

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INTERACCIÓN DE LA ANGIOTENSINA II CON LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DE ADENOSINA EN EL TEJIDO RENAL DE RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

TOMÁS NEPOMUCENO MEJÍA

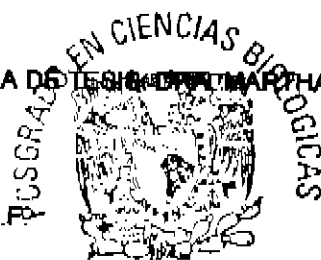
DIRECTORA DE TESIS: DR. MARTHA FRANCO GUEVARA

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2005



INSTITUTO DE
CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ



COORDINACIÓN

m340272



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.

Presento a la Dirección General de Identificación en la
Calle 14 de Octubre en formato electrónico, impreso en
constante de mi trabajo personal.

Nombre: Tamás Nájera

Mesa

21-01-05

Apellido: Tamás Nájera



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

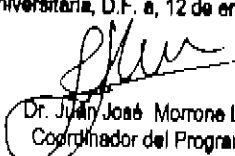
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Nepomuceno Mejía Torres con número de cuenta 501048477, con la tesis titulada: "Interacción de la Angiotensina II con las enzimas del metabolismo de adenosina en el tejido renal de la rata", bajo la dirección de(a) Dra. Martha Franco Guevara.

Presidente:	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Vocal:	Dr. José Pedraza Chaverri
Secretario:	Dra. Martha Franco Guevara
Suplente:	Dr. Federico Martínez Montes
Suplente:	Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 12 de enero del 2005


Dr. Julián José Morone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado en su totalidad por el CONACYT 40934-M

Agradezco Infinitamente a los miembros de mi Comité Tutoral.

Dra. Martha Franco Guevara

Dr. José Pedraza Chaverrí

Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Agradezco a los miembros de mi Jurado el tiempo y consejos otorgados.

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Federico Martínez Montea

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	6
Angiotensina II	6
Adenosina	11
Enzima 5' nucleotidasa	12
Enzima adenosina desaminasa	13
Efectos de la adenosina	14
Interacción angiotensina-adenosina	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Infusión de angiotensina II	24
Determinación de la presión arterial sistólica	24
Cuantificación de proteinuria	24
Obtención del tejido renal	26
Determinación de la actividad de la 5' nucleotidasa	25
Determinación de la actividad de la adenosina desaminasa	27
Análisis estadístico	29

RESULTADOS	30
Efecto de la ANGII sobre la 5' nucleotidasa	30
Efecto de la ANGII sobre la adenosina desaminasa	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	57

RESUMEN

La interacción sinérgica entre los efectos vasoconstrictores renales de la angiotensina II (ANGII) y la adenosina (ADO) es bien conocida. Sin embargo, los mecanismos intrínsecos involucrados en esta interacción no se conocen con precisión; es posible que el sinergismo entre ambos autacoides involucre alteraciones en la concentración local de ADO inducida por el octapéptido, ya que un bajo contenido del nucleósido en el riñón estimula preferencialmente a los receptores A_1 produciendo vasoconstricción.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la ANGII afecta la actividad de la 5'nucleotidasa (5'ND) y la adenosina desaminasa (ADA) renales, enzimas involucradas en la síntesis y el catabolismo de la ADO, respectivamente.

Se utilizaron ratas Wistar macho como modelo experimental, a las que se les infundió ANGII (435, 260 y 130 ng/kg/min) mediante una bomba miniosmótica. El grupo control se conformó con ratas a las que se les realizó la cirugía ficticia. Después de 15 días de evolución, se obtuvieron ambos riñones y se diseccionaron corteza y médula. Las secciones renales se homogenizaron para alisar a la 5'ND y a la ADA por electroforesis en geles de agarosa e isoelectroenfoque, respectivamente. Los geles fueron incubados con los sustratos específicos para exhibir la actividad enzimática y las bandas de reacción se estimaron por densitometría óptica.

La infusión de ANGII produjo hipertensión arterial y proteinuria en los tres grupos experimentales en comparación con el control ($185 \pm 3.8^*$, $180 \pm 4.1^*$ y $155 \pm 4.1^*$ respectivamente, vs. 110 ± 1.7 mm Hg para la presión arterial, y $122 \pm 1.7^*$,

70 ± 2.6*, 23.5 ± 1.8*, vs 9.9 ± 0.2 mg de proteína en orina de 24 horas, a los 14 días de infusión en los grupos de 435, 260 y 130 ng/kg/min y control, respectivamente, *p < 0.05). La actividad de la 5'ND renal en las ratas control fue de 0.65 ± 0.08 mU/μg de proteína, que disminuyó significativamente en la corteza renal por la infusión de ANGII en un 55.5%, 43.6% y 30.8% en los grupos de 435, 260 y 130 ng/kg/min, respectivamente. En la médula, la actividad de la enzima del grupo control fue de 0.27 ± 0.03 mU/μg de proteína, y únicamente la dosis de 435 ng/kg/min disminuyó significativamente la actividad de la 5'ND en un 55.5%. La actividad de la ADA no se modificó con la infusión de ANGII en la corteza ni en la médula renal.

Este es el primer trabajo en el que se demuestra el efecto de la infusión de ANGII sobre enzimas involucradas en el metabolismo de la ADO; el péptido induce disminución de la actividad de la 5'ND pero no altera la actividad de la ADA, efecto que probablemente reduce los niveles de ADO en el riñón. Las bajas concentraciones del nucleósido activarían preferencialmente a los receptores A₁, que producen vasoconstricción. Este efecto peculiar de la ADO puede potenciar el efecto vasoconstrictor de la ANGII, contribuyendo así a explicar el sinergismo entre ambos autacoides.

ABSTRACT

The synergic interaction of angiotensin II (ANGII) and adenosine (ADO) to induce renal vasoconstriction is well recognized; however, the intrinsic mechanism responsible for this interaction remain unclear. We proposed that alterations in ADO metabolism induced by ANGI II contribute to the synergism between both autacoids. We studied whether the activity of the renal 5' nucleotidase (synthesis) and adenosine deaminase (degradation) might be altered by ANGI II infusion.

Male Wistar rats (n=30) received ANGI II through a miniosmotic pump (435, 280 and 130ng/kg/min) during 14 days; blood pressure and proteinuria were measured. The kidneys were excised, 5'ND and ADA activity were determined in the cortex and medulla. Sham rats (n=10) were used as control. 5'ND and ADA were separated by agarose gels electrophoresis and isoelectric focusing, respectively. The gels were incubated with specific substrates and stained with dyes to exhibit the enzymatic activity (dephosphorylation of 5'AMP and deamination of ADO, respectively). The enzyme activities were estimated by optical densitometry. All doses of the ANGI II induced marked hypertension ($185 \pm 3.8^*$, $180 \pm 4.1^*$ y $165 \pm 4.1^*$ vs. 110 ± 1.7 mm Hg). Urine protein excretion was ($122 \pm 1.7^*$, $70 \pm 2.5^*$, $23.6 \pm 1.7^*$ vs. 9.9 ± 0.2 mg/24h, respectively. * $p < 0.05$).

The activity of the 5'ND in the sham rats was 0.55 ± 0.06 mU/ μ g protein in the renal cortex. This activity decreased significantly in a dose related fashion in the cortex ($0.25 \pm 0.026^*$, $0.31 \pm 0.037^*$ and $0.38 \pm 0.036^*$ mU/ μ g protein. * $p < 0.05$), however only the highest dose reduced the activity of the enzyme in the renal medulla ($0.12 \pm 0.014^*$, 0.23 ± 0.014 and 0.25 ± 0.017 mU/ μ g protein vs 0.27

± 0.029 mU/ μ g protein sham rats. * $p < 0.05$). The ADA renal activity did not change neither in the cortex nor in the medulla by ANGII.

Our results suggest that the decrease in 5'ND activity might result in low renal ADO content, thus enhancing the vasoactive effects of ANGII due to the preferential activation of ADO A1 receptors induced by the reduced ADO local concentration.

INTRODUCCIÓN

La angiotensina II (ANGII), (octapéptido del sistema renina-angiotensina SRA, Fig.1), es un poderoso vasoconstrictor que es considerado como el principal regulador del volumen intravascular y la presión arterial. El SRA fue originalmente descrito como un sistema circulante que participa en cambios crónicos que involucran la regulación del tono vascular. Sin embargo, los componentes del SRA se encuentran presentes en muchos tejidos como son cerebro, riñón, corazón y vasos sanguíneos (Dzau, 1989; Danser, 1998; De Gasparo et al., 2000; Kim e Iwao, 2000) por lo que existe producción local de ANGI, donde ejerce efectos autocrinos y paracrinos. Esto es particularmente importante para órganos como el riñón, pues la ANGI ejerce efectos relevantes sobre la filtración glomerular y los mecanismos de transporte tubular que se regulan en forma independiente del SRA sistémico.

El SRA se activa cuando la renina hidroliza el angiotensinógeno para formar angiotensina I (ANG I), la cual puede ser metabolizada a ANGI (1-7) por tres endopeptidasas neutras (NEP) (Ferrario et al., 1997) o por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a ANGI (Inagami, 1998); existen vías alternativas no dependientes de la ECA para que se forme ANGI; el octapéptido puede ser producido a partir de la actividad de la quimasa (Hollenberg et al., 1998), de la carboxipeptidasa o bien de la catepsina G (Touyz y Schiffrin, 2000). La ANGI es metabolizada a ANGI y IV por aminopeptidasas (APDS) (Fig. 1).

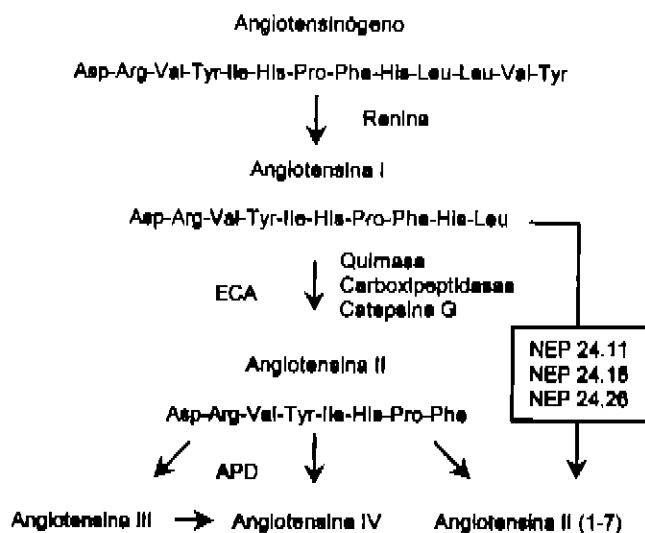


Fig.1 Esquema del sistema renina-angiotensina (SRA) Touyz, Schiffrin , 2000. NEP: endopeptidasa neutra; ECA: enzima convertidora de angiotensina; APDS: aminopeptidasa.

Los efectos del octapéptido se deben a la activación de sus receptores de membrana AT_1 y AT_2 , que tienen alta afinidad. Los receptores AT_1 están ampliamente distribuidos; se encuentran en el músculo liso vascular, en el corazón, en la glándula pituitaria, en el riñón, en las glándulas suprarrenales, en el hígado, en el cerebro y en el pulmón (De Gasparo et al., 2000). La ANGII generada en el riñón se une a los receptores AT_1 que se encuentran localizados en las células mesangiales, en las arteriolas pre y postglomerulares, en los vasos rectos, en las células intersticiales de la médula renal y en las células del túbulo proximal (De Gasparo et al., 2000).

Los receptores AT_1 son los mediadores de la mayor parte de los efectos fisiológicos de la ANGII como son: contracción de las células mesangiales, lo que

disminuye el coeficiente de ultrafiltración; del músculo liso vascular, lo que aumenta la resistencia de las arteriolas aferente y eferente, por lo que modula la filtración glomerular (Ichikawa y Harris, 1991; Egido, 1996). Tales efectos de la ANGII aumentan la permeabilidad del glomérulo lo que favorece un incremento en la excreción urinaria de proteínas (Pavenstadt et al., 2003). Además, la ANGII estimula la síntesis de aldosterona (Biron et al., 1981) favoreciendo la retención de sodio y agua (Sealey y Laragh, 1990).

