoteliales dañadas, reduciendo el proceso inflamatorio (Okusa M.D. et al., 1999). La adenosina se une a los receptores tipo  $A_{2A}$  expresados en la superficie de estas células e inhibe la producción de las especies reactivas de oxígeno, principalmente ion superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); además disminuye la adherencia de los neutrófilos con el endotelio; y previene el daño inducido durante los procesos inflamatorios (Ha, H. & Hwan KK, 1995; Okusa. M.D. et al., 1999).

La disminución de la inflamación mediada por los receptores  $A_{2A}$  de adenosina expresados en la membrana de los neutrófilos, involucra la principal vía de señalización intracelular de estos receptores, a través del incremento intracelular de AMPc y la consecuente activación de la proteína cinasa A (PKA). Además, la presencia de agonistas para receptores de adenosina  $A_{2A}$  incrementan el AMPc intracelular de manera dependiente de la dosis, y este efecto se sinergiza por la presencia de un inhibidor de la ecto-fosfodiesterasa (Okusa M.D., 2002). Otros estudios han demostrado que los inhibidores de la PKA bloquean el efecto antiinflamatorio de los agonistas de los receptores de adenosina  $A_{2A}$ . En experimentos realizados en neutrófilos humanos aislados y activados, la presencia de éster ATL-146 y rolipram, un inhibidor de la fosfodiesterasa, incrementaron el contenido de AMPc intracelular, disminuyendo la actividad oxidativa de los neutrófilos, lo que sugirió que este efecto inhibitorio se relaciona con el incremento del AMPc y la consecuente activación de PKA (Okusa M.D., 2002). Por otra parte, se ha demostrado que el estrés oxidativo activa la enzima 5'-nucleotidasa e incrementa la producción de adenosina en el riñón. Este proceso provoca un desequilibrio de los mecanismos que regulan la producción de adenosina y que participan en el control del tono vascular renal y por consecuencia la perfusión glomerular (Chen Y. F., et al, 2001).

En este estudio se pretende demostrar que el incremento en la concentración extracelular de AMPc y ADO disminuye el daño celular causado por especies reactivas de  $O_2^-$  medidas en función

de la producción de  $F_2$ -isoprostanos. Para este propósito, se diseñó un modelo experimental con ratas control y ratas diabéticas, de las cuales se aisló el riñón y posteriormente la porción glomerular. Los glomérulos fueron expuestos in vitro a estrés oxidativo. Para determinar el efecto del AMPc en la producción de radicales libres, se bloqueó la síntesis de ADO mediante la inhibición selectiva de la enzima ecto-fosfodiesterasa.

Con estos experimentos se evaluó si el incremento en la concentración de AMPc por si mismo es capaz de prevenir la formación de las especies reactivas de  $O_2^-$ , comparado con el efecto que produce la adenosina.

