

Papel de la angiotensina 1-7 y el estrés oxidativo en la nefropatía diabética experimental

Role of angiotensin 1-7 and oxidative stress in experimental diabetic nephropathy

Carlos Ciangherotti y Anita Israel*

*Unidad de Neuropeptidos y Unidad de Cultivo Celular. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Email: carlosciangherotti@yahoo.com y *astern88@gmail.com

Recibido: 20/05/2012

Aceptado: 20/08/2012

Resumen

La angiotensina 1-7 (ANG-1-7) es un péptido pleiotrópico del sistema renina-angiotensina, la cual ejerce un efecto contraregulatorio sobre las acciones de la angiotensina II (ANG II). La ANG-1-7 reduce algunos marcadores observados en la nefropatía diabética; sin embargo, su papel sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en el daño renal aun es elusivo. Se evaluó la posible participación de las enzimas antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), sobre la acción renoprotectora de la ANG-1-7 y de su receptor Mas (R-Mas). Se emplearon secciones de corteza renal proveniente de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina, incubadas *in vitro* en presencia o ausencia de agonistas y antagonistas. Adicionalmente, en células de epitelio renal de mono en cultivo (Vero) se evaluó el efecto de la ANG-1-7 (10^{-6} M) y de A-779 (10^{-5} M) sobre la viabilidad celular, en un ambiente de glucosa normal (NG, 8 mM) y de alta glucosa (HG, 35 mM). Los resultados demuestran que HG ejerce un efecto citotóxico significativo sobre las células epiteliales en cultivo, el cual fue inhibido la ANG-1-7. Aun mas, en las células Vero la alta concentración de peróxido de hidrógeno fue citotóxica, y este efecto también fue prevenido por la ANG-1-7. La actividad de la CAT y la SOD estuvo reducida significativamente, tanto en las secciones de corteza renal provenientes de ratas diabéticas, así como en las células Vero en cultivo incubadas en HG. Este efecto fue revertido por ANG-1-7. La A-779 fue capaz de bloquear los efectos nefroprotectores de la ANG-1-7, indicando que su acción es mediada a través de la estimulación del R-Mas. Nuestros hallazgos indican que la ANG-1-7 actúa como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro*, y demuestra la contribución de las enzimas antioxidantes en el efecto de la ANG-1-7 sobre el daño renal en la nefropatía diabética.

Palabras clave: Angiotensina 1-7; catalasa, superóxido dismutasa, nefropatía diabética.

Abstract

Angiotensin 1-7 (ANG-1-7) is a pleiotropic peptide of the renin-angiotensin system, which plays a contraregulatory effect on angiotensin II (ANG II) actions. ANG-1-7 reduces some markers of diabetic nephropathy. However, its role on reactive oxygen species in kidney damage is still elusive. Therefore, we assessed the possible involvement of the antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), on the renoprotective action of ANG-1-7 and its receptor. We used kidney cortex sections obtained from rats with streptozotocin-induced diabetes which were incubated *in vitro* in the presence or absence of agonists and antagonists. Furthermore, in monkey renal epithelial cells in culture (Vero), we assessed the effect of ANG-1-7 (10^{-6} M) and the Mas receptor antagonist (A-779, 10^{-5} M) on cell viability, in the presence of normal glucose (8 mM) or high glucose (35 mM) concentration. The results show that high glucose concentration exerts a significant cytotoxic effect on renal epithelial cells in culture, which was inhibited by ANG-1-7 treatment. Moreover, high concentrations of hydrogen peroxide in Vero cells culture was cytotoxic, and this effect was also prevented by ANG -1-7 treatment. This indicates that ANG-1-7 exerts a protective effect on renal damage under diabetic conditions. The activity of CAT and SOD was significantly reduced in both, tissues obtained from renal cortex from rats with experimental diabetes incubated *in vitro*, as well as in Vero cell culture incubated in high glucose. This effect was blunted by ANG-1-7 treatment. The renoprotective effects of ANG -1-7 were inhibited by the A-779, indicating that this action is mediated through stimulation of R-Mas. Our findings demonstrate that ANG-1-7 exerts an antioxidant protective effect on renal damage in diabetes, both *in vivo* and *in vitro*, and points to the contribution of antioxidant enzymes in the effect of ANG-1-7 in diabetic nephropathy.

Key words: Angiotensin 1-7; catalase, superoxide dismutase, diabetic nephropathy.

Introducción

La nefropatía es considerada como una de las complicaciones más importantes de la diabetes mellitus, siendo la principal causa de insuficiencia renal terminal¹. El riñón al igual que la mayoría de órganos afectados por la hiperglicemia, sufre daño celular mediado por diferentes moléculas, entre las que se encuentran: los polioles, las hexosaminas, los productos de glicosilación avanzada (AGEs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Ej.: las ERK), la angiotensina II (ANG II), la proteína quinasa C (PKC), el diacilglicerol (DAG), las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la janus quinasa (JAK), entre otros mediadores^{2,3}. La activación de estas moléculas, trae como consecuencia la alteración de la expresión de algunas proteínas que conducen al incremento de la matriz extracelular y al ensanchamiento de la membrana basal glomerular. Esto se traduce en cambios de la estructura renal, fibrosis, hiperfiltración, cambios hemodinámicos y proteinuria, las cuales son alteraciones características de la nefropatía diabética^{3,4}.