La ANGII también tiene efectos locales como factor de crecimiento (Wolf y Neilson, 1993), favorece el desarrollo de fibrosis (Border y Noble, 1998; Mezzano et al., 2001), induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jalmes et al., 1998; Haugen et al., 2000) y modula procesos inflamatorios (Ruiz et al., 2001; Suzuki et al., 2003). En efecto, la ANGII es capaz de regular el crecimiento de las células mesangiales, induciendo proliferación e hipertrofia (Egido, 1996). El octapéptido induce crecimiento celular por la transactivación de los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina a través de complejas vías de señalización desencadenadas por la activación de las proteínas G (Murasawa et al., 1998; Moriguchi et al., 1999), así como por el incremento de la expresión y síntesis de factores de crecimiento (FC), como el FC derivado de plaquetas (PDGF), el FC epidérmico (EGF), el FC transformante- β (TGF- β), el FC semejante a insulina-1 (IGF-1), el FC fibroblástico (FGF) y el factor activador de plaquetas (PGF) (Dubey et al., 1997a; Force y Bonventre, 1998). La ANGII produce fibrosis, al incrementar la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina y colágena (Egido, 1996), efecto mediado

por TGF- β . La administración de ANGII a células mesangiales en cultivo incrementa significativamente la producción de proteínas de matriz extracelular y la expresión de TGF- β en el glomérulo (Kagami et al., 1994). El péptido también puede promover la transformación de fibroblastos a miofibroblastos (Johnson et al., 1992) e inducir transdiferenciación mesenquimo-epitelial de células tubulares a miofibroblastos, los cuales participan en el proceso de fibrosis y de producción de matriz extracelular (Lan, 2003). Los miofibroblastos pueden proliferar e invadir espacios periglomerulares y peritubulares, lo que contribuye a producir una lesión tubulointersticial. En efecto, la infusión crónica de ANGII a ratas causa fibrosis intersticial con depósito de colágeno tipo IV (Johnson et al., 1992). Además, la ANGII disminuye la degradación de la matriz extracelular al aumentar la expresión de inhibidores de proteasas, como son el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) (Nakamura et al., 2000) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) (Chua et al., 1996), los cuales inactivan proteasas renales que degradan la matriz extracelular. Por otra parte, la infusión de ANGII aumenta la síntesis de citocinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6) en células mesangiales, tubulares y vasculares de músculo liso de arterias renales (Ruiz et al., 2002). La infusión del péptido en ratas causa infiltración de células inflamatorias en el glomérulo y en el intersticio (Wolf et al., 1997; Ruiz et al., 2001) debido a que induce la expresión de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos tipo-1 (MCP-1) (Ruiz et al., 1998), de RANTES (quimiocina expresada en células T) en células endoteliales glomerulares (Wolf et al., 1997) y de osteopontina (OPN) que es una molécula de adhesión (MA) quimotáctica para

macrófagos (Yu et al., 2000). La ANGII también incrementa la expresión de moléculas de adhesión (MA) como la selectina-E (Gräfe et al. 1997), la selectina-P (Tayeh y Scicli, 1998), la MA intracelular tipo 1 (ICAM-1) (Pastore et al., 1999) y la MA de células vasculares tipo 1 (VCAM-1) (Tummala et al., 1999). Cuya expresión puede contribuir a la infiltración de células inflamatorias y a la perpetuación del proceso inflamatorio.

La expresión de varios genes asociados con inflamación son controlados por estrés oxidativo y por factores de transcripción (FT) como el activador de proteínas-1 (AP-1) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Guljarro y Egido, 2001).

Bajo este contexto, la ANGII induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la NADPH oxidasa en células mesangiales (Jalmes et al., 1998). El anión superóxido $O_2^{\cdot -}$ y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pueden difundir al núcleo celular e inducir la expresión y síntesis de moléculas quimiotácticas y proinflamatorias que causan daño renal (Haugen et al., 1999). El $O_2^{\cdot -}$ puede interactuar con el óxido nítrico (ON), lo que causa su inactivación y la producción de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$) (Beckman y Koppenol, 1996), el cual puede activar a la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y favorecer la síntesis de prostaglandinas con efecto inflamatorio como PGH_2 (Landino et al., 1996).

La ANGII también activa a los FT AP-1 y a NF- κ B en varios tipos celulares en cultivo como células glomerulares (mesangiales y endoteliales). La activación de factores de transcripción en células endoteliales del glomérulo de rata, es mediada por los dos receptores AT_1 y AT_2 (Ruiz et al., 2001b; Wolf et al., 2002).

Los receptores AT_2 son expresados en niveles altos durante el desarrollo fetal; sin embargo, su expresión disminuye después del nacimiento (Nahmlas y Strosberg, 1995). En tejidos adultos los receptores AT_2 son detectables en el páncreas, corazón, riñón, suprarrenales, cerebro y en los vasos (Berry et al., 2001). La función de los receptores AT_2 aún no está bien establecida, pero parecen antagonizar los efectos de los receptores AT_1 bajo condiciones fisiológicas; inhiben el crecimiento celular (Nakajima et al., 1995), producen vasodilatación (Scheuer y Perrone, 1993) e inducen apoptosis (Horiuchi et al., 1999). Estudios recientes (Ding et al., 2002; Lodha et al., 2002; Bhaskaran et al., 2003) han demostrado que la apoptosis de células mesangiales, de células tubulares proximales y de células epiteliales inducida por la ANGII, involucra un incremento en la producción de TGF- β y de especies reactivas de oxígeno, así como la fosforilación de la MAPK/p38, la expresión de genes proapoptóticos como Fas, FasL y de Bax, también la activación de la caspasa-3 (proteasa citosólica fundamental en el desarrollo de la apoptosis). Todos estos efectos han sido inhibidos cuando se utilizan antagonistas de los receptores AT_1 y AT_2 , sugiriendo que las acciones apoptóticas de la ANGII son mediadas no sólo por AT_2 , sino también por AT_1 .

Otro compuesto vasoactivo, la adenosina (ADO) tiene efectos relevantes en la circulación sistémica, regula la función renal, promueve el transporte de sodio en las células tubulares renales (Macala y Hayslett, 2002) y posiblemente constituye la señal que activa el sistema retroalimentario tubuloglomerular (TGF) en la mácula densa (Osswald et al., 1991; Ren et al., 2002).

La ADO es sintetizada a partir de la hidrólisis del 5'AMP por la 5'nucleotidasa (5'ND) (McCoy et al., 1993; Le Hir y Kalsaling, 1993) o bien por la conversión enzimática de la S-adenosilhomocisteína (Lloyd et al., 1988; Fig. 2).

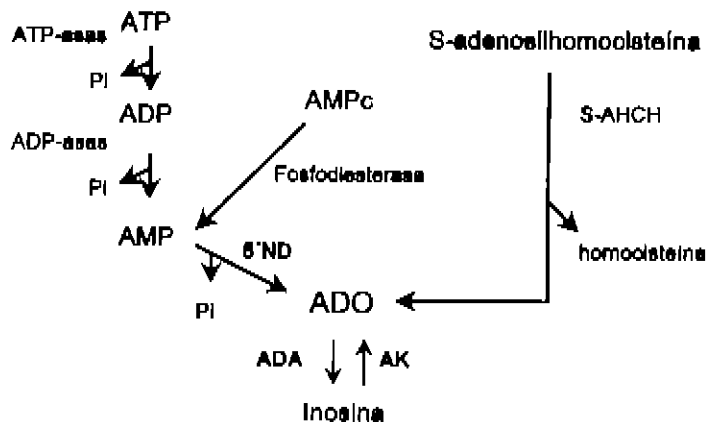


Fig. 2. Representación esquemática del metabolismo de la ADO. ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; 5'ND, 5'nucleotidasa; ADA, adenosina desaminasa; AK, adenosina cinasa; S-AHCH, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; Pi, fosfato.

Las concentraciones de ADO están reguladas por la actividad de cotransportadores que la dirigen fuera de la célula por difusión facilitada (Meghji et al., 1985) o bien, esta molécula es degradada en pocos segundos por la adenosina desaminasa (ADA) a Inosina o por la adenosina cinasa (AK) para formar 5'AMP (Spielman y Thompson, 1982; Fig.2).

Enzimas 5'ND y ADA.

La 5'ND cataliza la síntesis de ADO a partir del 5'AMP, esta vía de síntesis del nucleósido es la más importante en el riñón (Spielman y Thompson, 1982).

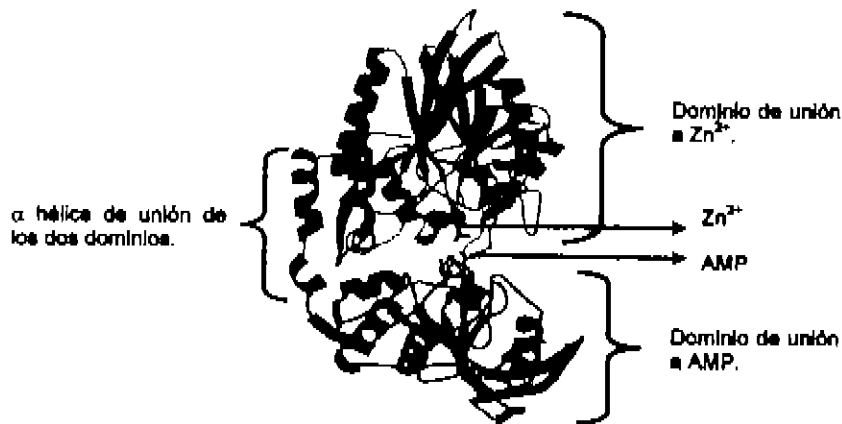


Fig. 3. Estructura de la 5'ND (Knofel, 1999).

La 5'ND es una glicoproteína de aproximadamente 64 KDa, que se puede localizar en el citoplasma y también anclada en la membrana celular con la exposición del sitio catalítico hacia el espacio extracelular (ecto-enzima). Esta enzima consta de dos dominios que están unidos por una alfa hélice larga. El sitio catalítico de la enzima contiene iones divalentes como el Zn^{2+} que actúan como cofactores; esta interacción se lleva a cabo por el extremo amino de la proteína (Fig. 3). En el extremo carboxilo se encuentra el dominio de interacción con el 5'AMP (Knofel y Strater, 1999). En el riñón, se ha detectado la enzima por inmunohistoquímica en células tubulares proximales, en células mesangiales glomerulares, en fibroblastos intersticiales y en células intercaladas de los túbulos colectores (Le Hir y Kaesling, 1991).

Una de las dos enzimas de degradación de ADO es la ADA. La ADA es una glicoproteína que cataliza la desaminación de la ADO para producir inosina. Esta proteína es monomérica con un peso aproximado de 40KDa (Dolezal, 2001).

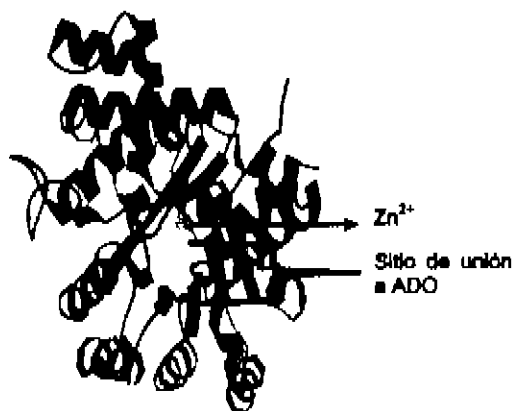


Fig. 4 Estructura de la ADA.

La degradación de ADO en el riñón se lleva a cabo principalmente a través de la ADA, con una contribución menor de la adenosina cinasa, la cual fosforila la ADO para sintetizar 5'AMP (Nishiyama et al., 2001). Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma celular. Sin embargo, se ha descrito que la ADA también se encuentra unida a la cara externa de la membrana celular (ecto-enzima) (Herrera et al., 2001). Se ha detectado la expresión y la actividad de la ADA en el glomérulo, en túbulo proximal, en la porción gruesa cortical y medular del asa de Henle, en el túbulo colector cortical y medular (Wu et al., 1999).

Una de las dos enzimas de degradación de ADO es la ADA. La ADA es una glicoproteína que cataliza la desaminación de la ADO para producir inosina. Esta proteína es monomérica con un peso aproximado de 40KDa (Dolezal, 2001).

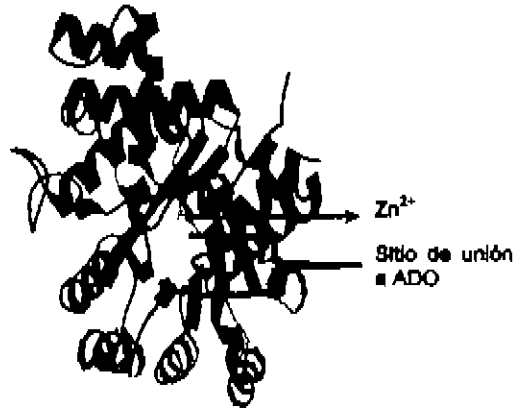


Fig. 4 Estructura de la ADA.

La degradación de ADO en el riñón se lleva a cabo principalmente a través de la ADA, con una contribución menor de la adenosina cinasa, la cual fosforila la ADO para sintetizar 5'AMP (Nishiyama et al., 2001). Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma celular. Sin embargo, se ha descrito que la ADA también se encuentra unida a la cara externa de la membrana celular (ecto-enzima) (Herrera et al., 2001). Se ha detectado la expresión y la actividad de la ADA en el glomérulo, en túbulo proximal, en la porción gruesa cortical y medular del asa de Henle, en el túbulo colector cortical y medular (Wu et al., 1999).

Los efectos paracrinos de la ADO son mediados por cuatro subtipos de receptores de membrana, el A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Fredholm et al., 2001). Los receptores A_1 están acoplados a proteínas G_i que inhiben a la adenilato ciclasa (AC) y también tiene la capacidad de activar a la fosfolipasa C (PLC), mientras que los A_3 además de estar acoplados a G_i , también pueden señalizar por la vía del GMP cíclico. Los receptores A_{2A} señalizan principalmente vía G_s , estimulando a la adenilato ciclasa y la producción de AMPc (Jackson y Dubey, 2001) y los A_{2B} además de estar acoplados a G_s pueden señalizar vía PLC y movilización de calcio intracelular (Feoktistov y Biaggioni, 1995).

Los receptores A_1 que son de alta afinidad se han encontrado por la expresión del ARN mensajero y su proteína (Zou et al., 1999) en la arteriola aferente, en el glomérulo, en el túbulo proximal y en los túbulos colectores (McCoy et al., 1993; Hansen y Schnermann, 2003a). La unión de la ADO a los receptores A_1 produce vasoconstricción de las células mesangiales (Olivera et al., 1989), de las arteriolas aferentes (Hansen et al., 2003b) y eferentes (Nishiyama et al., 2001) con lo que se regula la filtración glomerular, el flujo sanguíneo renal y el tono vascular en el riñón (Modlinger y Welch, 2003).