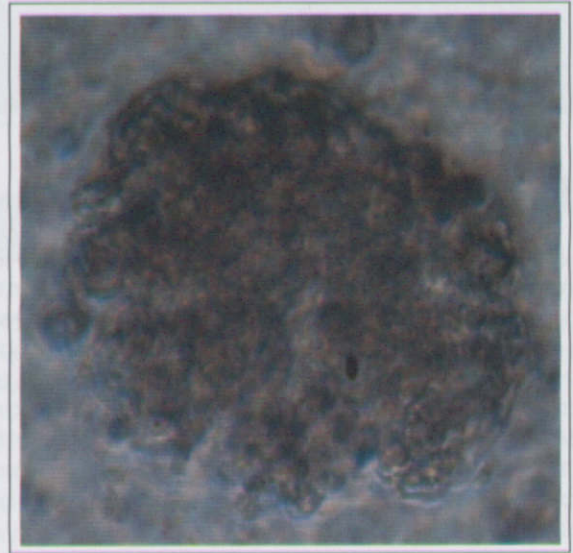
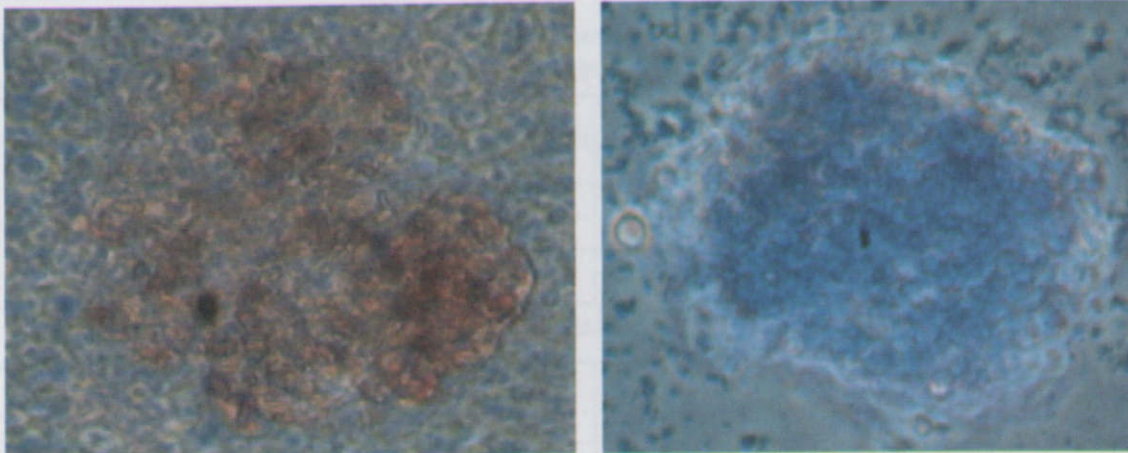


Figura 1. Glomérulo aislado de rata control, observado con microscopio de contraste de fases.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Modelo experimental.** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 300 a 350 g de peso. Se establecieron dos grupos de trabajo; un grupo de ratas control y un grupo de ratas diabéticas inducida por la administración intraperitoneal (IP) de 65 mg/kg de estreptozotocina. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar durante el desarrollo de los experimentos y 12 horas antes de la nefrectomía se sometieron a ayuno. Antes de cada cirugía, se cuantificó la concentración de glucosa en sangre y de hemoglobina glucosilada de cada una de las ratas en el grupo de diabetes inducida, para confirmar el desequilibrio metabólico inductor de estrés.





**Figura 2.** Método de azul de tripano para la medición de viabilidad de los glomérulos. A la derecha se observa un glomérulo no viable y a la izquierda un glomérulo viable.

**Aislamiento de glomérulos.** El día del experimento, las ratas control y las ratas diabéticas se anestesiaron con 50 mg/kg de pentobarbital sódico vía IP. Durante el proceso, se colocó a la rata en posición de decúbito dorsal y se inmovilizaron las extremidades. Posteriormente se realizó una incisión longitudinal en el abdomen, se localizaron los riñones, la arteria y vena renal, las venas cava y aorta abdominales. Se bloqueó el flujo sanguíneo mediante la obstrucción de la aorta de acuerdo al método de Gloy J. et al., 1997. Se canalizaron las arterias renales y se profundieron los riñones a 4 ml/min, con solución fisiológica a 4°C, la cual contenía 135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucosa y 1 mM HEPES; pH 7.4. Los riñones se extrajeron a 4°C, se realizó un corte sagital y se separó la fracción cortical. La corteza se homogenizó con un pistilo de vidrio y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado reconstituido en la solución de perfusión, se tamizó a través de una criba de acero de 180 µm y enseguida por otra de 60 µm, aislando de esta última, la porción glomerular (Osamo I. & Roman R. J. 1999), lo cual se corroboró con observación en microscopio de contraste de fases.

**Viabilidad de los glomérulos.** Para determinar la viabilidad de los glomérulos aislados, se utilizó el método de exclusión del colorante azul de tripan. Los glomérulos viables se contaron directamente en la cámara de Neubauer y se calculó el porcentaje de viabilidad.