Un evento que contribuye en la nefropatía diabética al establecimiento del estrés oxidativo y por ende el incremento de las ROS, radica en la disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas. En efecto, en pacientes con nefropatía diabética se ha observado la inhibición de la expresión de algunas de estas enzimas, tales como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), favoreciéndose así el desbalance oxidativo celular⁵. Asimismo, algunos modelos de animales diabéticos que sobreexpresan la CAT o la SOD, presentan una significativa disminución del daño renal^{6,7} y de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en las células renales en cultivo⁸.

La angiotensina 1-7 (ANG-1-7), es un péptido considerado como el componente activo más pleiotrópico del sistema renina-angiotensina (SRA). Este péptido despierta gran interés debido a su acción contraregulatoria sobre los efectos de la ANG II⁹, su efecto antifibrótico y antiproliferativo^{10,11} y su acción inhibitoria sobre la generación de las ROS en diversos modelos experimentales^{12,13}. La ANG-1-7, su enzima biosintética la ECA2, y su receptor Mas (R-Mas), exhiben acciones protectoras en diferentes modelos de enfermedades cardiometabólicas^{14,15}. A nivel renal la ANG-1-7 presenta niveles comparables a la ANG II. La acción de la ANG-1-7 sobre la función renal ha sido conflictiva, en donde la modulación de la excreción de agua y Na⁺ es el punto central de la acción de este pép-

tido, observándose una actividad diurética/natriurética¹⁶ y en otros casos una acción antidiurética/natriurética^{9,17}.

Existe evidencia que indica que la ANG-1-7 reduce la producción de ROS estimulada por la ANG II en modelos *in vitro*, en donde la reducción de la actividad de la NAD(P)H oxidasa está íntimamente involucrada^{12,13}, así como también la reducción de algunos marcadores de la nefropatía diabética, tales como: la proteinuria, la fosforilación de las MAPK y la expresión de proteínas de la matriz extracelular inducida por glucosa en células renales *in vitro*. En ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (STZ)^{18,19} o en ratas diabéticas e hipertensas²⁰, el tratamiento con este péptido disminuye la proteinuria, suprime el incremento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa renal y reduce los niveles elevados de expresión del gen de la NOX-4 (20). Esto sugiere un posible papel contraregulatorio de la ANG-1-7 sobre la NAD(P)H oxidasa estimulada por la ANG II, como posible mecanismo en la nefroprotección. Aun más, se ha demostrado una vinculación entre el eje ANG-1-7/R-Mas y la maquinaria enzimática antioxidante, al demostrarse que en ratones que no expresan el R-Mas se produce fibrosis cardíaca debido a un aumento de colágeno y fibronectina⁹, desarrollo de disfunción endotelial acompañada de una disminución de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y de la generación de óxido nítrico (NO), así como de un decremento de la actividad de la CAT y la SOD²¹. Sin embargo, no está claro aun el papel de la ANG-1-7 en el estrés oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes renales en la diabetes, por lo que en el presente estudio se evaluó la posible participación de las enzimas antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), sobre la acción renoprotectora de la ANG-1-7 y de su receptor, en secciones de corteza renal proveniente de ratas diabéticas inducida por la estreptozotocina e incubadas *in vitro* o en células epiteliales renales en cultivo.

Materiales y metodos

Para los experimentos de cultivo celular se emplearon células Vero, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*cercopithecus aethiops*), provenientes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa.

Las células fueron cultivadas hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C en medio completo que contiene: DMEM, 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomycin. Luego se lavaron 2 veces con PBS (amortiguador de fosfato de sodio) y se disgregaron

con tripsina al 10% en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2200 rpm. El sedimento se trató con PBS para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar los ensayos correspondientes.

Determinación de la proliferación celular

Se empleó el método de exclusión con azul de tripano, a través del conteo diario de las células vivas por microscopía. El azul de tripano es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas de las células viables. De esta manera, se cultivaron 10000 células por placa individual en condiciones de glucosa normal (8 mM) o alta glucosa (35 mM) y tratadas o no con ANG-1-7. Las células se tripsinizaron y se contaron por grupo a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de tratamiento. Los resultados se expresaron como células/mL.