De los efectos locales de la ADO vía los receptores A_1 se encuentra la supresión de la secreción de renina (Welshprecht et al., 1990), inhibición de la adenilato ciclasa (Palmer, 1997), activación de canales de potasio, inactivación de canales de calcio tipo N, P y Q, así como activación de la PLC (Shim et al., 2002); esto produce la hidrólisis de fosfolípidos de membrana produciendo diacilglicerol e inositol trifosfato, movilización de calcio intracelular y activación de

proteínas cinasas como C (PKC) (Gerwins y Fredholm, 1995) y de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) (Faure et al., 1994).

Por su parte, los receptores A_{2A} han sido identificados en el riñón mediante la determinación de ARNm en la papila (Weaver y Reppert, 1992), en la vasos rectos descendentes de la médula externa (Kreisberg et al., 1997) y su proteína se encontró en la corteza y en la médula (Zou et al., 1999).

La activación de los receptores A_{2A} produce vasodilatación parcialmente dependiente del endotelio (Hansen y Schnermann, 2003a). En efecto, la ADO incrementa la actividad de la NOS endotelial y la liberación de ON vía A_{2A} (Wyatt et al., 2002), efecto que aumenta la concentración local de compuestos vasodilatadores, por lo que la activación de este receptor puede antagonizar la vasoconstricción inducida por el receptor A_1 . La activación de los receptores A_{2A} produce vasodilatación de las arteriolas aferentes y eferentes (Nishiyama et al., 2001), lo que causa un incremento en el flujo sanguíneo renal y en la filtración glomerular (Levens et al., 1991), por lo que el receptor atenúa indirectamente la reabsorción de sodio (Zou et al., 1999b).

Además de sus efectos hemodinámicos, la adenosina vía este receptor tiene un efecto directo sobre los neutrófilos y las células endoteliales para reducir la inflamación (Cronstein, 1994). Se ha demostrado que la unión de la ADO a los receptores A_{2A} expresados en neutrófilos activados reduce la liberación de especies reactivas de oxígeno como el O_2^- y H_2O_2 (Cronstein, 1994), así como la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales (Bullough et al., 1998). En un modelo de isquemia-reperusión en riñón de rata se demostró que la activación de los receptores A_{2A} disminuyó significativamente la infiltración de neutrófilos y

atenúo la disfunción en el riñón (Okusa et al., 1999), sugiriendo que los efectos antiinflamatorios de la ADO tiene un papel relevante sobre la función renal.

Tabla 1. Características de los receptores A_{2A} y A_{2B} (Fredholm et al. 2001; Jackson et al. 2002).

Receptor	A_{2A}	A_{2B}
Características	- 7 dominios transmembrana - 410 aa. - 45 KDa - alta afinidad	- 7 dominios transmembrana - 328 aa - 62 KDa - baja afinidad
Proteína G	- G_s - $G_{q/11}$ - $G_{12/13}$	- G_s - $G_{12/13}$
Segundos mensajeros	- AMPo - IP_3	- AMPc - IP_3 /DAG (PLC)

Los receptores A_{2B} son expresados abundantemente en la vasos preglomerulares (Jackson et al., 2002). Están presentes en la corteza y en la médula renal (Zou et al., 1999). La activación de estos receptores resulta en relajación de la microcirculación renal (Hansen y Schnermann, 2003a). Además, este receptor inhibe el crecimiento de células mesangiales (Dubey et al., 1997b) y de células vasculares de músculo liso (Dubey et al., 2000), lo que se ha sugerido por la disminución de la síntesis de ADN, de proteínas totales y de la actividad de las MAPK (Dubey et al., 1997; Dubey et al. 2000). Por otra parte, la ADO exógena, vía el receptor A_{2B} , inhibe la síntesis de colágeno, por lo que reduce el depósito de matriz extracelular (Dubey et al. 1989). Todos estos efectos sugieren que la ADO podría jugar un papel importante como agente inhibitorio local, regulando la hipertrofia de células de músculo liso vascular y de células mesangiales en condiciones patológicas.

Los receptores A_3 que son de baja afinidad, han sido poco estudiados, pero se conoce que utilizan GMPc como segundo mensajero para señalizar intracelularmente (Miller y Hoffman, 1994). Estos receptores se han encontrado en vasos preglomerulares (Jackson et al., 2002), en la corteza y la médula renal (Zou et al., 1999). La activación de los receptores A_3 produce apoptosis de células mesangiales glomerulares (Zhao et al., 2002); la exposición de estas células a ADO o IB-MECA (agonista A_3) produce apoptosis, la cual fue inhibida cuando las células se incubaron con MRS1191 (antagonista A_3). La muerte de las células mesangiales fue independiente de cambios en las concentraciones de AMPc, lo que excluye la participación de los receptores A_1 o A_2 . El mecanismo por el cual el receptor A_3 produce apoptosis involucra la activación de PLC, incremento en la expresión de bak (proteína pro-apoptótica) (Kohno et al., 1998), disminución de bcl-2 (proteína anti-apoptótica) así como la activación de la caspasa 3 (Shroyaya et al., 2000). La apoptosis de células mesangiales en nefropatías proliferativas puede ser un mecanismo homeostático que regula la población del mesangio, al remover células no deseadas (Shimizu et al., 1995), y por tanto tiene un efecto benéfico. Sin embargo, en nefropatías no proliferativas, este mecanismo de muerte celular puede estar involucrado en la pérdida de células glomerulares que son reemplazadas por matriz extracelular (Sugiyama et al., 1996), por lo que en este caso, la apoptosis puede tener un efecto deletéreo sobre la función renal.

Como se puede deducir de lo expuesto, tanto la ANGII como la ADO tienen efectos importantes a nivel renal. A este respecto, es relevante el hecho de la existencia de una interacción específica y sinérgica entre la ANGII y la ADO para producir vasoconstricción renal (Oswald et al., 1975; Hall, et al., 1985; Hall y Granger, 1986; Wehprecht et al., 1994), así como que este fenómeno se observe en forma exclusiva en el lecho vascular renal. La especificidad de esta interacción se ha demostrado en arterias carótidas en donde se observó que la infusión de ADO no tiene ningún efecto sobre la vasoconstricción inducida por ANGII (Aki et al., 2002) y en arterias mesentéricas la infusión de ADO atenúa la vasoconstricción inducida por la ANGII (Holtcross y Jackson, 1989). Es bien conocido que en la mayoría de los lechos vasculares la ADO causa vasodilatación al activar a los receptores A_2 , sin embargo, la infusión de ADO en el riñón produce vasoconstricción, al estimular preferencialmente a los receptores A_1 (Wehprecht et al., 1992; McCoy et al., 1993). La relación entre los efectos de la ADO y el SRA ha sido ampliamente estudiada; así, se ha observado que la administración de una dieta alta en sal que disminuye la actividad del SRA también inhibe la vasoconstricción renal inducida por la infusión del nucleótido en la aorta torácica de rata (Oswald et al., 1975). También, se ha demostrado que la infusión de saralasin (antagonista de ANGII) atenúa la respuesta constrictora inducida por la ADO (Spielman y Oswald, 1979). El grupo de Hall et al. (1985), obtuvo resultados similares al reducir la formación de ANGII con un inhibidor de la ECA; observaron una disminución en la respuesta presora renal de la ADO, que se restableció por la infusión intravenosa de ANGII. Estos estudios sugieren que la

vasoconstricción renal mediada por la ADO es dependiente de la actividad del SRA.

Por otra parte, el desarrollo de agonistas y antagonistas específicos para los diversos subtipos de receptores de ADO ha permitido entender con mayor detalle los efectos del nucleósido. Utilizando estos nuevos compuestos se ha encontrado que la caída en la presión glomerular inducida por ciclohexiladenoína (CHA, agonista A_1) es antagonizada por la administración de saralasin (Welhprecht et al., 1994). En este estudio, se demostró en forma adicional, que la disminución de la presión glomerular producida por la infusión peritubular de ANGII en el riñón fue completamente bloqueada por CPX (antagonista A_1). Los resultados sugieren que la unión de la ADO a los A_1 contribuye a potenciar la vasoconstricción producida por la ANGII en la microcirculación renal y que esta respuesta es sinérgica más que aditiva.

El desarrollo de modelos experimentales con supresiones en los genes que codifican para los receptores de ANGII y de ADO, ha permitido evaluar en forma más específica la interacción entre ambas moléculas durante la ausencia de receptores AT_{1A} y de A_1 . En efecto, la vasoconstricción preglomerular inducida por la unión de la ADO al receptor A_1 fue inhibida en ratones deficientes del receptor AT_{1A} (Traynor et al., 1998); en este estudio se infundió CHA a ratones +/- y -/- para el gen del receptor AT_{1A} y se observó que se atenúa la magnitud de la reducción en la presión glomerular inducida por la CHA. Estos resultados apoyan el efecto sinérgico de la ADO y la ANGII sobre las arteriolas aferentes. Evidencias recientes indican que la respuesta vasoconstrictora renal de la ANGII también se encuentra atenuada en ratones knock-out para el receptor A_1 (Hansen et al., 2003c); en este

estudio, se infundió ANGII a estos ratones en forma aguda y se observó que la reducción en el flujo sanguíneo renal y la caída de la filtración glomerular inducida por el péptido se redujo significativamente. Cuando se cuantificó la expresión de los receptores AT₁ por PCR de tiempo real, se encontró que los niveles de ARNm fueron iguales en ratones +/+ y -/- para el gen del receptor A₁, lo que demuestra que la densidad de estos receptores no contribuye en la disminución del efecto de ANGII. Tampoco se observaron cambios en la expresión del ARNm de los receptores A_{2A} y A_{2B}, entre los ratones -/- versus +/+ para el gen del receptor A₁, lo que descarta la participación de los receptores A_{2A}. Se puede concluir que la ausencia del receptor A₁ disminuye la eficiencia de la ANGII para producir constricción de los vasos renales y para reducir la filtración glomerular, lo que apoya el sinergismo que existe entre ambas moléculas.

JUSTIFICACIÓN

La ANGII es un poderoso vasoconstrictor sistémico y renal, sin embargo la magnitud de los efectos del péptido puede ser modulada en forma importante por factores humorales producidos por el tejido renal. La norepinefrina y la adenosina son responsables de la variabilidad de los efectos de la ANGII en la microcirculación renal; al respecto, la vasoconstricción causada por la adenosina depende del nivel intrarrenal de la ANGII. De manera similar, la infusión de ANGII produce una mayor vasoconstricción cuando se infunde simultáneamente con adenosina. La interacción de ambos compuestos vasoactivos probablemente se debe a un componente que es independiente de ambos autacoides. Hasta ahora, el sinergismo entre estos compuestos se ha estudiado farmacológicamente, con la coadministración de antagonistas y agonistas de ANGII y ADO. Sin embargo no se ha profundizado en los posibles mecanismos celulares.

Puesto que la concentración de adenosina es determinante para la activación de los diversos subtipos de receptores del nucleósido, es posible que la ANGII pueda modular alguna de las enzimas del metabolismo de adenosina, modificando su concentración y posiblemente activar en forma preferencial a los receptores que inducen vasoconstricción; por lo anterior se decidió estudiar el efecto de la ANGII sobre las enzimas que participan en forma importante en la producción (5'ND) y degradación (ADA) de adenosina.

HIPÓTESIS

La infusión de ANGII es capaz de modificar la actividad de la 6'ND (síntesis de ADO) y de la ADA (degradación de ADO) en un modelo de infusión temporal de ANGII en riñón de rata.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar si la ANGII modifica la actividad de la 5'ND y/o de la ADA, principales enzimas involucradas en el metabolismo de la ADO en el riñón.

Objetivos particulares:

- Determinar la actividad de la 5'ND en la corteza y médula renal de ratas tratadas con ANGII.
- Determinar la actividad de la ADA en la corteza y médula renal de ratas tratadas con ANGII.

MATERIAL Y MÉTODOS

Infusión de ANGII

Se utilizaron ratas Wistar macho, con un peso de 350-360 g con dieta normal (Harlan Co 0.4% de NaCl) y libre acceso para beber agua. Bajo anestesia general con éter etílico, se efectuó una incisión en el dorso de la rata, donde se colocó una bomba miniosmótica (Alzet modelo 2002, Alza Corp, Palo Alto, CA) en el tejido subcutáneo. Se utilizaron tres grupos de ratas (n=10/ grupo) a las que se les infundieron 436, 280 y 130 ng/kg/min, respectivamente y un grupo de ratas control (n=10). La infusión de ANGII se mantuvo durante 14 días, al final de los cuales se sacrificaron los animales. Esta técnica ha sido previamente validada (Franco et al., 2001).

Determinación de la presión arterial sistólica

Se determinó la presión arterial sistólica mediante pletismografía, en ratas conscientes, que se colocaron en una jaula de restricción. Se colocó un manguito en la cola del animal y se registró el pulso en un fisiógrafo (NARCO BIOSYSTEMS, USA). Esta determinación se realizó en el período basal, a los 7 y a los 14 días después de iniciada la infusión de ANGII.