**Cuantificación de Proteínas.** La concentración de proteínas totales contenidas en la suspensión

glomerular se cuantificó mediante el ensayo espectrofotométrico del ácido bicinónico a 570 nm. Se elaboraron curvas de calibración con  $\gamma$ -globulina bovina, en un rango de concentración de 10 a 50 µM.

**Detección de F<sub>8</sub>-isoprostanos.** La concentración de F<sub>8</sub>-isoprostanos se determinó con un ensayo inmunoenzimático específico comercial (ELISA) a 415 nm (Cayman, Chemicals). Con esta finalidad, se tomaron muestras que contenían 100 glomérulos aislados de ratas control y de ratas diabéticas y se expusieron a un reto oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM, menadiona 5 µM y metilviologen 35 µM; ya que diversos estudios han demostrado que la exposición de las células renales a esta concentración de peróxido de hidrógeno durante una hora, induce daño celular moderado (Lee H.T., & Emala C. W. 2001). Además, se evaluó el efecto de AMPc 100 nm y adenosina 75 µM sobre el daño oxidativo y posteriormente se determinó el efecto de los fármacos probenecid 1 µM, rolipram 5 µM y dipiridamol 10 µM, como inhibidores de los canales de AMPc, de la enzima fosfodiesterasa y de los mecanismos de transporte de adenosina, respectivamente.

## RESULTADOS

El grupo de ratas que desarrollaron hiperglucemia inducida por estreptozotocina (65 mg/kg) observaron una concentración de glucosa en sangre mayor a 600 mg/dl y la hemoglobina glucosilada de 5.3% ± 0.05%, lo cual confirmó el desarrollo de diabetes, al compararse con el grupo de ratas control.



|   |                               | F <sub>8</sub> -isoprostanos (pg/ml) |                  | F <sub>8</sub> -isoprostanos (pg/ml) |                  |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|
|   |                               | Ratas Control                        | Ratas Diabéticas | Ratas Control                        | Ratas Diabéticas |
| <b>Glomérulos basales</b>                   |                               | 6.02 ± 3.9                           | 5.05 ± 0.68      | 6.02 ± 3.92                          | 5.05 ± 0.68      |
| <b>Reto Oxidativo</b>                       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 7.25 ± 2.17                          | 0.68 ± 0.58      | 7.94 ± 3.75                          | 0.78 ± 0.43      |
|   | Menadiona                     | 16.52 ± 1.55                         | 0.73 ± 0.42      | 8.79 ± 0.66                          | 1.91 ± 2.20      |
|   | Metil Viologen                | 45.22 ± 38.50                        | 0.68 ± 0.57      | 21.97 ± 8.50                         | 5.34 ± 3.63      |
|   |                               | AMPC                                 |                  | Adenosina                            |                  |
| <b>Reto Oxidativo</b>                       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 3.06 ± 0.21                          | 3.24 ± 4.20      | 5.12 ± 2.83                          | 0.49 ± 0.10      |
|   | Menadiona                     | 9.83 ± 3.02                          | 0.21 ± 0.07      | 4.31 ± 0.23                          | 0.90 ± 0.13      |
|   | Metil Viologen                | 15.12 ± 1.40                         | 0.60 ± 0.05      | 6.30 ± 2.98                          | 3.02 ± 1.07      |
| <b>Probenecid o Dipiridamol*</b>            | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 67.93 ± 12.21                        | 11.40 ± 7.95     | 59.45 ± 12.86*                       | 39.91 ± 22.90*   |
|   | Menadiona                     | 23.96 ± 17.68                        | 26.69 ± 11.52    | 22.99 ± 25.75*                       | 1.12 ± 1.25*     |
|   | Metil Viologen                | 22.18 ± 5.32                         | 0.88 ± 0.24      | 10.12 ± 5.20*                        | 0.78 ± 1.07*     |
| <b>Rolipram</b>                             | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 16.65 ± 1.94                         | 1.14 ± 0.72      | 13.69 ± 4.21                         | 8.54 ± 7.18      |
|   | Menadiona                     | 41.97 ± 30.28                        | 0.99 ± 0.05      | 95.79 ± 61.09                        | 27.24 ± 14.39    |
|   | Metil Viologen                | 2.80 ± 0.39                          | 16.59 ± 3.30     | 3.65 ± 0.76                          | 0.84 ± 0.90      |
| <b>Probenecid ó Dipiridamol* + Rolipram</b> | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 26.35 ± 5.53                         | 3.99 ± 2.63      | 15.53 ± 0.35*                        | 4.37 ± 4.59*     |
|   | Menadiona                     | 52.12 ± 4.91                         | 3.67 ± 1.56      | 17.38 ± 6.49*                        | 16.38 ± 18.09*   |
|   | Metil Viologen                | 77.54 ± 23.85                        | 4.22 ± 1.98      | 99.98 ± 23.22*                       | 31.84 ± 32.69*   |