Glucotoxicidad

Para evaluar los efectos de la ANG-1-7 sobre la citotoxicidad inducida por alta concentración de glucosa, se cuantificó la formación de púrpura de formazan a partir de una sal de tetrazolio, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), en donde esta sal es reducida por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Para ello, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ a 37°C), bajo un ambiente de 8 mM de glucosa durante 24 horas. El medio fue removido y reemplazado por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles, 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa (HG), 35 mM de glucosa; pozos ANG-1-7 (10⁻⁶ M) y pozos HG + ANG-1-7. En otro experimento se empleo como agente citotóxico el H₂O₂ (10⁻⁴M). Bajo estas condiciones las células fueron cultivadas (5% CO₂ a 37°C) durante 72 horas, reemplazando con medio nuevo sobre el mismo esquema cada 24 horas. Al término de este tiempo el medio fue nuevamente reemplazado, pero solo con medio completo. Se preparó una solución de MTT (2,5 mg/mL) y se añadió 100 mL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3h (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa fue disuelta con la incorporación de 100 mL de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que desarrolle el color y luego se leyó en un lector de ELISA a 570 nm. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

Actividad de las enzimas antioxidantes en una línea de células de epitelio renal bajo un ambiente alto en glucosa

Se incubaron 2 millones de células en una placa de cultivo de 150 cm² con medio completo (5% CO₂ a 37°C) durante 120 horas (cambiando el medio cada 24 horas), utilizando el mismo protocolo de tratamientos del ensa-

yo de glucotoxicidad. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina al 10% en EDTA a 37°C por 5 minutos. Una vez tripsinizadas, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y resuspendidas para un volumen final de 500 mL para realizar los ensayos de las enzimas antioxidantes.

Actividad catalasa (CAT) y superóxido dismutasa total (SOD) en secciones de corteza renal provenientes de ratas control o con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) e incubada *in vitro*.

Se utilizaron ratas machos de la cepa *Sprague-Dawley* de peso corporal comprendido entre 200 y 300 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) con ciclos de 12 horas luz / oscuridad, con acceso a alimento (Ratarina®) y agua *ad libitum*. La diabetes tipo 1 fue inducida por la inyección intraperitoneal (i.p.) de 70 mg/kg de ETZ a las ratas. La glucosa sanguínea de los animales fue monitoreada hasta que los niveles de glicemia alcanzaron niveles de ≥ 250 mg/dL empleando un glucómetro comercial. En este momento los animales fueron considerados diabéticos. Inmediatamente, las ratas fueron eutanizadas por decapitación, los riñones fueron extraídos y la corteza renal se disecó mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en Buffer Krebs-Ringer (KBR). Posteriormente cada tejido fue preincubado a 37°C en presencia o ausencia del antagonista (A-779) y posterior estimulación con agonista (ANG-1-7). Seguidamente, las muestras fueron retiradas del baño a 37°C, se retiró el medio de incubación, y se lavó el tejido dos veces con buffer fosfato pH 7,0, y se colocó en hielo. Posteriormente, se añadieron 300 µL de buffer de lisis (Tris Base 50 mM, 5mM EDTA, 1mM NaF, Na₃VO₄, Tritón X-100 1% y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5µM, aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µM, PMSF 2mM, pH 7,4). Se sonicó y centrifugó la preparación para obtener el homogeneizado de la corteza renal para la determinación posterior de la actividad enzimática.

Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV.

DETERMINACION DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La actividad se determinó en el homogenato de secciones de corteza renal o en las células en cultivo diluidas 1:10 en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0) con tritón X-100 al 1%. Después de centrifugar a 13000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se empleó en la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

Ensayo de la Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

La actividad de la CAT fue determinada en el homogeneizado del tejido de interés diluido en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), al cual se le añadió 725 µL de la mezcla de incubación (7,7 mM H₂O₂ en buffer fosfato 10 mM a pH 7) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT ($k = (1/t) (2,3 \times \log A_1/A_2)$), donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

Ensayo de la Actividad de la Superóxido Dismutasa Total (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) a formazán a 595 nm, por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa. Para ello, se mezclaron 166 µL de la mezcla de incubación (xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6 µM, albúmina 0,006% y bicarbonato de sodio 49 mM) con 33 µL del homogeneizado del tejido de interés. Se colocaron 2,45 mL de la mezcla en tubos y se mantuvo a 27 °C. Se adicionaron 500 µL de muestra, diluida 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7) e inmediatamente después, se inició la reacción con la adición de 50 µL de xantina oxidasa (8,4 unidades). Los tubos se incubaron durante 30 minutos, seguidos de la adición de 66 µL CuCl₂ 2H₂O 0,8 mM que detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como actividad específica. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media (X ± E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados con valores de p<0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

Curso temporal del efecto de la ANG-1-7 sobre la proliferación celular

Se evaluó la proliferación de las células Vero mediante un método de exclusión por azul de tripano. Como se observa en la figura 1, la condición de alta concentración de glucosa disminuyó significativamente la proliferación

celular a partir de las 72 horas; efecto que fue revertido por el tratamiento con la ANG-1-7, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Por sí misma, la ANG-1-7 produjo un efecto proliferativo similar al del grupo NG a las 96 y 120 horas de experimentación.

Efectos de la ANG-1-7 y del antagonista del receptor R-Mas sobre el daño inducido por alta concentración de glucosa en células de epitelio renal (Vero) en cultivo

El tratamiento diario, durante 96 horas, de las células de epitelio renal en cultivo con medio que contenía una alta concentración de glucosa (grupo HG, 35 mM), produjo un efecto citotóxico significativo (p<0,001) en comparación con el grupo NG (8 mM de glucosa). Este efecto fue parcialmente abolido por el tratamiento con ANG-1-7. El antagonista del R-Mas, A779 (10⁻⁵ M), fue capaz de bloquear el efecto protector de la ANG 1-7 sobre la glucotoxicidad inducida por la HG (Figura 2).