Cuantificación de proteinuria

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas con agua y comida *ad libitum*. Se recolectó la orina de 24 h en un período basal y a los 14 días de la infusión de

ANGII. La proteinuria se cuantificó por el método de ácido tricloroacético, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Henry et al., 1956). (ANEXO A)

Obtención del tejido renal

En el día 14 después de iniciada la infusión de ANGII, las ratas se anestesiaron con pentobarbital, se expusieron los dos riñones y se extrajeron. Los riñones se colocaron en solución salina fría y fueron disecados en corteza y médula a 4°C. Se hicieron alícuotas de las secciones renales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Determinación de la actividad de la 5'ND

Las secciones renales fueron homogenizadas en amortiguador de fosfatos 160 mM pH 6.8 conteniendo Zwittergent 3-14 al 0.75% (Calbiochem). Los homogenizados fueron sonicados durante 15 s tres veces a 45 W en un procesador ultrasónico (ultrasonics processor). Los lisados de las secciones renales y 2 millunidades (mU) de la enzima pura (Sigma) fueron incubados con Zwittergent 3-14 al 0.75% durante la noche a 4°C, para liberar a la 5'ND de la membrana celular. Se depositaron 6 µg de proteína y la 5'ND fue separada por electroforesis en geles de agarosa (EEO=0) de 0.5 mm (ICN Biomedical Inc) en una cámara horizontal. La electroforesis se efectuó a 20 V/cm durante 2.5 h a 4°C. Posteriormente, el gel fue incubado con una solución amortiguadora de reacción de Tris-maleato (Tris-HCl 50 mM y Maleato 50 mM pH 7) conteniendo 5'AMP 1 mM, nitrato de plomo 2 mM y nitrato de manganeso 50 mM, a 37°C

durante 3 h. Después el gel se lavó tres veces durante 5 min con agua destilada y la actividad de la 5'ND se puso de manifiesto al incubar el gel con sulfuro de sodio al 2%. La reacción produce bandas de color café producto de la actividad enzimática de la 5'ND (Fig. 5). Para valorar la especificidad de la reacción catalizada por la enzima se agregó 5 μ M de α,β -metilenadenosina-5'-difosfato, un inhibidor selectivo de la 5'ND, a la solución amortiguadora de reacción. La intensidad de las bandas de reacción resultantes de la actividad de la enzima se estimó por densitometría óptica (Imaging Densitometer Model GS-670, BIO-RAD) y se compararon con la intensidad de la 5'ND pura depositada en el mismo gel. La concentración de proteínas de los homogenizados renales fue determinada por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) ANEXO B.

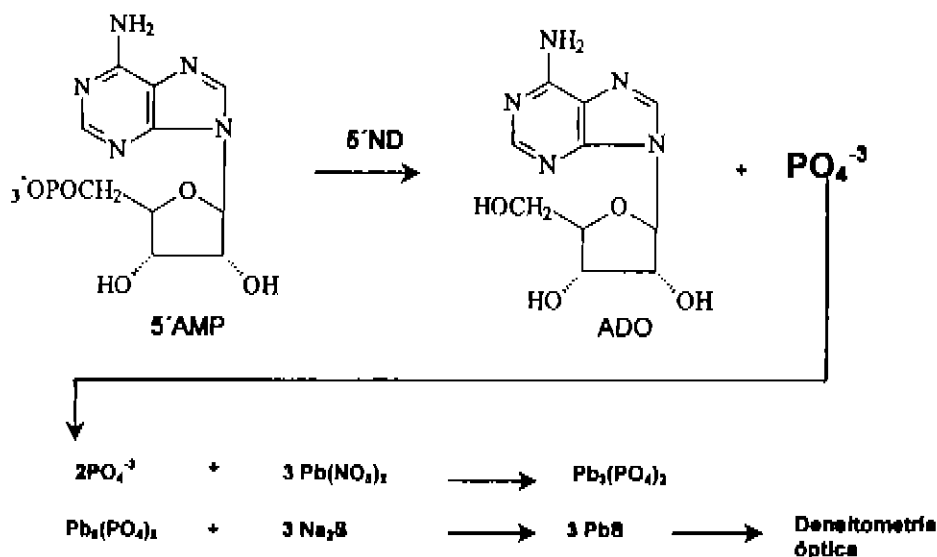


Fig 5. Esquema del método para determinar la actividad de la 5'ND. PO_4^{3-} , ácido fosfórico; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, nitrato de plomo; $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato plúmbico; Na_2S , sulfuro de sodio; PbS , sulfuro de plomo.

Determinación de la actividad de la ADA

Las cortezas y médulas renales fueron homogeneizadas en una solución amortiguadora de Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4). Las muestras fueron sonicadas por 15 s tres veces a 45 W en un procesador ultrasónico (ultrasonic processor) y centrifugadas a 84,000 g por 5 min antes de ser depositadas en el gel. Se depositaron 5 µg de proteína y la ADA presente en los homogenizados, se separó por isoelectroenfoque en geles de 0.5 mm que contenían acrilamida 4.85%, bisacrilamida 0.16%, anfólitos pH 3.6 a 9.5 (BIO-RAD) 2% v/v, sacarosa 300 mM y riboflavina 2 µM. La solución de corrida para el ánodo fue ácido acético 150 mM y para el cátodo etanolamina 160 mM. Se aplicó una corriente de 160 V/cm y la separación se realizó a 4°C por 3 h. Posteriormente, el gel se cubrió con una capa de agar noble al 1% conteniendo como solución revelante: adenosina 1.5 mM, sal de tetrazolium MTT 0.2 mM, fenazina metasulfato 0.3 mM, xantina oxidasa 0.3 U y nucleósido fosforilasa 3 U en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.5 (Fig. 6). El gel se incubó por 2 h a 37°C. La aparición de una banda azul que representa la producción de formazan equivale a la actividad de la ADA (Fig. 7). La especificidad de la reacción catalizada por la ADA fue evaluada al agregar a la capa de agar noble un inhibidor selectivo de la enzima, el eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA). La intensidad de las bandas de reacción producto de la actividad enzimática de la ADA se estimó por densitometría óptica y se comparó con la actividad de 1 mU de ADA pura. La concentración de proteínas de los homogenizados renales se cuantificó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

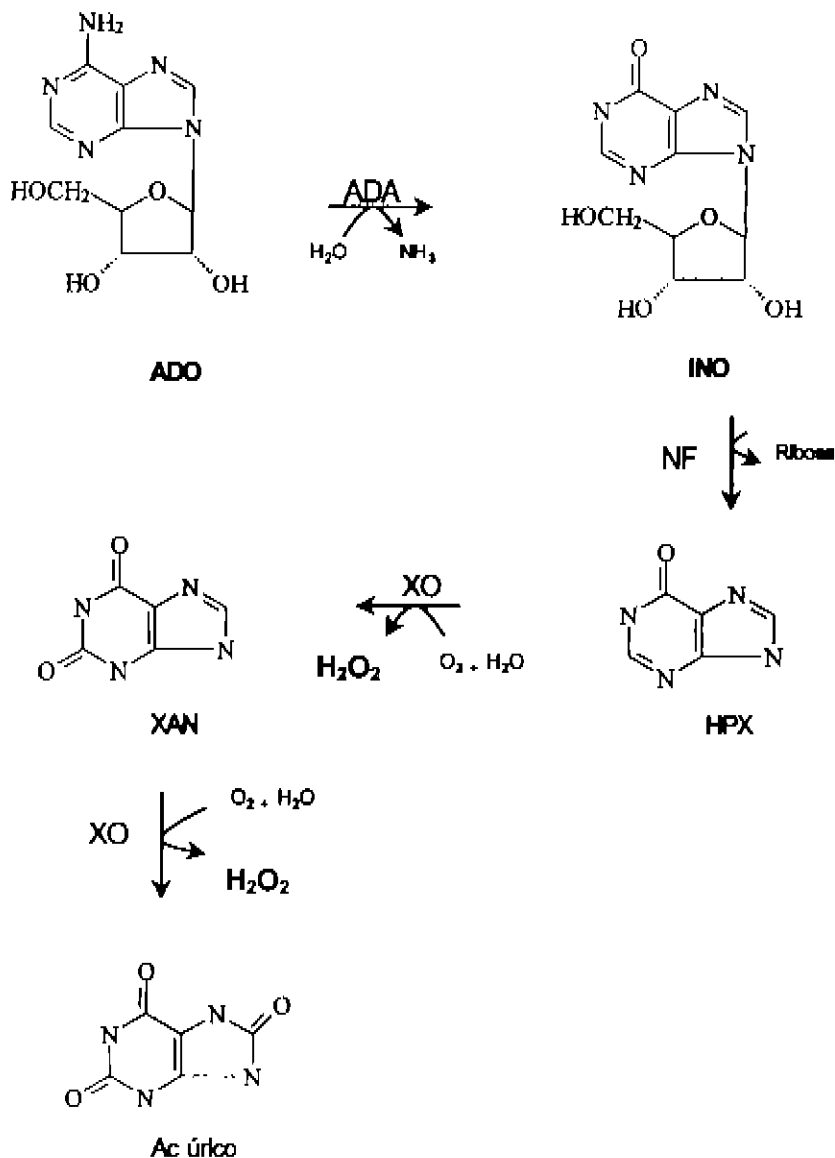


Fig 8. Esquema del metabolismo de ADO. ADA, adenosina desaminasa; INO, inosina; NF, fosforilasa de nucleóido; HPX, hipoxantina; XO, xantina oxidasa; XAN, xantina; H₂O₂, peróxido de hidrógeno.

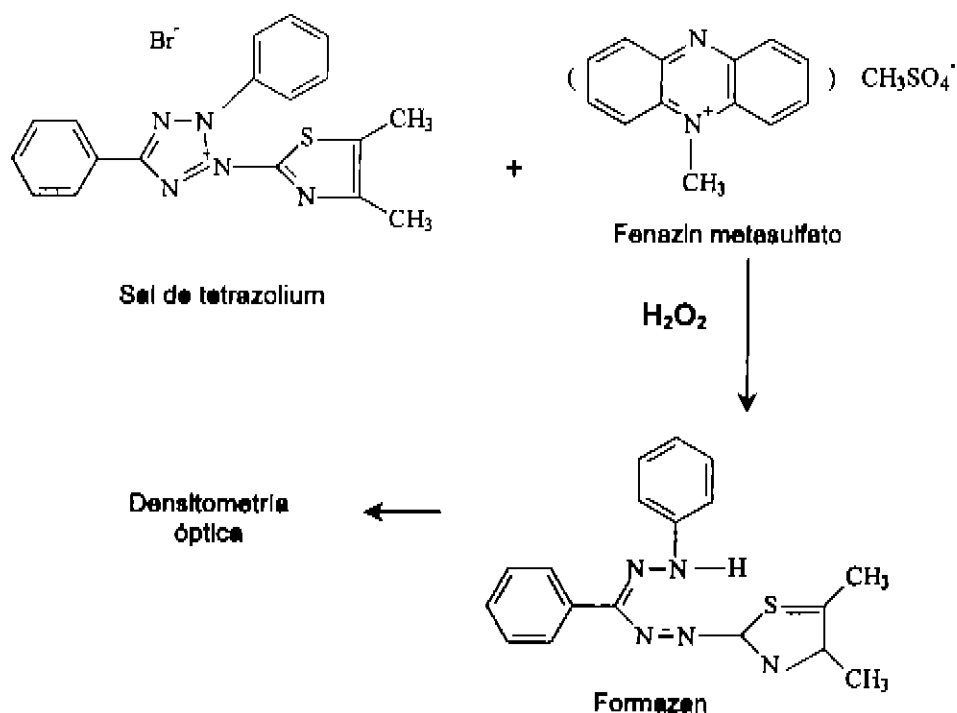


Fig. 7. Esquema de la reacción que produce formazan, compuesto de coloración azul púrpura, cuya aparición es equivalente a la actividad de la ADA y que se cuantifica por densitometría óptica. Como se describió en los métodos, se utilizó sal de tetrazolium MTT la cual se reduce por el fenazin metasulfato (molécula que transfiere electrones del H_2O_2 generado durante la reacción esquematizada en la Fig. 6) para generar la sal insoluble de formazan.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza seguido de la prueba de Bonferroni para determinar la diferencia entre los grupos. Se consideró significativa una $P < 0.05$.

RESULTADOS

Como era de esperarse la infusión de ANGII produjo un incremento significativo de la presión arterial sistólica (anexo C) y a nivel renal, incremento la excreción urinaria de proteínas (anexo D).

Se realizaron curvas de calibración para cada enzima y se valoró la especificidad de la reacción. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de la 5'ND y de la ADA es lineal y específica (anexo E y F).

EFFECTO DE LA ANGII SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA 5'ND

La infusión de ANGII produjo una disminución de la actividad de la 5'ND que fue dependiente de la dosis en la corteza renal como se puede observar en la figura 8a y 8b y se resume en la tabla 2 (anexo G). La actividad de la enzima en la corteza del grupo de ratas control fue de 0.55 ± 0.061 mU/ μ g de proteína. La dosis de ANGII de 435 ng/kg/min causó una disminución significativa del 54.5% (Fig. 8a y 8b). Con la dosis de 260 ng/kg/min de ANGII la actividad de la 5'ND renal disminuyó significativamente un 43.6% (Fig. 8a y 8b). La actividad de la enzima se redujo en un 30.9% en la corteza de las ratas que recibieron 130 ng/kg/min. La especificidad de la reacción catalizada por la 5'ND en las cortezas renales de los grupos se evaluó al incubar a la enzima con α, β -metiladenosina-5'-difosfato y bajo estas condiciones no se detectó actividad (Fig. 8c).