**TABLA 1.** Concentración de F<sub>8</sub>-isoprostanos en muestras de 100 glomérulos aislados de ratas normales y de ratas diabéticas respectivamente. Los resultados se expresan con el promedio ± error estándar, n=4.

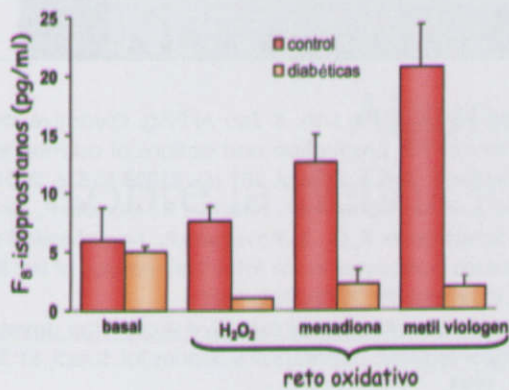
Se aislaron 40,000 glomérulos/ml de los riñones de ratas control y 25,500 glomérulos/ml de las ratas diabéticas en promedio (figura 1). La viabilidad de la suspensión glomerular determinada por la exclusión de azul de tripán fue de 95 % en las ratas control y 96 % en las ratas diabéticas (figura 2). La concentración de proteínas totales de estos homogenados fue de 6.58 mg/ml en los glomérulos de ratas normales y 2.11 mg/ml en los glomérulos de ratas diabéticas. Los resultados obtenidos de la cuantificación de F<sub>8</sub>-isoprostanos se muestran a continuación en la tabla 1 y en las figuras 3, 4, 5, 6 y 7.

## DISCUSIÓN

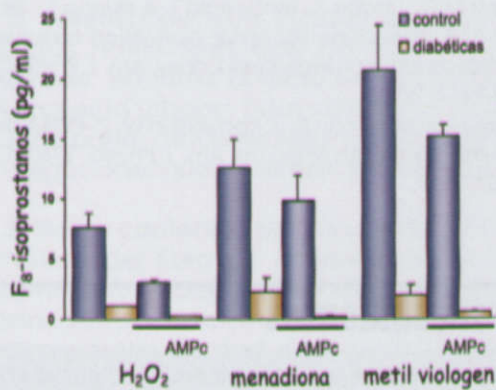
Los glomérulos aislados de las ratas control incrementaron la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos al ser expuestos a los agentes oxidantes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona y metilviologen. Por otra parte los glomérulos de las ratas diabéticas disminuyeron

significativamente la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos en las mismas condiciones, posiblemente debido a que poseen un mecanismo protector contra el estrés oxidativo hasta cierto punto. El AMPc y la ADO disminuyeron la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos cuando están presentes en el líquido extraglomerular. Estos hallazgos apoyan nuestra hipótesis y nos indican que el AMPc y/o la ADO actúan como protectores del estrés oxidativo en este modelo experimental. Para determinar el mecanismo de acción de cada uno de estos compuestos, se evaluó el efecto de probenecid como un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos ya que se ha demostrado que el AMPc utiliza este sistema de transporte para salir de la célula. En nuestros experimentos el probenecid incrementó la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos en presencia de los tres agentes oxidantes, lo cual indicó que la inhibición de la liberación o el transporte hacia el interior celular del AMPc no es suficiente para disminuir la producción de F<sub>8</sub>-