Efecto de la ANG-1-7 frente a la citotoxicidad inducida por el estrés oxidativo inducido por el H₂O₂

En la figura 3 se observa la modulación del inductor del estrés oxidativo, el H₂O₂, y el efecto protector de la ANG-1-7 sobre la disminución de la viabilidad celular bajo condiciones de NG. El tratamiento H₂O₂ en condiciones de glucosa normal produjo un efecto citotóxico, el cual fue revertido parcialmente por el co-tratamiento con ANG-1-7.

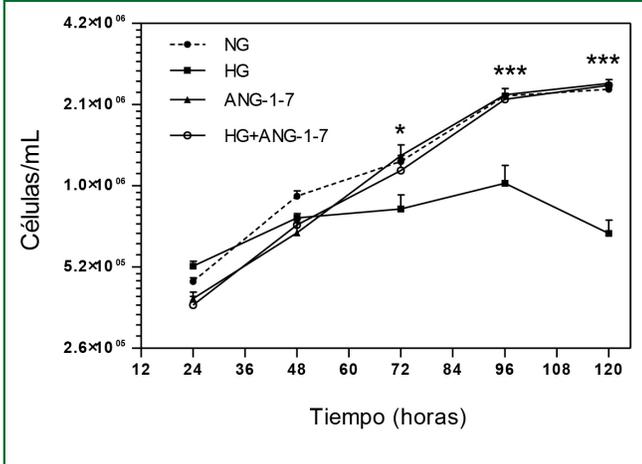
Efecto de la ANG 1-7 sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en secciones de la corteza renal proveniente de ratas con diabetes experimental e incubadas *in vitro*

El tratamiento con ETZ *in vivo*, redujo significativamente las actividades CAT y SOD en las secciones de corteza renal incubadas *in vitro* (Figuras 4 y 5). El tratamiento con la ANG-1-7 no afectó la actividad enzimática, pero fue capaz de revertir el decremento en la actividad de la CAT y la SOD inducida por la STZ (Figura 4 y 5). La acción de la ANG-1-7 sobre la actividad de SOD y CAT, fue prevenida por el A779 (Figura 5).

Efecto de la ANG 1-7 sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en las células Vero en cultivo.

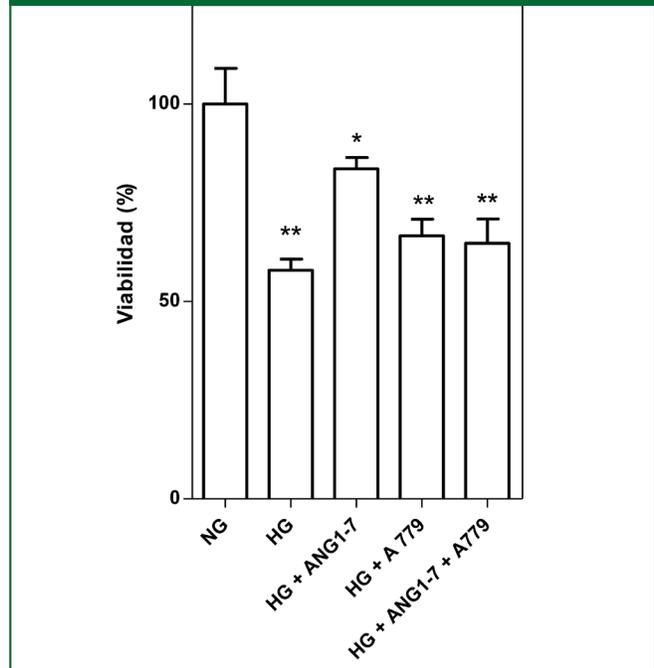
De manera similar a lo observado en la corteza renal de los animales hiperglicémicos, la condición de alta concentración de glucosa en células Vero cultivadas *in vitro*, también disminuyó las actividades de las enzimas antioxidantes evaluadas. El tratamiento *in vitro* con ANG-1-7 incrementó significativamente (p<0,05) la actividad basal de la CAT, y revirtió parcial o completamente los efectos inhibitorios del HG sobre la actividad de la CAT y SOD, respectivamente (Figura 6).

Figura 1



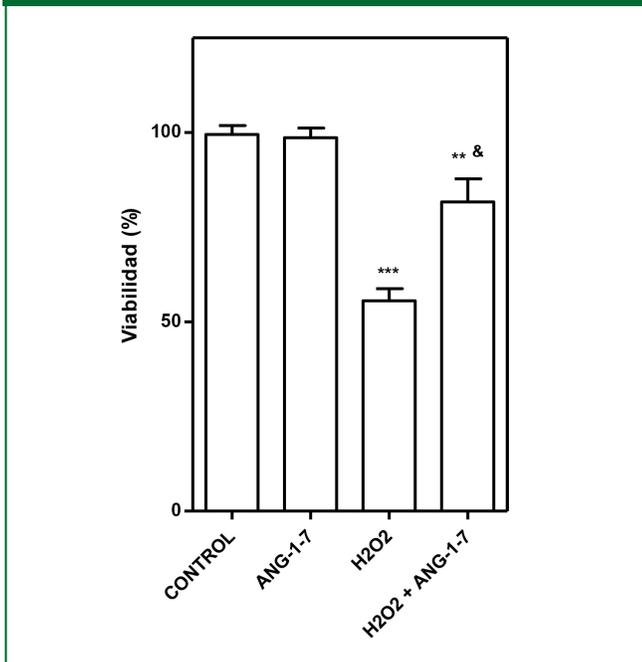
Curso temporal del efecto de la ANG 1-7 sobre la proliferación de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media ± E.E.M. *p<0,01 y ***p<0,0001 con respecto al grupo HG. N=18.