Los efectos de la administración de ANGII sobre la actividad de la 5'ND en la médula renal se resumen en la tabla 2 (anexo G) y se muestran en la Fig. 9a y 9b. La actividad de la 5'ND en el grupo de ratas control fue de 0.27 ± 0.029 mU/ μ g de proteína. La infusión de 435 ng/kg/min de ANGII disminuyó

significativamente la actividad de la 5'ND medular en un 55.8% (Fig. 9a y 9b). La dosis de 280 ng/kg/min a pesar de que causa una disminución del 14.8% (Fig. 9a y 9b) no tiene diferencia con el control. La infusión de 130 ng/kg/min del octapéptido causó una disminución del 7.4% (9a y 9b). Al incubar el gel en presencia de α,β -metilenadenosina-5'-difosfato no se detectó actividad de la 5'ND (Fig. 9c).

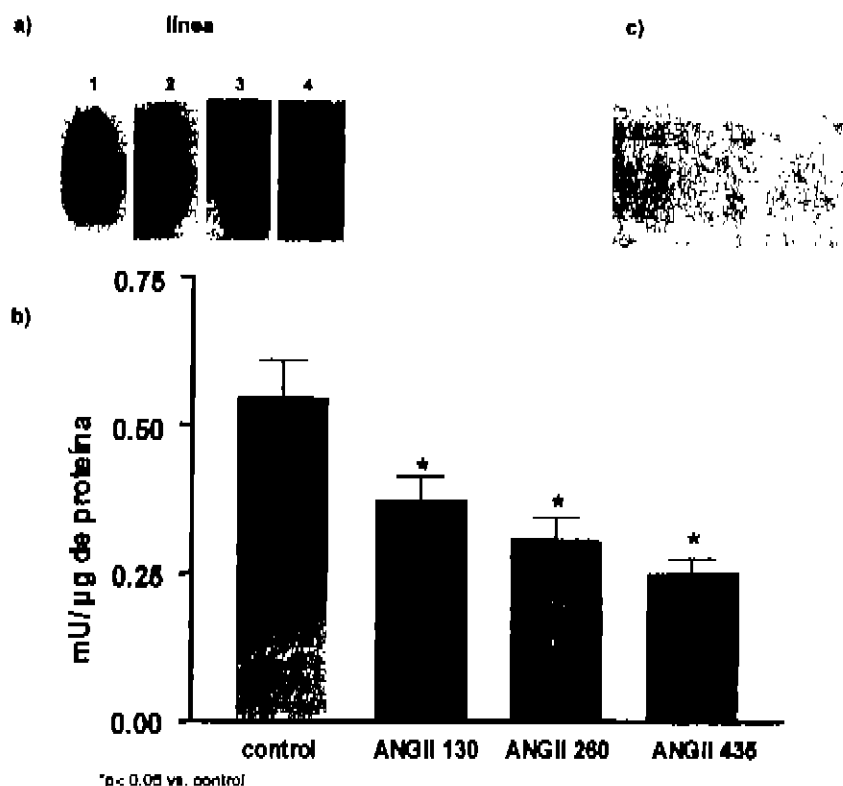


Fig. 8. Efecto de la ANG II sobre la actividad de la 5'ND en la corteza renal. (a) Imagen del gel. Línea 1, control; línea 2, ANGII 130; línea 3, ANG II 280; línea 4, ANGII 435. (b) Representación gráfica del efecto de la ANGII sobre la 5'ND. (c) 5'ND + α,β -metilenadenosina-5'-difosfato. Los datos están presentados como la media \pm EE. *P<0.05 vs. control (n=10).

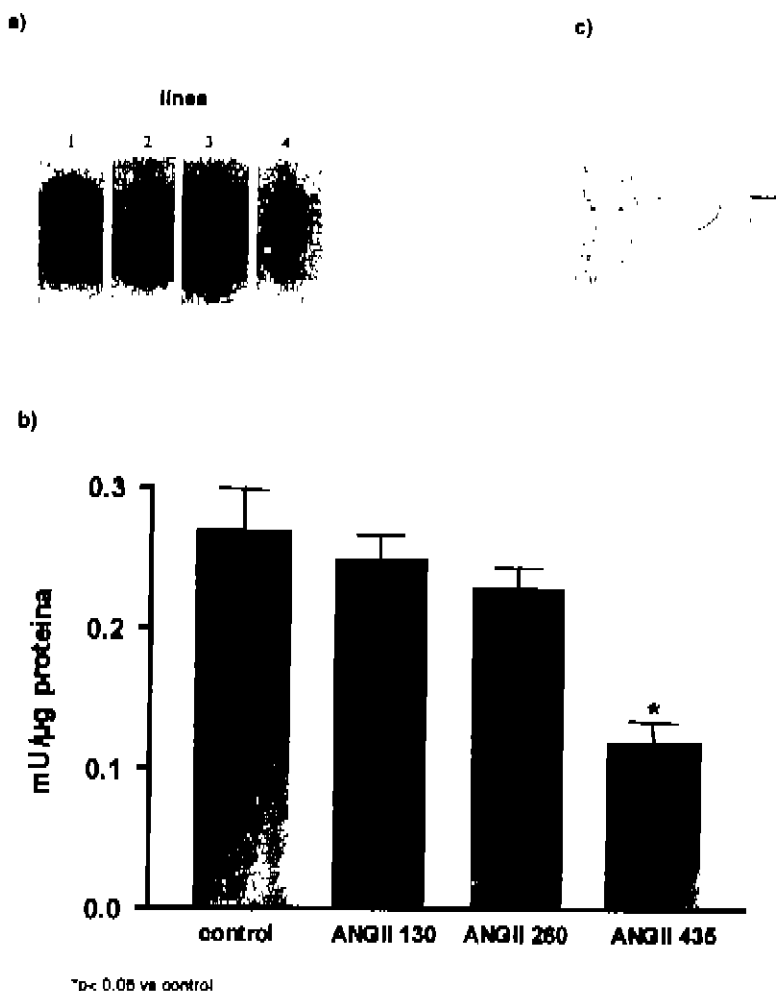


Fig. 9. Efecto de la ANGII sobre la actividad de la 5'ND en la médula renal. (a) Imagen del gel. Línea 1, control; línea 2, ANGII 130; línea 3, ANGII 280; línea 4, ANGII 435. (b) Representación gráfica del efecto de la ANGII sobre 5'ND medular. (c) 5'ND + α , β -metilenadenosina-5'-difosfato. Los datos están presentados como la media \pm EE. *P<0.05 vs. control (n=10).

EFFECTO DE LA ANGI II SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ADA

Los efectos de la infusión de ANGI II sobre la actividad de la ADA en la corteza renal se resumen en la tabla 3 (anexo G) y se pueden observar en las figuras 10a y 10b.

En la corteza del grupo control la actividad de la ADA fue de 0.202 ± 0.007 mU/ μ g de proteína. La infusión de 435 ng/kg/min de ANGI II produjo un incremento del 4.5% en la actividad de la enzima en la corteza renal, efecto que no alcanzó significado estadístico (Fig. 10a y 10b). La dosis de 260 ng/kg/min del péptido aumentó discretamente la actividad renal de la ADA en un 11.4%, incremento no significativo. Y la administración de 130 ng/kg/min de ANGI II incrementó levemente la actividad de la ADA en un 6.9%, resultado que tampoco alcanza significancia estadística. Para evaluar la especificidad de la reacción que cataliza la ADA en las secciones de la corteza renal de los grupos de estudio, se agregó a la mezcla de reacción EHNA, bajo estas condiciones no se detectó actividad (Fig. 10c).

Los efectos de la infusión de ANGI II sobre la actividad de la ADA en la médula renal se resumen en la tabla 3 y se pueden observar en la figura 11a y 11 b. La actividad de la enzima en las médulas control fue de 0.125 ± 0.047 mU/ μ g de proteína. La infusión de 436 ng/kg/min de ANGI II produjo un incremento leve en la actividad de la ADA renal del 6.4%, efecto no significativo (Fig. 11a y 11b). La dosis de 260 ng/kg/min del octapéptido disminuyó en un 1.6% la actividad de la enzima (Fig. 11a y 11b), mientras que la administración de 130 ng/kg/min de ANGI II disminuyó en un 2.4% la actividad de la ADA renal, efecto no significativo (Fig. 11a y 11b). La especificidad de la reacción de la ADA renal de las secciones

medulares se evaluó con EHNA, bajo estas condiciones no se detectó actividad de la enzima .

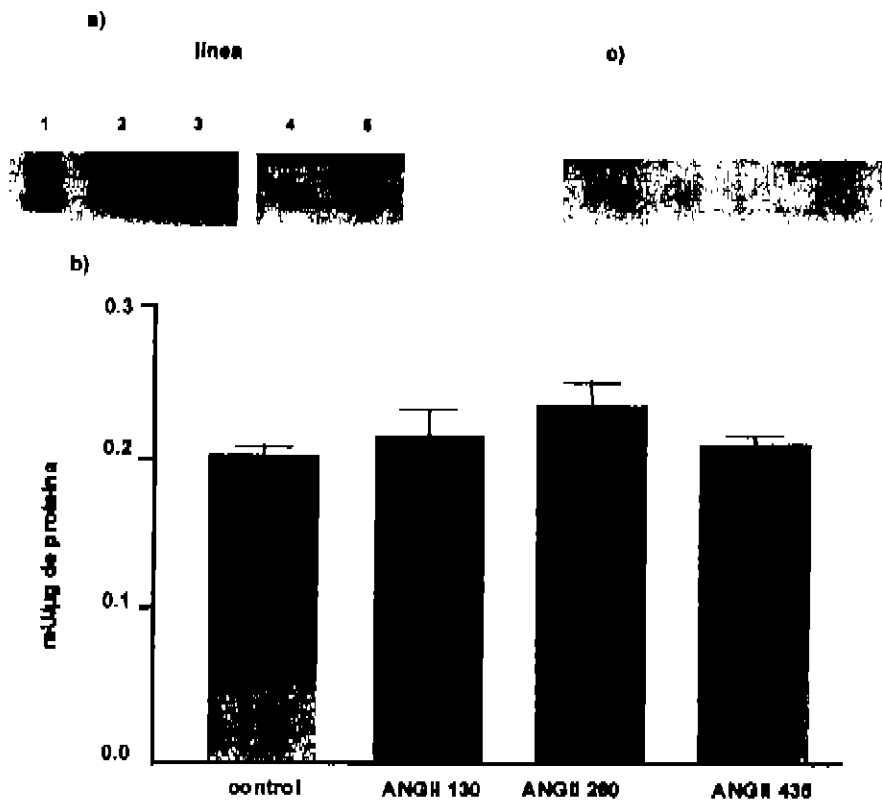


Fig. 10. Efecto de la ANGII sobre la actividad de la ADA en la corteza renal. (a) Fotografía del gel de acrilamida. Línea 1, control; línea 2, ANGII 130; línea 3, ANG II 260; línea 4, ANGII 435; línea 5, ADA pura (1mU). (b) Representación gráfica del efecto de la ANGII sobre ADA en la corteza. (c) ADA + ENHA. Los datos están presentados como la media \pm EE (n=10).

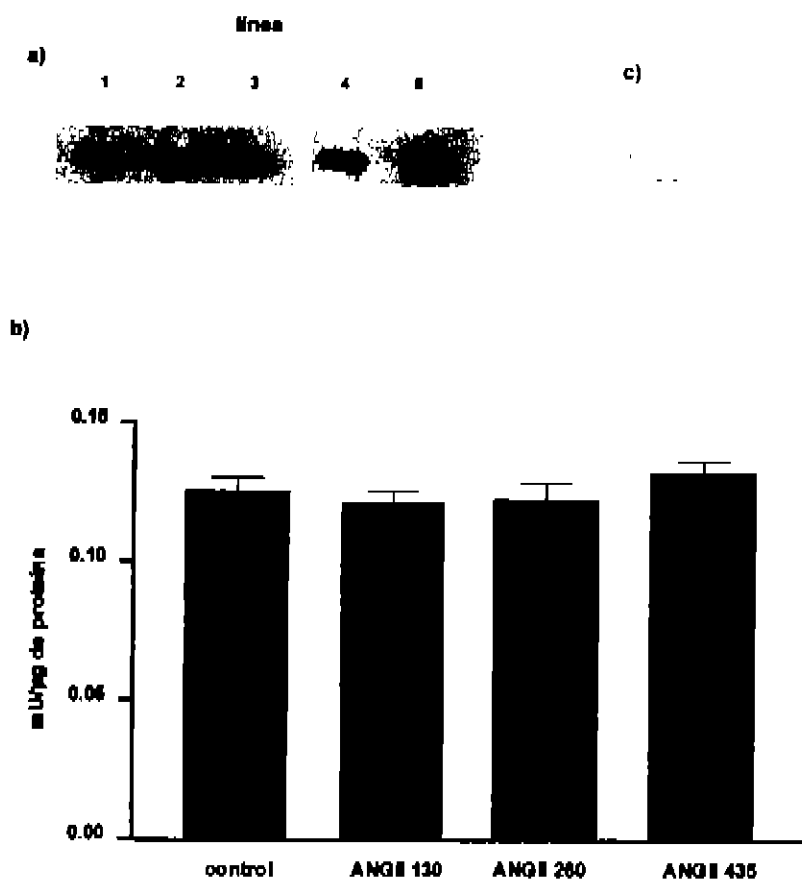


Fig. 11. Efecto de la ANGII sobre la actividad de la ADA en la médula renal. (a) Fotografía del gel de agarosa. Línea 1, control; línea 2, ANGII 130; línea 3, ANGII 260; línea 4, ANGII 435; línea 5, ADA pura (1mU). (b) Representación gráfica del efecto de la ANGII sobre ADA en la médula. (c) ADA + ENHA. Los datos son presentados como la media \pm EE (n=10).