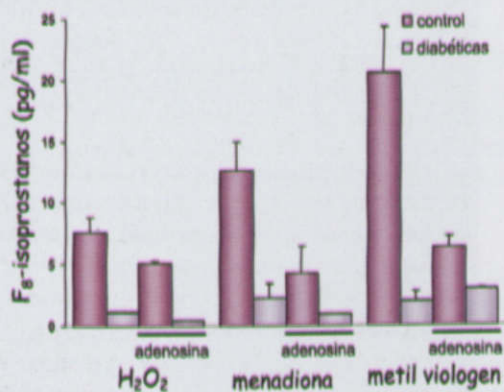




**Figura 3.** Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM, menadiona 5 μM y metilviologen 35 μM en la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos de 100 glomérulos aislados de ratas control y ratas diabéticas. Los valores se expresan como la media ± error estándar, n=4



**Figura 4.** Efecto de AMPc 100 nM en la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos de 100 glomérulos aislados de ratas control y ratas diabéticas, expuestos a un estrés oxidativo. Los valores se expresan como la media ± error estándar, n=4.

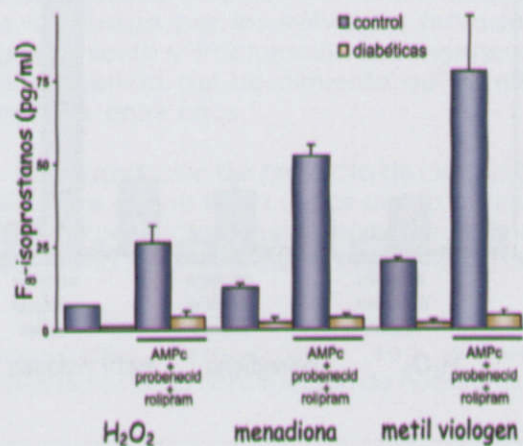


**Figura 5.** Efecto de adenosina 75 μM en la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos de 100 glomérulos aislados de ratas control y ratas diabéticas, expuestos a estrés oxidativo. Los valores se expresan como la media ± error estándar, n=4.

isoprostanos. Además, el rolipram, inhibidor de la isoforma IV de la enzima ecto-fosfodiesterasa presentó un efecto similar a probenecid (con excepción de metilviologen); demostrando que la inhibición de la degradación de AMPc no parece tener efecto protector para la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos.

Por otra parte, la ADO añadida extracelularmente en presencia de rolipram no produjo un incremento en la respuesta quizás debido a que el AMPc intra y extracelular no se utilizan en este mecanismo. El bloqueo de los transportadores de adenosina tampoco muestra una disminución en la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos, ya que es probable que la adenosina siga vías metabólicas alternas como transformación a inosina y/o unión a receptores, y que esta sea la razón por la cual no se presente el efecto protector esperado.

El bloqueo del transporte del AMPc y de su metabolismo al parecer tampoco fueron suficientes para producir un efecto inhibitorio sobre la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos. La presencia de metilviologen y adenosina en la suspensión glomerular disminuyeron la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos de manera más notoria que las otras dos condiciones; estos hallazgos indican que el metilviologen inhibe probablemente la liberación de ácido araquidónico y por consecuencia la formación F<sub>8</sub>-isoprostanos. Paradójicamente cuando se evaluó la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos



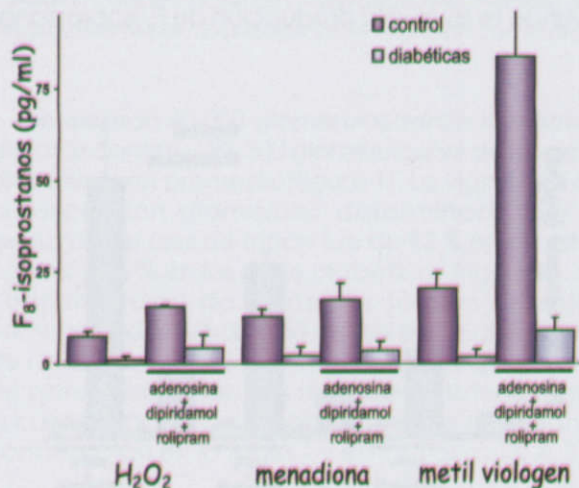
**Figura 6.** Efecto de AMPc 100 nM, probenecid 1 mM y rolipram 5 μM en la producción de F<sub>8</sub>-isoprostanos de 100 glomérulos aislados de ratas control y ratas diabéticas, expuestos a estrés oxidativo. Los valores se expresan como la media ± error estándar, n=4.



en presencia de los tres compuestos oxidantes, únicamente el metilviologen incrementó la producción de  $F_8$ -isoprostanos. Sin embargo, el  $H_2O_2$  y la menadiona probablemente favorezcan la concentración de ADO y AMPc intra y extracelular, y por consecuencia disminuyan la producción de  $F_8$ -isoprostanos. En estas condiciones el metilviologen actúa como un intercambiador de electrones libres a nivel mitocondrial, los cuales aumentan el estrés oxidativo en la membrana celular, favorecen la liberación del ácido araquidónico y la formación  $F_8$ -isoprostanos.

## CONCLUSIONES

Es posible que el aumento de AMPc o ADO extracelular en el medio en contacto con los glomérulos de ratas control y de ratas diabéticas los proteja del estrés oxidativo en diferente proporción. Además el efecto protector del AMPc y la ADO extracelular demostrado en estos experimentos se observa siempre y cuando las vías de señalización intra y extracelulares funcionen conjuntamente.



**Figura 7.** Efecto de adenosina 75  $\mu$ M, dipiridamol 10  $\mu$ M y rolipram 5  $\mu$ M en la producción de  $F_8$ -isoprostanos en 100 glomérulos aislados de ratas control y ratas diabéticas, expuestas a estrés oxidativo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar, n=4.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chen Ya-Fei, Li Pin Lan, & Zou Ai-Ping. Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. *Am. J. Physiol.* 281 (6): R1808-R1816, 2001.
- Gloy J., H A., Fischer K-G., Nitschke R., Mundel P., Bleich M., Schollmeyer R. G., & Pavenstadt. Angiotensin II depolarizes podocytes in the intact glomerulus of the Rat. *J. Clin. Invest.* 99: 2772-2781, 1997
- Ha H. & Hwan KK. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 51: S18-S21, 1995.
- Lee H.T., & Charles W.E., Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A1 and A2A adenosine receptors. *Am. J. Physiol.* 282: F-844-F852, 2002.
- Okusa M.D. A2A adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am. J. Physiol.* 282: F10-F18, 2002.
- Okusa M.D., Linden J., McDonald T. & Huang L. Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 277: F404-F412, 1999.
- Osamu I. and Roman R. J. Regulation of P-4504A activity in the glomerulus of the rat. *Am. J. Physiol.* 276: R1749-R1757, 1999.

## Agradecimientos

Este trabajo obtuvo el primer lugar en el IV Verano de la Ciencia de la Región Centro en el año 2002 en la categoría de Ciencias de la Salud, presentado por los estudiantes de la carrera de Medicina \*Srita. María Eugenia Mena Ramírez del Centro de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes y \*\*Sr. Ángel Sáenz Sánchez de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Universidad de Chihuahua y a la Secretaría de Postgrado e Investigación de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí el apoyo económico a la \*Srita. María Eugenia Mena Ramírez y al \*\*Sr. Ángel Sáenz Sánchez para realizar esta investigación. Los recursos para este trabajo se obtuvieron del proyecto 25887-M CONACYT otorgado al Dr. Flavio Martínez investigador anfitrión en este evento.