Figura 2



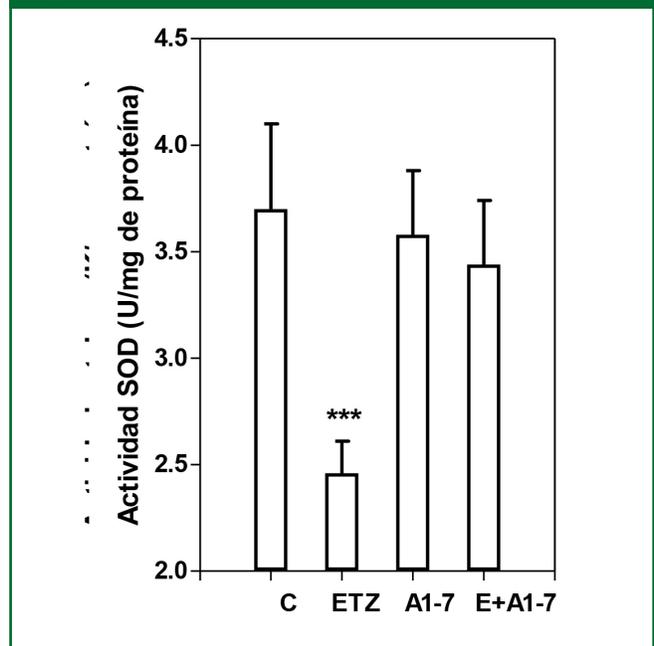
Efecto de la ANG-1-7 (10^{-6} M) y el A799 (10^{-5} M) sobre la viabilidad de las células Vero cultivadas en ambiente de normo- o alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media ± E.E.M. **p<0,001 y *p<0,01 con respecto al grupo NG. N=13-16.

Figura 3



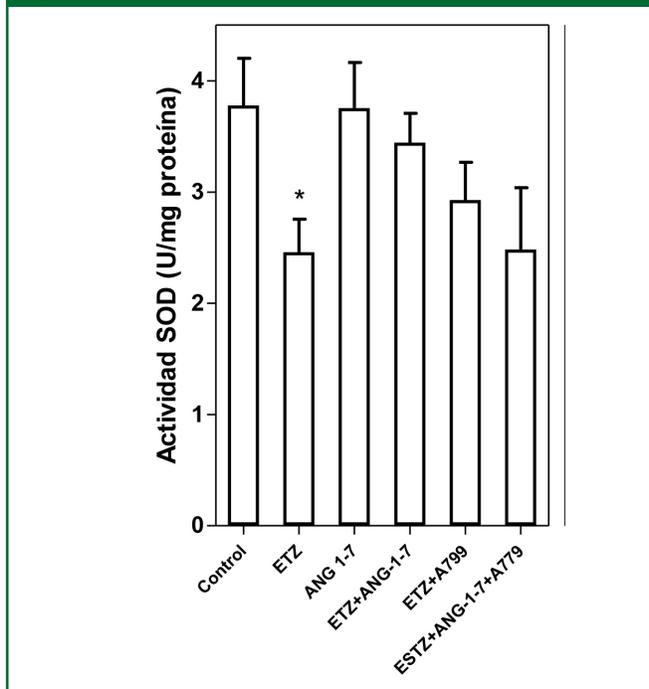
Efecto de la ANG 1-7 sobre el efecto citotóxico del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 10^{-4} M) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con un ambiente NG. Los valores se muestran como la media ± E.E.M. ***p<0,001 y *p<0,05 con respecto al grupo ANG-1-7. **p<0,01 con respecto al grupo H_2O_2 .

Figura 4



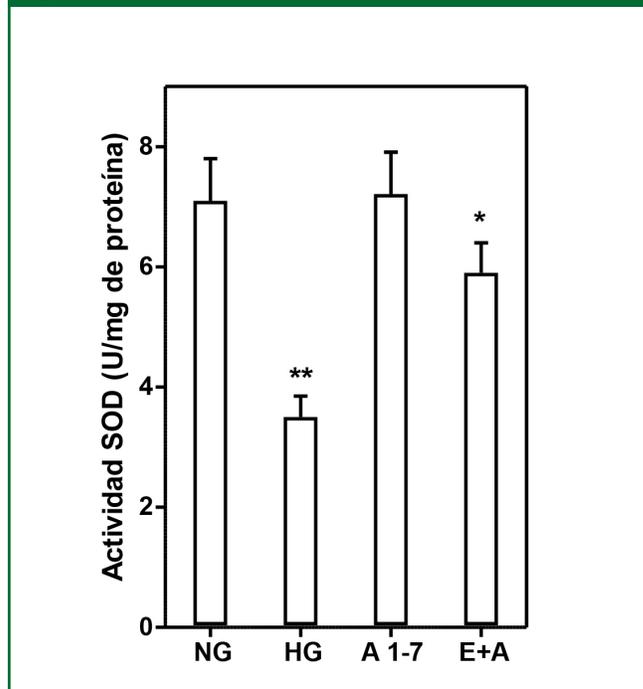
Efecto de la ANG 1-7 (10^{-6} M) *in vitro* sobre la actividad catalasa (izquierda) y superóxido dismutasa total (SOD) (derecha) en la corteza renal de ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (STZ). Los valores se muestran como la media ± E.E.M. *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 con respecto al control. N=6-16.