DISCUSIÓN

Como ha sido descrito (Lombardi et al. 1999; Nishiyama et al. 2003) la infusión sostenida de ANGII se caracterizó por elevación significativamente de la presión arterial sistólica y a nivel renal por producción de proteinuria.

Estudios de Nishiyama et al. (2003) han demostrado que a los 14 días de la infusión de ANGII, el péptido se encuentra elevado en el riñón; esto se debe a acumulación de ANGII administrada. Sin embargo, la ANGII endógena se mantiene dentro de valores normales a pesar de una disminución marcada en la secreción de renina, lo que indica una regulación anormal del SRA. La elevada cantidad de ANGII exógena acumulada en el riñón produce una vasoconstricción renal severa que disminuye la filtración glomerular. Por lo anterior, el método empleado en este trabajo es el adecuado para estudiar la interacción entre la ANGII y la adenosina "in vivo".

Para investigar el mecanismo de la interacción entre la ANGII y la ADO, se analizó el efecto de la infusión de ANGII sobre la actividad de la 5'ND y de la ADA que son las principales enzimas involucradas en la producción y degradación del nucleósido en el riñón (Spielman y Arend, 1991). Los resultados del presente estudio demuestran que la infusión de las tres dosis de ANGII disminuyen significativamente la actividad de la 5'ND en la corteza renal y que sólo la dosis de 435 ng/kg/min fue capaz de disminuir la actividad de la enzima en la médula renal. Esto sugiere que la concentración local de adenosina puede disminuir, por lo que se estimularía preferencialmente a los receptores A_1 (alta afinidad). La activación de los receptores A_1 produce constricción del músculo liso vascular; este efecto

podría potenciar la vasoconstricción renal inducida por la ANGII, y explicar el sinérgismo existente entre la ADO y la ANGII sobre el lecho vascular renal.

Se han descrito contenidos renales bajos de ADO en un modelo de hipotiroidismo experimental (Franco et al., 1996). Bajo estas condiciones fisiopatológicas, se observa una marcada vasoconstricción renal, que es revertida al utilizar bloqueadores específicos de los receptores A_1 . Por otra parte, Akl et al. (2002) confirmaron que la infusión intrarenal de ADO incrementa sinérgicamente los efectos vasoconstrictores de la ANGII (Hall y Granger, 1986) y también de la norepinefrina vía el receptor A_1 . Sin embargo, los autores no observaron cambios en las concentraciones intersticiales del nucleósido obtenidas por microdialisis del riñón "in vivo" al administrar de forma aguda ANGII (30 ng) o norepinefrina (500 ng). Por lo anterior, son necesarios estudios adicionales para determinar si la disminución de la actividad de la 5'ND renal inducida por la infusión de ANGII observada en nuestro estudio es suficiente para producir bajos niveles locales de ADO.

Por otra parte, podemos especular una posible explicación para la interacción sinérgica entre la ADO (50 a 200 nM; Weltprecht et al. 1994; Hansen y Schnermann, 2003) y la ANG II puede ser la intercomunicación (cross talk) entre los receptores acoplados a proteínas G triméricas (subunidad α y el dímero $\beta\gamma$) como son los A_1 y los AT_1 (Diokenson y Hill, 1994). La unión de la ADO a los receptores A_1 causa la liberación de la subunidad α_i , la cual inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, produciendo una disminución en los niveles de AMP cíclico; el receptor A_1 también señaliza a través de la PLC (Hansen et al., 2003b). Por su

parte, la ANGII estimula a los receptores AT_1 y activa a la PLC (Alexander et al., 1985); estos efectos incrementan la producción de IP_3 , por lo que las concentraciones de Ca^{2+} intracelular aumentan. En estudios previos, se ha demostrado que la adenosina y la ANGII incrementan los niveles de Ca^{2+} citoplásmico en toda la extensión de la arteriola aferente (Gutierrez et al., 1999). El Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero, capaz de activar el sistema calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CAM), que a su vez activa proteínas cinasas que fosforilan una de las cadenas ligeras de la miosina II. Esta fosforilación produce cambios conformacionales que favorecen la interacción entre la miosina II y los filamentos de actina, produciendo contracción de las células musculares (Alberts et al., 2002); así, la unión simultánea de la ADO y de ANGII a sus receptores A_1 y AT_1 , podría producir el efecto sinérgico que tienen estos compuestos sobre la vasoconstricción renal.

El mecanismo responsable de la disminución en la actividad de la 5'ND renal inducida por la ANGII no se ha estudiado; este trabajo es el primero en reportar este efecto del péptido. Al respecto, se puede sugerir que el mecanismo responsable de este efecto se puede localizar a varios niveles: a) represión de la transcripción del gen, b) degradación del ARNm, c) disminución en la síntesis de la proteína, d) degradación acelerada de la proteína o e) modificaciones postraduccionales. Sin embargo, hasta el momento, no existe ninguna evidencia que demuestre que la ANGII pueda producir alguna alteración en la 5'ND. Sin embargo, existen estudios en los que se demuestra que el óxido nítrico (Siegfried et al., 1998) y el estrés oxidativo (Kocic G et al., 1998) pueden modificar la actividad de la 5'ND. Como se mencionó, la ANGII incrementa la producción de óxido nítrico

y ROS, por lo tanto es posible que la disminución de la actividad de la 5'ND sea debido a estas vías.

A este respecto, las principales características de las enzimas son su alta eficiencia, especificidad, estereoselectividad y su capacidad para ser reguladas. Un punto importante para la regulación de la actividad enzimática son las modificaciones postraduccionales, que producen cambios conformacionales los cuales activan o inactivan proteínas. Entre las modificaciones postraduccionales que sufren las enzimas se pueden mencionar la S-nitrosilación, la oxidación y la fosforilación. Es posible, que alguna de estas vías esté involucrada en la disminución de la actividad de la 5'ND observada en nuestro estudio. Sin embargo antes de estudiar estas posibilidades sería necesario valorar posibles cambios en la cantidad total de la 5'ND por medio de inmunoensayos tipo "western blot".

a) Inhibición de la 5'ND por S-nitrosilación.

Se ha demostrado que la S-nitrosilación de proteínas es un mecanismo postraducciona que implica la transferencia de alguno de los intermediarios del óxido nítrico (ON) como son el ON⁺ o el ON⁻ al grupo tiol de residuos de cisteína y/o metionina y al grupo -OH de los residuos de tirosina. Esta reacción regula la actividad de proteínas nucleares, citosólicas y de las que se encuentran unidas a la membrana celular (Stamler, 1994).

Se ha demostrado que los donadores de ON inhiben la actividad de la 5'nucleotidasa en células epiteliales renales en cultivo y en homogenados de tejido renal; también se ha observado que la sobreproducción *in vivo* de ON durante lesión renal por isquemia/reperfusión produce disminución de la actividad de la enzima, efecto antagonizado con la infusión de L-NAME (Slegfried et al.

1998). Previamente, se demostró que la ANGII fue capaz de estimular la liberación de ON en células de la mácula densa en cultivo vía la nNOS de una manera dosis-dependiente (Liu, Persson, 2004). Estos hallazgos van de acuerdo con las observaciones de Moreno et al. (2002), quienes reportaron que la infusión aguda de ANGII incremento la actividad pero no la expresión de las NOS dependientes de Ca^{2+} en la corteza y médula renal. También observaron que la infusión crónica del péptido incremento la actividad (solo en la corteza) y la expresión de las NOS (eNOS y de nNOS) en la corteza y en la médula renal. Por último, Chin et al. (1999) demostraron que la infusión de ANGII por 13 días incremento la actividad de las NOS dependientes de calcio y produjo sobre-expresión de la eNOS y la nNOS.

Con base en lo anterior, es posible sugerir que la disminución de la 5'ND inducida por la ANGII sea debida, entre otras causas, a un mecanismo de S-nitrosilación.

b) Inhibición de la 5'ND por oxidación.

Como se ha descrito anteriormente, la ANGII incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno. El efecto del estrés oxidativo catalizado por metales de transición como el Fe^{2+} , tiene un papel relevante para la función y estructura de proteínas integrales de la membrana celular (Kocic et al. 2001). A este respecto, se ha descrito que la ecto-5'ND es susceptible a ser modificada por oxidación mediada por ion el Fe^{2+} . Kocic G et al. (1998) evaluaron el efecto de diferentes sistemas de producción de radicales libres ($FeCl_2$ /ascorbato, xantina/xantina oxdasa, H_2O_2). Ellos, observaron que el $FeCl_2$ /ascorbato y el H_2O_2 disminuyó la actividad de la 5'ND en hepatocitos y en el medio extracelular. El

El sistema xantina/xantina oxidasa sólo tuvo efecto sobre la actividad de la 5'ND en hepatocitos; esto sugiere que un probable mecanismo que puede causar modificaciones en la estructura de la enzima y disminución de su actividad podría ser la unión de radicales libres con los iones divalentes contenidos en el sitio catalítico de la enzima (la 5'ND utiliza como cofactores iones divalentes como el Zn^{2+} o el Mn^{2+}) (Kocic et al. 1998). Por otra parte, se ha demostrado que la hiperglicemia, es una condición fisiopatológica en la cual el sistema renina-angiotensina se encuentra activo (Leehey et al. 2000), existiendo altas concentraciones locales de especies reactivas de oxígeno. Con base en esto, Kocic G et al. (2002), evaluaron los efectos de un inhibidor de la ECA (captopril) y de algunos antioxidantes (glutatión y melatonina) sobre la actividad de la 5'ND en células mesangiales en cultivo en condiciones de hiperglicemia. Se observó que bajo estas condiciones, se favorece una reducción en la producción de ADO vía la 5'ND y la disminución de la degradación del nucleótido por la ADA, efectos que fueron revertidos por captopril y por glutatión.

Por lo anterior, es posible sugerir que la disminución de la actividad de la 5'ND renal observada en nuestro trabajo es debida, entre otros efectos, a modificaciones postraduccionales mediadas por estrés oxidativo.

c) Inhibición de la 5'ND por fosforilación.

La fosforilación de enzimas es el mecanismo más utilizado por la célula para regular la actividad de proteínas. La fosforilación es un medio flexible y reversible de regulación que juega un papel central en la transducción de señales. Las proteínas son fosforiladas principalmente sobre residuos de serina/treonina y sobre residuos de tirosina, ocasionalmente en ácido aspártico o histidina. La

respuesta de la proteína después de ser fosforilada es mediada por las propiedades del grupo fosfato, el cual tiene dos cargas negativas a pH neutro. La presencia de cuatro átomos de oxígeno del grupo fosfato favorece la formación de puentes de hidrógeno los cuales pueden unir diferentes partes de la proteína entre sí. Por lo que las interacciones electrostáticas y la formación de enlaces de hidrógeno, producen cambios conformacionales de la proteína, regulando su actividad (Krauss, 2001). Sin embargo no existe evidencia de que la ANGIII produzca fosforilaciones en la 5'ND.

Por otro lado, los resultados de este trabajo demuestran que la actividad de la ADA renal no se modificó ni en la corteza ni en la médula. La disminución de la síntesis de adenosina, en presencia de una degradación normal, sugiere la posibilidad de concentraciones renales bajas del nucleósido, como hemos sugerido en nuestra hipótesis; esto activaría preferencialmente los receptores A_1 responsables de producir vasoconstricción renal. Este efecto peculiar de la ADO puede potenciar el efecto vasoconstrictor de la angiotensina II y explicar el sinérgismo entre ambos compuestos vasoactivos. Para corroborar la hipótesis, este trabajo requiriere de mediciones locales de ADO intrarenales; sin embargo no existe un método adecuado para medir con certeza concentraciones locales de este autacóide.

CONCLUSIÓN

Este es el primer trabajo que demuestra que la Infusión de ANGII reduce significativamente la actividad de la 5'ND en la corteza y la médula renal (sólo la dosis alta) y que no afecta la actividad de la ADA, efecto que probablemente causa disminución de las concentraciones renales de ADO. Las bajas concentraciones del nucleósido activarían preferencialmente a los receptores A₁, que producen vasoconstricción renal. Este efecto peculiar de la ADO puede potenciar el efecto vasoconstrictor de la ANGII, contribuyendo así a explicar el sinergismo entre ambos autacoides.

PERSPECTIVAS.

- Desarrollar un método sensible para determinar las concentraciones de ADO renales en cada uno de nuestros grupos de experimentación.
- Determinar las concentraciones de ARN m y de la proteína para la 5'ND y la ADA en la corteza y la médula renal.

BIBLIOGRAFÍA

- Aki Y, Nishiyama A, Miyakura A, Kimura S, Kohno M, Abe Y, 2002. Role of adenosine A₁ receptor in angiotensin II-and norepinephrine-induced renal vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther* 303:117-123.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002. Cell communication, In *Molecular Biology of the Cell*, edit by Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 4th ed, New York, Garland Science, pp 831-906.
- Alexander RW, Brook TA, Glimbre MA, Rittenhouse SE, 1985. Angiotensin increases inositol triphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* 7:447-451.
- Beckman JS, Koppenol WH, 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.
- Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG, 2001. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2337-H2366.
- Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishnan N, Frank N, Ding G, Singhal PC, 2003. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F955-F965.
- Blron P, Kolw E, Nowaczynski W, 1981. The effects of intravenous infusion of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticoids including aldosterone. *J Clin Invest* 60:338-442
- Border WA, Noble NA, 1998. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31:181-188.
- Bullough DA, Magill MJ, Firestein GS, Mullane KM, 1995. Adenosine activates A₂ receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. *J Immunol* 155:2579-2586.
- Chin S, Pandey K, Shi S, Kobori H, Moreno C, Navar LG, 1999. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANGII-infused hypertensive rats. *Am J Physiol* 277: F797-F804.
- Chua CC, Hamdy RC, Chua BH, 1996. Angiotensin II induces TIMP-1 production in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1311:175-180.

