



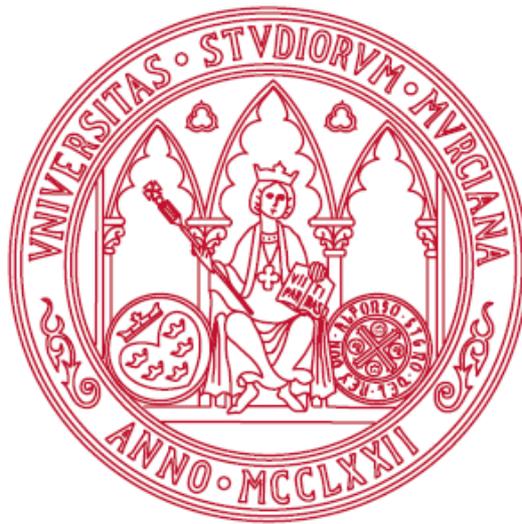
**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**Importancia de los Transmisores Gaseosos  
CO y SH<sub>2</sub> en la Nefropatía Diabética  
e Isquémica**

**D. Cayetano Pérez Pardo**

**2017**





**Universidad de Murcia**  
*Departamento de Fisiología*

**TESIS DOCTORAL**

**“ Importancia de los transmisores gaseosos CO y SH<sub>2</sub> en la nefropatía diabética e isquémica.”**

D. Cayetano Pérez Pardo

**Directores:**

Prof. Dra. Francisca Rodríguez Mulero

Prof. Dr. Bernardo López Cano

2017





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D<sup>a</sup>. Francisca Rodríguez Mulero, Profesora Titular de Universidad del Área de Fisiología Humana en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Importancia de los transmisores gaseosos CO y SH2 en la nefropatía diabética e isquémica", realizada por D. Cayetano Pérez Pardo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de Junio de 2017





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D. Benardo López Cano, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología Humana en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Importancia de los transmisores gaseosos CO y SH2 en la nefropatía diabética e isquémica", realizada por D. Cayetano Pérez Pardo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de Junio de 2017



## **FINANCIACIÓN**

Esta tesis doctoral forma parte de, y ha estado financiada por, los proyectos de investigación financiados por la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, "Importancia funcional del sistema hemooxigenasa -monóxido de carbono renal en diabetes experimental: diferencias de género" **12009/PI/09** cuya IP fue la Dra. Francisca Rodríguez Mulero e "Importancia del sistema SH<sub>2</sub> sintasa/biosíntesis de SH<sub>2</sub> en la regulación de la hemodinámica sistémica y renal en los periodos iniciales de la diabetes mellitus tipo 1" **08843/PI/08** cuyo IP fue el Dr. Bernardo López Cano; y por el proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del plan nacional I+D+I 2008 – 2011 "Interacciones de los reguladores gaseosos NO, CO y SH<sub>2</sub> en la fisiopatología cardiovascular y renal de la diabetes experimental" **BFU2009-11087/BFI**, cuyo IP fue el Dr. Bernardo López Cano.



### **A Gesa**

Por tu infinita paciencia y por ser simplemente tu,  
me falta tiempo en esta vida para agradecerte lo que  
cada día haces por mí.

### **A mis padres y mis hermanos**

Por su gran apoyo en todo lo que emprendo y porque  
siempre me lo han dado todo, y me lo siguen dando.

### **A mis directores**

Por enseñarme todo lo que sé en el campo de la  
Investigación, por su esfuerzo, dedicación y entrega a este proyecto.



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero manifestar mi más profundo agradecimiento a todo el personal del departamento: Francisco Fenoy, Isabel Hernández, Luis Carbonell, Miguel García, Tomás Quesada, Javier Salazar, Bárbara Bonaca, Moisés Hernández, Virginia Reverte, Mari Carmen Pérez, María José Salazar, Juanma Moreno, Mayte Llinás, Clara Ortiz y José Luis Hernández porque siempre han tenido buenas palabras hacia mí, además de haberme prestado su ayuda incondicional cuando la he necesitado.

A mis amigos: Toni Tapia, Nino Sánchez, Álvaro Ortiz, Alberto Flores, Miguel Alcaraz, Jorge Novella, Juan Palazón, Alberto Soriano, José Manzano, Pablo Touchard, Juan G Navarro, Jose Morcillo y Victor M Pérez porque siempre están ahí para lo bueno y para lo malo, me han dedicado su tiempo y su comprensión de manera desinteresada cuando lo he requerido.