Figura 5



Efecto de la A779 (10^{-5} M) sobre el efecto nefroprotector de la ANG 1-7 (10^{-6} M) sobre la actividad de la CAT (izquierda) y de la superóxido dismutasa total (SOD) (derecha) en la corteza renal proveniente de ratas con diabetes inducida por ETZ e incubadas *in vitro*. Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control. N=8-16.

Figura 6



Efecto de la ANG 1-7 sobre la actividad de la catalasa (CAT) (izquierda) y la actividad SOD (derecha) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. N=15, por grupo.

Discusión

El sistema renina angiotensina renal se encuentra activado en la diabetes. Su péptido efector, la ANG II, produce un efecto proliferativo, proinflamatorio y promotor del crecimiento celular en el tejido renal, estando estos procesos asociados con el daño renal en la diabetes²². La ANG II aumenta la expresión de las proteínas de la matriz extracelular, favoreciendo el desarrollo de la hipertrofia celular en el riñón^{4,23}. Ahora bien, se sabe que las altas concentraciones de glucosa son capaces de aumentar los niveles renales de la ANG II²⁴, trayendo como consecuencia la activación de varias vías de señalización dependientes del receptor AT₁, entre las que destacan: la señalización mediada por MAPKs y por ROS, las cuales están íntimamente involucradas en el daño de las células renales en la diabetes^{25,26}. Estudios en humanos y en animales de experimentación tratados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o con antagonistas del receptor AT₁ de angiotensina II, han mostrado una disminución del daño renal en la diabetes^{27,28}, lo que sugiere un papel importante de la ANG II en el desarrollo de la nefropatía diabética.

Una molécula endógena que ha mostrado un importante efecto contraregulatorio a la acción de la ANG II, es la angiotensina 1-7 (ANG-1-7), un péptido que es conside-

rado como el componente activo más pleiotrópico del sistema renina angiotensina^{9,13}. Mediante estudios de radioligando en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el gen Mas, así como en riñones de ratones con delección genética del gen Mas, se ha demostrado que la ANG-1-7 es el ligando endógeno del R-Mas²⁹. Aun más, se conoce que la mayoría de los efectos de la ANG-1-7 son mediados por el R-Mas, entre los que destacan: la vasodilatación, la antiproliferación celular, las acciones antiarritmogénicas, el efecto antitrombótico, el antidiurético o el natriurético, y finalmente sus acciones sobre la función endotelial^{9,29}.

Se ha implicado al estrés oxidativo en la nefropatía diabética³⁰. Efectivamente, uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal por la hiperglicemia es la formación de las ROS²⁶ a través de varios mediadores importantes, tales como: los AGEs, la ANG II y las NRS^{3,25}. Sin embargo, se ha estudiado poco el papel de las enzimas antioxidantes renales en la nefropatía diabética y su posible relación con la ANG-1-7. Al respecto, se conoce que en los animales con diabetes inducida por la STZ, el sistema antioxidante renal como en otros órganos se encuentra inhibido, mientras que el oxidante y nitrante se encuentra elevado^{31,32,33}. Así, se ha

reportado un incremento del estado oxidativo, asociado al aumento de la peroxidación lipídica y de las proteínas oxidadas totales en la corteza renal de las ratas luego de seis semanas de ser inducida la diabetes³⁴. En cuanto al sistema antioxidante, se sabe que en la nefropatía diabética la actividad y la expresión de algunos de sus componentes enzimáticos se encuentran alteradas. Así, se ha observado una disminución de la actividad de la CAT en los riñones de las ratas con diabetes inducida por la STZ³⁴⁻³⁷. De igual manera, la expresión de esta enzima se ha visto disminuida, tanto en pacientes con nefropatía diabética⁵, como en el riñón de las ratas diabéticas^{34,36,37}. En este sentido nuestros resultados guardan consistencia con estos hallazgos ya que observamos una reducción de la actividad de la CAT en las secciones de corteza renal proveniente de ratas con diabetes inducida por la STZ, así como en las células Vero en cultivo sometidas a HG. En relación a la SOD los reportes son variables, así se ha reportado que la actividad y la expresión permanece sin cambios³⁷, aumentan^{34,35} o ambas disminuyen³⁶. En nuestras condiciones experimentales la actividad de la SOD total de secciones de corteza renal proveniente de ratas con diabetes inducida por la STZ estuvo significativamente reducida. La actividad reducida de la SOD podría corresponder a la actividad de la CuZn-SOD, ya que se ha demostrado que la actividad de la Mn-SOD no se altera por la hiperglicemia en ratas *Sprague Dawley* con diabetes inducida por la STZ³⁵. La reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes podría ser multifactorial; al respecto se sabe que el O_2^- es capaz de inactivar a la CAT y a la GPx^{38,39}, el ONOO⁻ inactiva a la Mn-SOD por nitración de tirosinas⁴⁰, el NO induce inactivación de la CAT por formación de un complejo CAT-nitrosilo⁴¹.