- Cronstein BN, 1994. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 76:5-13.
- Daneer AH, 1996. Local renin-angiotensin system. *Mol Cell Biochem* 167:211-216.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH, 2000. International Union of Pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.
- Dickenson JM, Hill SJ, 1994. Interaction between adenosine A₁- and histamine H₁-receptor. *Int J Biochem* 26:959-969.
- Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Frankl N, Gibbons N, Kasinath BS, Singhal PC, 2002. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F173-F180.
- Dolezal T, 2001. Adenosine Deaminase. Review of physiological roles.
- Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB, 1997a. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:88-105.
- Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK, 1997b. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat glomerular mesangial cells via A_{2B} receptors. *Hypertension* 30: 609.
- Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, 1999. Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 33:190-194.
- Dubey RK, Gillespie DG, Shue H, Jackson EK, 2000. A_{2B} receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35:267-272.
- Dzau VJ, 1989. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens* 7:933-939.
- Egido J, 1996. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 49:576-597, 1996.
- Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR, 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 269:7651-7654.
- Ferrero CM, Chappel MC, Tallant EA, Broenihan KB, Diz DI, 1997. Counter-regulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension* 30:535-541.

- Fockstov I, Blaggioni I, 1995. Adenosine A_{2B} receptor evoke interleukin-8 secretion in human mast cells: an enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* 98:1979-1986.
- Force T, Bonventre JV, 1998. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31:162-161.
- Franco M, Bobadilla NA, Suarez J, Tapia E, Sanchez L, Herrera JA. 1996. Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism. *Am J Physiol* 270:F264-F262.
- Franco M, Tapia E, Santamaria J, Zafra I, Garcia RT, Gordon KL, Pons H, Rodriguez BI, Johnson RJ, Herrera JA, 2001. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt-sensitive hypertension after angiotensin II exposure. *J Am Soc Nephrol* 12:2263-2271.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J, 2001. International Union of Pharmacology: XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-562.
- Gao Z, Chen T, Weber MJ, Linden J, 1999. A_{2B} adenosine and P_2Y_1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells: cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 274:5972-5980.
- Gerwins P, Fredholm BB, 1996. Activation of adenosine A_1 and bradikinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in muscle smooth cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361:186-193.
- Gräfe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Zagrosek VR, Bartach P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E. 1997. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 81:804-811.
- Guijarro C, Egido J, 2001. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59 :416-424.
- Gutierrez AM, Kornfeld M, Persson AE, 1999. Calcium response to adenosine and ATP in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol Scand* 166:176-181.

- Hall J, Granger J, Heater R, 1988. Interactions between adenosine and angiotensin II in controlling glomerular filtration. *Am J Physiol* 248:F340-F348.
- Hall J, Granger JP, 1986. Adenosine alters glomerular filtration control by angiotensin II. *Am J Physiol* 250:F917-F923.
- Hansen PB, Schnermann J, 2003a. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F590-F599.
- Hansen PB, Castrop H, Briggs J, Schnermann J, 2003b. Adenosine induces vasoconstriction through G_i-dependent activation of phospholipase C in isolated perfused afferent arterioles of mice. *J Am Soc Nephrol* 14:2467-2485.
- Hansen PB, Hashimoto S, Briggs J, Schnermann J, 2003c. Attenuated renovascular constrictor responses to angiotensin II in adenosine 1 receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R44-R49.
- Haugen E, Nath KA, 1999. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 17:58-65.
- Haugen EN, Croatt JA, Nath KA, 2000. Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int* 58:144-152.
- Henry RJ, Sobel C, Segalove M, 1956. Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:748-751.
- Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol C, Lluis C, Franco R, 2001. Adenosine A_{2b} receptor behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 59:127-134.
- Hollenberg NK, Fisher DL, Price DA, 1998. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32:387-392.
- Holycross BJ, Jackson EK, 1989. Adenosine-angiotensin II interactions. Part I. Role of adenosine in regulating angiotensin II-induced potentiation of noradrenergic neurotransmission and angiotensin II-induced vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther* 250:433-441.

- Horluchi M, Akshita M, Dzau VJ, 1999. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33:613-21.
- Ishikawa I, Harris RC, 1991. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into old hormone. *Kidney Int* 40:583-586.
- Inagami T, 1995. A memorial to Robert Tiegerstedt. The centennial of rennin discovery. *Hypertension* 32:953-957.
- Jackson EK, Dubey RK, 2001. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F597-F612.
- Jackson EK, Zhu C, Tofovic SP, 2002. Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F41-F51.
- James EA, Galceran JM, Raj L, 1998. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 54:776-784.
- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM, 1992. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19:464-474.
- Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA, 1994. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431-2437.
- Keyer K, Imlay JA, 1998. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13635-13640.
- Kim S, Hwao H, 2000. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal disease. *Pharmacol Rev* 52:11-34.
- Kocic G, Vlahovic P, Pavlovic D, Cvetkovic T, Stojanovic I, 1998. The possible importance of the cation-binding site for the oxidative modification of liver 5' nucleotidase. *Arch Physiol Biochem* 108:91-99.
- Kocic G, Pavlovic D, Jevtic T, Kocic C, Bojic A, Vlahovic P, Djordjevic V, Sokolovic D, Djindjic B, 2001. Oxidative modification of rat liver 5' nucleotidase; the mechanism for protection and re-activation. *Arch Physiol Biochem* 109:323-330.

- Kocic G, Djordjevic V, Vlahovic P, Kocic R, Pavlovic D, Jevtic T, 2002. Antioxidant modulates adenosine metabolism in rat mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Ren Fail* 24: 691-701.
- Kohno Y, Sei Y, Koshiba M, Kim HO, Jacobson KA, 1996. Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A₂ receptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* 219:317-322.
- Krauss G, 2001. The regulation of gene expression and The regulation of enzyme activity, in *Biochemistry of signal transduction and regulation*, edit by Krauss G, 2nd ed, Germany, Wiley-VCH, pp 1-118.
- Knofel T, Strater N, 1999. X-ray structure of periplasmic 5'-nucleotidase from E. Coli containing a dimetal catalytic site. *Nat Struct Biol* 6:448-463.
- Kreissberg MS, Billdorff EP, Polione TL, 1997. Localization of adenosine-receptor subtype mRNA in rat outer medullary descending vasa recta by RT-PCR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272:H1231-H1238.
- Lan HY, 2003. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanism in proximal tubular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:25-29.
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ, 1996. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15069-15074.
- Leehey D, Singh A, Alavi N and Singh R, 2000. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 58:S93-S98.
- Le Hir M, Katsiling B, 1993. Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: Implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol* 264:F377-F387.
- Levens N, Bell M, Jarvis M, 1991. Renal actions on a new adenosine agonist, CGS 21680A selective for A₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 257:1005-1012.
- Liu R, Pearson EG, 2004. Angiotensin II stimulates calcium and nitric oxide release from macula densa cells through AT₁ receptors. *Hypertension* 43:849-853.

- Lloyd HG, Deussen A, Wuppermann H, Schrader J, 1988. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochem J* 252:489-494.
- Locha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC, 2002. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med* 8:830-840.
- Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson R, 1999. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to angiotensin II. *Hypertension* 33:1013-1019.
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mecala LJ, Hayslett JP, 2002. Basolateral and apical A₁ adenosine receptors mediate sodium transport in cultured renal epithelial (A6) cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1216-F1225.
- MacLaughlin M, Martinez CS, Eleno N, Olivera A, Lopez-Novoa JM, 1997. Adenosine activates mesangial cell proliferation. *Cell Signal* 9:69-83.
- McCoy DE, Bhattacharya S, Olson Barbara, Levier DG, Arend LJ, Spielman WS, 1993. The renal adenosine system: Structure, Function and regulation. *Semin Nephrol* 13:31-40.
- Maghji P, Holmquist CA, Newby AC, 1985. Adenosine formation and release from neonatal-rat heart cells in culture. *Biochem J* 229:799-805.
- Mezzano S, Ruiz MO, Egido J, 2001. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38:836-838.
- Miller KJ, Hoffman BJ, 1994. Adenosine A₂ receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem* 269:27351-27358.
- Modlinger PS, Welch WJ, 2003. Adenosine A₁ receptor antagonist and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:497-502.
- Moreno C, Lopez A, Llinas M, Rodriguez, Lopez A, Neva E, Salazar F, 2002. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANGII administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R31-R37.
- Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, Muraoka S, Masaki H, Maruyama K, Tsubumi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Nakajima T, Oda K, Iwasaka T, 1999. Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor- β synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ Res* 84:1073-1084.

- Muraawawa B, Mori Y, Nozawa Y, Gotoh N, Shibuya M, Masaki H, Maruyama K, Tautsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H, 1998. Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ Res* 82:1338-45.
- Nahmias C, Strosberg AD. 1996. The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 16:223-225.
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiohi M, Pratt R Dzaou VJ. 1995. The angiotensin II (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: Gain of function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10663-10667.
- Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB. 2000. Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 58:251-259.
- Nishiyama A, Incho EW, Navar LG. 2001. Interactions of adenosine A₁ and A₂ receptors on renal microvascular reactivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F406-F414.
- Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. 2003. Angiotensin II type1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 21:1897-1903.
- Okusa MD, Linden J, Macdonald, Huang L, 1999. Selective A_{2A} adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am J Physiol* 277:F404-F412.
- Olivera A, Lamas S, Rodríguez D, Lopez-Navoa JM, 1989. Adenosine induces mesangial cell contraction by an A₂-type receptor. *Kidney Int* 35:1300-1305.
- Osswald H, Schmitz HJ, Heidenreich O, 1975. Adenosine response of the rat kidney after saline loading, sodium restriction and hemorrhagia. *Pflugers Arch* 357:323-33.
- Osswald H, Muhlbauer B, Schenk F, 1991. Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: an element of metabolic control of kidney function. *Kidney Int* 39:S128-S131.
- Palmer TM, Stiles GL. 1987. Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation. *Neuropharmacology* 36:1141-1147.

- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Tonlato E, Alessi E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gullino A, Santucci A, 1999. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 100:1646-52.
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M, 2003. Cell Biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83:263-307.
- Ren Y, Arima S, Carretero OA, Ito S, 2002. Possible role of adenosine in macula densa control of glomerular hemodynamics. *Kidney Int* 61:169-176.
- Ruiz MO, Bustos C, Hernández MP, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J, 1998. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 161:430-439.
- Ruiz MO, Lorenzo O, Susuki Y, Ruperez M, Egido J, 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329.
- Ruiz MO, Lorenzo O, Ruperez M, Blanco J, Egido J, 2001b. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol* 158:1743-1756.
- Ruiz MO, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mazzano S, Egido J, 2002. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int* 62: S12-S22.
- Scheuer DA, Ferrone MH, 1993. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* 264:R917-R923.
- Sealey JE, Lough JH, 1990. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis, In *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and Management*, edit by Lough JH, Brenner BM, New York, Raven Press, pp 1287-1317.

- Shim JO, Shin CY, Lee TS, Yang SJ, An JY, Song HJ, Kim TH, Huh IH, Sohn UD, 2002. Signal transduction mechanism via adenosine A₁ receptor in the rat esophageal smooth muscle cells. *Cell Signal* 14:365-372.
- Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamazaki N, 1995. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 47:114-121.
- Shneyvays V, Jacobson KA, Li AH, Newrath H, Zinman T, Isaac A, Shelnberg A, 2000. Induction of apoptosis in rat cardiocytes by A₂ adenosine receptor activation and its suppression by isoproterenol. *Exp Cell Res* 257:111-126.
- Siegfried G, Amiel C, Friedlander G, 1996. Inhibition of ecto-5'-nucleotidase by nitric oxide donors. Implications in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 271:4659-4664.
- Spleiman WS and Osawald H, 1979. Blockade of postocclusive renal vasoconstriction by an angiotensin II antagonist: evidence for an angiotensin-adenosine interaction. *Am J Physiol* 237:F463-F467.
- Spleiman W, Thompson CI, 1982. A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am J Physiol* 242:F423-F435.
- Spleiman WS, Arend LJ, 1991. Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension* 17:117-130.
- Stamler JA, 1994. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.
- Sugiyama H, Kashiwara N, Makino H, Yamazaki Y, Ota A, 1995. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49:103-111.
- Suzuky Y, Ruiz MO, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J, 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881-900.
- Tayeh MA, Scicl AG, 1998. Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture. *Proc Assoc Am Physicians* 110:412-421.

- Touys RM, Schiffrin EL, 2000. Signal transduction mechanism mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:639-672.
- Traynor T, Yang T, Huang YG, Arend L, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP, Schnermann J, 1998. Inhibition of adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT_{1A} receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 275:F922-F927.
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM, 1999. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100:1223-1229.
- Weaver DR, Reppert SM, 1992. Adenosine receptor gene expression in rat kidney. *Am J Physiol* 263:F991-F996.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP, 1990. Effect of adenosine 1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 85:1622-1628.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J, 1992. Vasomotor effects of purinergic agonist in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol* 263:F1028-F1033.
- Weihprecht H, Lorenz J, Briggs P, Schnermann J, 1994. Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol* 266:F227-F239.
- Wolf G, Neilson EG, 1993. Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3:1531-1540.
- Wolf G, Ziyadeh FN, Thales F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA, 1997. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 100:1047-1058.
- Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thales F, 2002. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B through AT_1 and AT_2 receptors. *Kidney Int* 61:1986-1995.
- Wu F, Pin LL, Zou AP, 1999. Microassay of 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activity in microdissected nephron segments. *Anal Biochem* 266:133-139.