A mis compañeros de Farmacia de la Universidad Miguel Hernández: Jorge Bagur, Rafael Plana, David Hernández, José Buñuel, Juan M Nuñez, Jaime Saura y en especial a mi amigo Javier Segura, los 5 años en Alicante los llevaré siempre en la memoria, como una de las mejores experiencias que he vivido.

A mis amigos y compañeros del FIR: Ángel Rodríguez, Rafael Jiménez y Manuel Rodríguez estos 2 años de sufrimiento y sacrificio con vosotros han sido mucho más fáciles de llevar, al final todo llegará.

Finalmente agradecer a quienes no he nombrado individualmente, pero en algún momento de este largo proceso me han prestado su ayuda.



## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

### **1 RESUMEN**

- *ABSTRACT*, **5**

### **2 INTRODUCCIÓN,**

#### **2.1 Sistema Hemo-HO**

2.1.1 Biología fundamental del sistema Hemo-HO-CO vascular y renal, **11**

2.1.2 Interacciones entre el CO y el NO en la vasculatura: importancia para el riñón diabético, **14**

2.1.3 Acciones antioxidantes y citoprotectoras del sistema hemo-HO vascular y renal en la diabetes mellitus tipo 1, **16**

2.1.4 Acciones vasorreguladoras del sistema hemo-HO en condiciones normales y en la diabetes mellitus tipo 1, **19**

#### **2.2 Sulfuro de Hidrógeno**

2.2.1 Generación endógena y metabolismo del sulfuro de hidrógeno, **22**

2.2.2 Acciones fisiológicas del sulfuro de hidrógeno. Alteraciones de su producción, **24**

2.2.3 Acciones del sulfuro de hidrógeno durante la isquemia-reperfusión renal, **26**

2.2.4 Detección endógena de la concentración de sulfuro de hidrógeno, **28**

### **3 HIPÓTESIS**

### **4 OBJETIVOS**

## **5 MATERIAL Y MÉTODOS,**

### ***5.1 Animales de experimentación***

### ***5.2 Inducción de la diabetes mellitus tipo 1***

5.2.1 Determinación de glucosa en sangre, **42**

5.2.2 Cuantificación de la Hemoglobina glicosilada, **43**

### ***5.3 Expresión de las isoformas de la hemooxigenasa renal***

### ***5.4 Electroinmunotransferencia (Western-Blot)***

5.4.1 Extracción y preparación de los homogeneizados de tejido, **45**

5.4.2 Determinación de la cantidad de proteínas y preparación de las muestras, **45**

5.4.3 Electroforesis, **46**

5.4.4 Transferencia Western blotting y detección inmunoquímica, **47**

### ***5.5 Determinación del contenido renal de nitrotirosina***

### ***5.6 Medida de la concentración cortical renal de óxido nítrico***

5.6.1 Calibración del microsensor de óxido nítrico, **50**

5.6.2 Medida de la concentración cortical renal de óxido nítrico en animales control y diabéticos tras el tratamiento crónico con Tempol, **52**

### ***5.7 Procedimiento quirúrgico general para determinar la función hemodinámica renal en ratas anestesiadas***

**5.8 Efectos de la inhibición aguda de la HO en la función hemodinámica renal de ratas anestesiadas controles y diabéticas**

**5.9 Estudio de las acciones del sulfuro de hidrógeno sobre la función renal**

5.9.1 Calibración del microelectrodo selectivo para el sulfuro de hidrógeno, **58**

5.9.2 Medida *in vivo* de la concentración renal de sulfuro de hidrógeno, **59**

5.9.3 Valoración de la función a las 24 horas de la isquemia reperfusión renal, **62**

**5.10 Determinaciones Analíticas. Técnicas de medida**

5.10.1 Medida del flujo sanguíneo renal, **64**

5.10.2 Flujo urinario, **64**

5.10.3 Hematocrito, **65**

5.10.4 Tasa de filtración glomerular, **65**

**5.11 Análisis estadístico**

**6 RESULTADOS, 69**

**6.1 Características generales de los animales**

6.1.1 Características generales de las ratas controles y diabéticas con y sin tratamiento crónico de Tempol, **69**

**6.2 Expresión renal de las isoformas de la HO (HO-1 y HO-2) en animales control y diabéticos, con y sin tratamiento crónico de Tempol**