Se ha demostrado que la ANG-1-7 actúa como nefroprotector reduciendo la producción de las ROS. Efectivamente, en un modelo experimental de nefropatía diabética en el ratón KK-Ay/Ta, la ANG-1-7 redujo la producción de ROS inducida por la estimulación de la NAD(P)H oxidasa con ANG II⁴², lo que sugiere la existencia un antagonismo funcional entre la ANG-1-7 y la ANG II en el daño renal. Ahora bien, un mecanismo adicional mediante el cual la ANG-1-7 podría ejercer su efecto renoprotector y antioxidante, es a través de su acción sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que la ANG-1-7 previno la reducción de la actividad de estas enzimas producida por la hiperglicemia en ratas diabéticas inducida con STZ o en células Vero en cultivo en un medio alto en glucosa.

Nuestros hallazgos confirman el papel del receptor R-Mas en la acción renoprotectora de la ANG-1-7, ya que los efectos de la reversión de la disminución de la actividad CAT y SOD inducida por la ANG-1-7 fue, total o

parcialmente bloqueada por el antagonista del R-Mas, el A799, tanto en las secciones de corteza renal provenientes de ratas diabéticas como en células Vero en cultivo, lo que apoya el papel fundamental del eje ANG-1-7/R-Mas en la nefropatía diabética. En apoyo a estos hallazgos están los reportados por Singh, Singh y Sharma⁴³ quienes demostraron en ratas con nefropatía diabética inducida por la STZ, que el tratamiento con A799 *in vivo* fue capaz de bloquear los efectos beneficiosos de la ANG-1-7 sobre los marcadores de daño renal como la proteinuria y los niveles de nitritos y nitratos.

Bajo un ambiente prolongado de alta concentración de glucosa las células tanto del epitelio tubular como las mesangiales sufren inhibición de la proliferación y apoptosis asociada a un incremento de la formación de las ROS^{44,45}. Kannan y Jain⁴⁶ demostraron que concentraciones de glucosa entre 20 y 100 mM causan una reducción alrededor del 50% de la viabilidad celular en comparación con el control de 8 mM de glucosa. Nuestros resultados apoyan estos hallazgos en cuanto que un ambiente de alta glucosa (35 mM) produjo una reducción de la viabilidad de las células Vero del $50,94 \pm 2,48$ %, siendo este efecto inhibido significativamente por la ANG-1-7. Estos resultados se confirman por los obtenidos en el ensayo de proliferación celular a través de un método de exclusión en el cual se muestra por un lado, un efecto pro-proliferativo de la ANG-1-7 en condiciones basales y por otro una inhibición del decremento del número de células vivas inducida por el ambiente glucotóxico. Todos estos resultados sugieren un efecto protector de la ANG-1-7 sobre daño renal inducido por la alta glucosa *in vitro*.

El incremento del H_2O_2 ha sido asociado al daño renal en la diabetes en modelos experimentales *in vitro*, ya que esta especie reactiva induce apoptosis en varios tipos de células renales, tales como los fibroblastos, las células mesangiales y del epitelio tubular^{47,48,49}. Zhuang y col. (48) y Kim y col.⁴⁹ demostraron que el H_2O_2 induce apoptosis a través de un incremento de las ROS, de la fosforilación de las ERK y de la activación de la caspasa 3, en células de epitelio tubular y mesangiales, respectivamente. Asimismo, en células Vero este inductor de estrés oxidativo, produjo una disminución de la viabilidad celular, aumento de la fragmentación del ADN e incremento de la apoptosis⁴⁷. Nuestros hallazgos están en concordancia con los reportados ya que bajo nuestras condiciones experimentales, las células Vero fueron susceptibles a una significativa disminución de la viabilidad celular inducida por el H_2O_2 . Este efecto fue parcialmente inhibido por el co-tratamiento con el ANG-1-7, consolidando aún más a este péptido como antioxidante y protector del daño oxidativo renal, posiblemente al efecto de la ANG-1-7 sobre la actividad de la CAT y el consecuente

incremento de la degradación del H₂O₂.

En conclusión, se muestra que el tratamiento con la ANG-1-7 ejerce un efecto renoprotector ante el daño oxidativo en la diabetes a través de la recuperación de la actividad de las enzimas SOD y CAT. Este efecto es mediado por el R-Mas ya que es abolido por el tratamiento con A779.

Agredecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el CDCH-UCV proyectos PG-06-7349-2008-1/2 y AIA-06.8402.2012.