- Wyatt AW, Steinert JR, Wheeler-Jones CP, Morgan AJ, Sugden D, Pearson JD, Sobrevia I, Mann GE, 2002. Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. *FASEB J* 16:1584-1594.
- Yu XQ, Wu LL, Huang XR, Yang N, Gilbert RE, Cooper ME, Johnson RJ, Lal KN, Lan HY, 2000. Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: Role of angiotensin II. *Kidney Int* 58:1469-1480.
- Zhao Z, Kapolan T, Shepard M, Lianos EA, 2002. Adenosine-induced apoptosis in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 61:1276-1285.
- Zou AP, Wu P, Li PL, Cowley AW, 1999. Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension* 33:511-515.
- Zou AP, Nithipatikom K, Li PL, Cowley AW, 1999b. Role of renal medullary adenosine in the control of blood flow and sodium excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276:R790-R798.

ANEXO A

Determinación de concentración de proteínas por el método de ácido tricloro acético (TCA).

Soluciones.

- a) Solución salina
- b) Solución de ácido tricloro acético (TCA) al 10%
- c) Estándares de albúmina

Procedimiento.

- 1) Se hace una curva estándar de albúmina. Por duplicado (un tubo es el blanco y el otro es la muestra).

Albúmina (mg/mL)	TCA 10 % (μL)	Volumen final (μL)
0	250	1250
100	250	1250
200	250	1250
300	250	1250
400	250	1250
500	250	1250

- 2) Se realizan las diluciones de las muestras. Por ejemplo 1:20.

Se toman 50 μL de orina + 950 μL de solución salina. Agitar y agregar 250 μL de TCA 10%. Por duplicado

- 3) Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar sólo los blancos a 12,000 RPM por 5 minutos.
- 4) Leer a 420nm

ANEXO B

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Soluciones.

- Solución de carbonato de sodio anhidro 20%
- Solución de tartrato de sodio/potasio 1g + sulfato de cobre 0.5g en 250mL de agua
- Solución de hidróxido de sodio 0.8N
- Solución de SDS 10%
- Solución de albúmina (1mg/mL) como estándar.

Procedimiento

1) Mezclar:

1 volumen de la solución de carbonato de sodio.

1 volumen de la solución de tartrato de sodio/potasio.

2 volúmenes de hidróxido de sodio.

2 volúmenes de SDS.

2 volúmenes de agua.

Solución A

2) Hacer una curva estándar con albúmina.

Albúmina (μ L)	0	10	20	40	80	100
Agua (μ L)	100	90	80	60	20	0

3) Hacer las diluciones de la muestra.

4) Agregar 1mL de la solución A por tubo e incubar 10 minutos protegido de la luz.

5) Agregar 500 μ L de reactivo de Folin 1:8 e incubar por 30 minutos protegido de la luz.

Leer a 750nm.

ANEXO C

Efecto de la ANGII sobre la presión arterial sistólica (TAS).

Como se esperaba, las tres dosis de ANGII elevaron significativamente la presión arterial sistólica. La dosis de 435 ng/kg/min causó un incremento significativo de 64% a los 7 días y de 68.2% a los 14 días (Fig. 12). La administración de 260 ng/kg/min del péptido resultó en un aumento del 55.5% y del 63.6% a los 7 y 14 días, respectivamente (Fig. 12). La infusión de 130 ng/kg/min incremento la TAS en un 38.6% a los 7 días y del 41.4% a los catorce días (Fig.12).

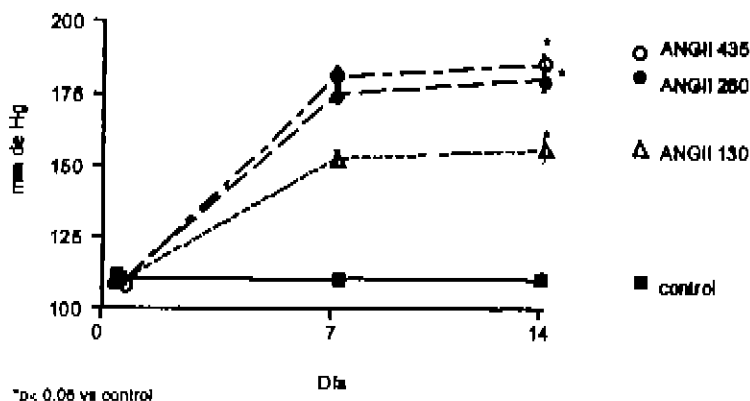


Fig. 12. Efectos sistémicos de la ANGII. Las tres dosis de ANGII infundida produjo hipertensión arterial. Los datos son presentados como la media \pm EE. *P < 0.05 vs. control (n=10).

ANEXO D

Efecto de la ANGII sobre la proteinuria.

La ANGII produjo proteinuria como se observa en la figura 13. La Infusión de 435 ng/kg/min de ANGII produjo un incremento severo en la excreción de proteínas urinaria de aproximadamente 12 veces más que las ratas control (Fig. 13). La dosis de 280 ng/kg/min aumentó 7 veces la proteinuria en comparación con el control (Fig. 13). La administración de 130 ng/kg/min incrementó 2 veces la excreción de proteínas en la orina de 24 h (Fig. 13).

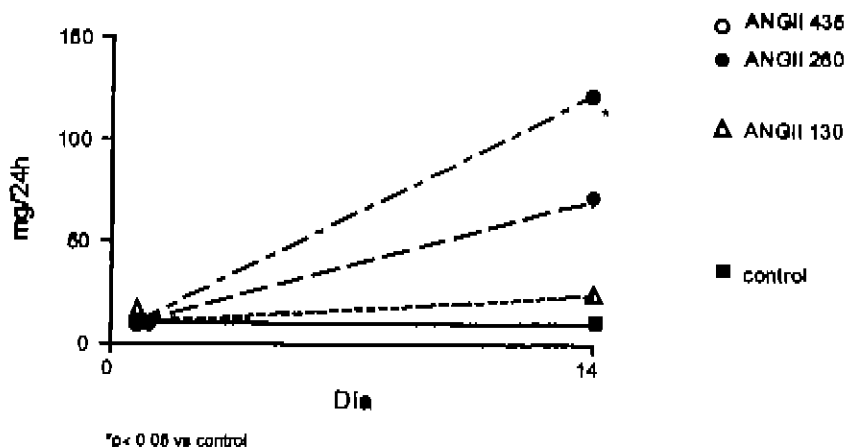


Fig. 13. Efectos renales de la ANGII manifestados por la excreción de proteínas en la orina recolectada durante 24 h a los 14 días de la infusión del péptido. Los datos son presentados como la media \pm EE. $P < 0.05$ vs. control (n=10).

ANEXO E

Curva de calibración para la actividad de la 5' ND.

Se efectuó una curva de calibración con 5'ND pura con concentraciones crecientes de la enzima de 1 a 8 mU. La enzima se separó por electroforesis en geles de agarosa bajo condiciones no desnaturalizantes como se describió en la sección de material y métodos. La densidad óptica de la actividad enzimática de la 5'ND aumentó de manera dependiente de su concentración (Fig. 14a y 14b). Para determinar la especificidad de la reacción catalizada por la enzima, la 5'ND se incubó con α,β -metilenadenosina-5'-difosfato, un inhibidor selectivo. En estas condiciones no se detectó actividad enzimática (Fig. 14c).

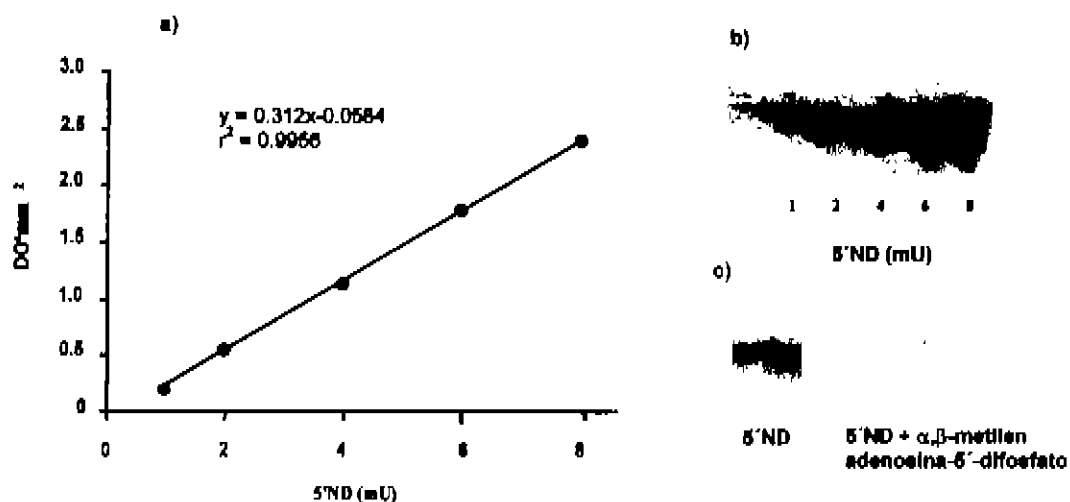


Fig. 14. Curva de calibración de la 5'ND. (a) Los puntos muestran la correlación entre la concentración de la enzima purificada vs. la densidad óptica por milímetro cuadrado ($DO^2 \text{ mm}^{-2}$) de las bandas de reacción específicas de la 5'ND. (b) Fotografía que muestra la actividad enzimática de la 5'ND. (c) 5'ND + α,β -metilenadenosina-5'-difosfato.

ANEXO F

Curva de calibración para la actividad de la ADA

Se realizó una curva de calibración con ADA comercial con concentraciones crecientes de la enzima de 0.5 a 2.0 mU. La enzima fue separada por electroforesis como se detalló en la sección de material y métodos. La densidad óptica de la actividad de la enzima aumentó de manera dependiente de su concentración (Fig. 15a y 15b). Para determinar la especificidad de la reacción, la enzima se incubó con EHNA, un inhibidor selectivo de la enzima. Bajo estas condiciones no se detectó actividad de la ADA (Fig 15c).

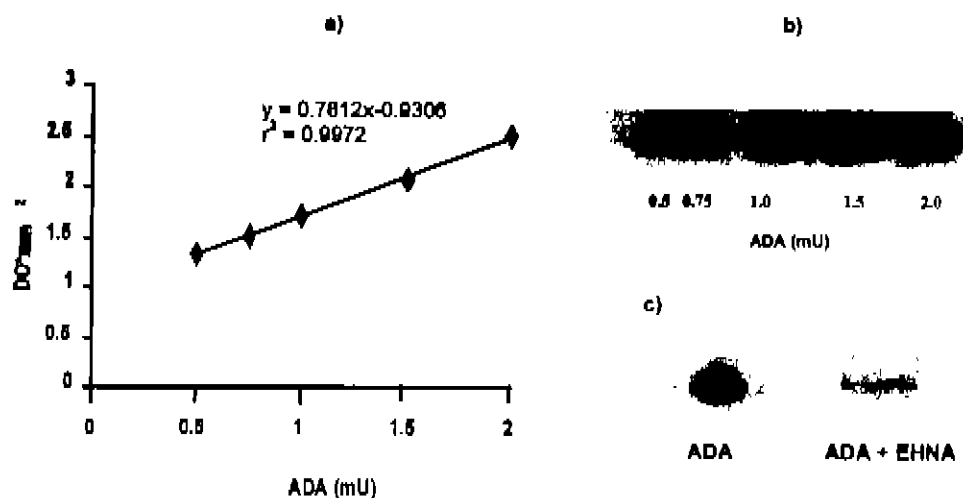


Fig. 15. Curva de calibración de la ADA. (a) Los puntos muestran la correlación entre la concentración de la enzima purificada vs. la densidad óptica por milímetro cuadrado ($DO \times mm^2$) de las bandas de reacción específicas de la ADA. (b) Fotografía que muestra la actividad enzimática de la ADA. (c) ADA + EHNA.

ANEXO G

Efecto de la infusión de ANGII sobre las enzimas del metabolismo de ADO

Tabla 2. Efectos de la ANGII sobre la actividad de la 5'ND renal.

Sección renal	Control mU/ μ g proteína	ANGII 130 mU/ μ g proteína	ANGII 260 mU/ μ g proteína	ANGII 435 mU/ μ g proteína
Corteza	0.55 \pm 0.061	0.36 \pm 0.036*	0.31 \pm 0.037*	0.25 \pm 0.026*
Médula	0.27 \pm 0.029	0.25 \pm 0.017	0.23 \pm 0.014	0.12 \pm 0.014*

Los datos son presentados como la media \pm EE. P < 0.05 vs. control (n=10).

Tabla 3. Efectos de la ANGII sobre la actividad de la ADA renal.

Sección renal	Control mU/ μ g de tejido	ANGII 130 mU/ μ g de tejido	ANGII 260 mU/ μ g de tejido	ANGII 435 mU/ μ g de tejido
Corteza	0.202 \pm 0.007	0.215 \pm 0.169	0.226 \pm 0.1285	0.211 \pm 0.047
Médula	0.125 \pm 0.047	0.122 \pm 0.040	0.123 \pm 0.058	0.133 \pm 0.039

Los datos son mostrados como la media \pm EE.