Referencias

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30(Suppl1):S4-S41.
2. Schrijvers B, De Vriese A, Flaybjerg A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocrine Reviews* 2004; 25:971-1010.
3. Kanwar Y, Akagi S, Sun L, Nayak B, Xie P, et al. Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 101:100-110.
4. Wolf G, Ziyadeh F. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007; 106:26-31.
5. Hodgkinson A, Bartlett T, Oates P, Millward B, Demaine A. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003; 52:846-51.
6. DeRubertis F, Craven P, Melhem M, Salah E. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes* 2004; 53:762-768.
7. Brezniceanu M, Liu F, Wei C, Chénier I, Godin N, et al. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 2008; 57:451-459.
8. Craven P, Phillips S, Melhem M, Liachenko J, DeRubertis F. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. *Metabolism* 2001; 50:1043-1048.
9. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas; new players of renin angiotensin system. *J Endocrinol* 2011; 216: R1-R17.
10. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999; 34:950-957.
11. Pereira RM, Dos Santos RA, Teixeira MM, Leite VH, Costa LP, et al. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *Hepatology* 2007; 46:674-81.
12. Polizio AH, Gironacci MM, Tomaro ML, Peña C. Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin-stimulated superoxide production. *Pharmacol Res* 2007; 56: 86-90.
13. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007; 50:1093-1098.
14. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3067-3075.
15. Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch* 2013;465(1):79-85.
16. Heller J, Kramer HJ, Malý J, Cervenka L, Horáček V. Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) in the dog. *Kidney Blood Press Res* 2000; 23:89-94.
17. Santos RA, Simoes e Silva AC, Magaldi AJ, Khosla MC, Cesar KB, et al. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydro-electrolyte balance. *Hypertension* 1996; 27: 875-884.
18. Dharmani M, Mustafa MR, Achike FI, Sim MK. Effects of angiotensin 1-7 on the actions of angiotensin II in the renal and mesenteric vasculature of hypertensive and streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 561:144-150.
19. Benter IF, Yousif MHM, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H666-H672.
20. Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Am J Nephrol* 2008; 28: 25-33.
21. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* 2008; 51:574-580.
22. Kobori H, Nangaku M, Navar L, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007; 59:251-87.
23. Wolf G, Ziyadeh F. Molecular mechanism of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999; 56:393-405.
24. Singh R, Singh A, Leehey D. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin diabetic rat glomeruli. *Am J Physiol* 2005; 288:F1183-F1190.
25. Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl R, Wolf G. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27Kip1: Role in angiotensinII-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1387-1397.
26. Lee H, Yu M, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S241-S245.
27. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Makita Y, Tomino Y, et al. Effects of enalapril treatment on gene expression of smooth muscle myosin heavy chain isoforms in glomeruli of diabetic rats. *Ren Physiol Biochem* 1995; 18(4):183-90.
28. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, et al. Collaborative Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345:851-60.
29. Santos RA, Simoes e Silva AC, Marlic C, Silva DM, Machado RP, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8258-8263.
30. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 2008; 57(6):1446-54.
31. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002; 61(1):186-94.
32. Mora A, Aragón D, Ospina L. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae Rev Fac Quim Far* 2009; 16(3):2145-2660.
33. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci* 2011; 12(5):3133-47.
34. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003; 243(1-2):147-52.

35. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci* 1997; 60(9):667-79.
36. Luo ZF, Qi W, Feng B, Mu J, Zeng W, et al. Prevention of diabetic nephropathy in rats through enhanced renal antioxidative capacity by inhibition of the proteasome. *Life Sci* 2011; 88(11-12):512-20.
37. Sadi G, Eryilmaz N, Tütüncüoğlu E, Cingir Ş, Güray T. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28(3):228-35.
38. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240(2):500-8.
39. Rister M, Baehner RL. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* 1976; 58(5):1174-84.
40. Filipović MR, Stanić D, Raicević S, Spasić M, Niketić V. Consequences of MnSOD interactions with nitric oxide: nitric oxide dismutation and the generation of peroxynitrite and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 2007; 41(1):62-72.
41. Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(7):709-14.
42. Moon JY, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, et al. Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-A(y)/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300(6):F1271-F1282.
43. Singh T, Singh K, Sharma PL. Ameliorative potential of angiotensin-1-7/Mas receptor axis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Methods and Findings Exp Clin Pharmacol* 2010; 32: 19-25.
44. Verzola D, Bertolotto M, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:855-87.
45. Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest* 2006; 86(6):566-77.
46. Kannan K, Jain SK. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 1994; 26(7):322-5.
47. Zanatta M, Sandri P, Arslan. Ascorbic acid increases cell death in fibroblast and Vero cultures after oxidative and thermic stress. *Riv Med Lab – JLM* 2003; 4:3-4.
48. Zhuang S, Yan Y, Daubert RA, Han J, Schnellmann RG. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(1):F440-447.
49. Kim OS, Kim YS, Jang DS, Yoo NH, Kim JS. Cytoprotection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured mouse mesangial cells by erigeroflavanone, a novel compound from the flowers of *Erigeron annuus*. *Chem Biol Interact* 2009; 180(3):414-20.