**6.3 Contenido de nitrotirosina renal en animales control y diabéticos, con y sin tratamiento crónico de Tempol**

**6.4 Concentración de óxido nítrico en la corteza renal de ratas control y diabéticas, con y sin tratamiento crónico de Tempol**

**6.5 Efectos de la administración de STZ (65 mg/kg) sobre la hemodinámica renal y presión arterial media en ratas SD para inducir una diabetes tipo-1,**

**6.6 Efectos de la inhibición aguda de la actividad de HO endógena sobre la hemodinámica renal en ratas anestesiadas controles y diabéticas, con y sin tratamiento crónico de Tempol**

**6.7 Efectos del sulfuro de hidrógeno durante la isquemia-reperfusión renal**

6.7.1 Concentración in vivo de sulfuro de hidrógeno en la corteza renal de ratas durante la isquemia-reperfusión, **86**

6.7.2 Efectos de la administración intravenosa de l-cisteína, sulfhidrato de sodio y los inhibidores enzimáticos de sulfuro de hidrógeno, sobre la función renal 24 horas después de la isquemia, **89**

**7 TABLAS**

**8 DISCUSIÓN**

**9 CONCLUSIONES**

**10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b><sup>3</sup>H-Inulina:</b>	Inulina tritiada
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirreibonucleico
<b>AOAA:</b>	Ácido aminooxiacético
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfato
<b>BR:</b>	Bilirrubina
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BV:</b>	Biliverdina
<b>Ca:</b>	Calcio
<b>CAT:</b>	Cisteína amino transferasa
<b>CBS:</b>	Cistationina β-sintasa
<b>CGL:</b>	Cistationina γ-liasa
<b>CO:</b>	Monóxido de Carbono
<b>DAO:</b>	D-aminoácido oxidasa
<b>DM:</b>	Diabetes Mellitus
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EE:</b>	Error estándar
<b>eNOs:</b>	Óxido nítrico sintetasa endotelial
<b>ERO:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ET:</b>	Endotelina
<b>FSR:</b>	Flujo sanguíneo renal

## **Abreviaturas**

<b>FF:</b>	Fracción de filtración
<b>GAPDH:</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GCs:</b>	Guanilato ciclasa soluble
<b>GMP<sub>c</sub>:</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>HbA1c:</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HCl:</b>	Ácido clorhídrico
<b>HO:</b>	Hemo-oxigenasa
<b>IR:</b>	Isquemia-reperfusión
<b>IV:</b>	Intravenoso
<b>K:</b>	Potasio.
<b>L-cis:</b>	L-cisteína
<b>MST:</b>	Mercaptopiruvato sulfotransferasa
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:</b>	Carbonato de sodio
<b>NADPH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaHS:</b>	Sulfhidrato de sodio
<b>ND:</b>	Nefropatía diabética
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>NOS:</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PAM:</b>	Presión arterial media
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPG:</b>	Propargilglicina
<b>RhD:</b>	Rodanasa
<b>RVR:</b>	Resistencia vascular renal

## **Abreviaturas**

<b>SD:</b>	Sprague-Dawley
<b>SH<sub>2</sub>:</b>	Sulfuro de hidrógeno
<b>SnMP:</b>	Mesoporfirina de estaño
<b>STZ:</b>	Estreptozotocina
<b>TFG:</b>	Tasa de filtración glomerular



# RESUMEN



## 1. RESUMEN

A lo largo de los años, los conocimientos sobre papel representado por los transmisores gaseosos en los distintos procesos fisiológicos, y concretamente en la regulación de la función hemodinámica renal, ha crecido exponencialmente. Estos agentes son el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y más recientemente el sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>).

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir de la L-arginina, por una familia de enzimas llamadas genéricamente óxido nítrico sintasas (NOS), y por sus múltiples acciones vasodilatadoras, antiagregantes, y reguladoras de la función renal, entre otras acciones, se reconoce como un transmisor fundamental para el funcionamiento normal del organismo. Su importancia es tal que la falta de su síntesis, o de sus acciones mediadoras, frecuentemente determinadas por los altos niveles de estrés oxidativo, se sitúa en el origen de muchas alteraciones vasculares y orgánicas asociadas a la hipertensión, la diabetes, o episodios de isquemia/reperfusión renal.

El sistema enzimático de la hemoxygenasa (HO) está constituido por 2 isoformas activas: hemoxygenasa-1 (HO-1) y hemoxygenasa-2 (HO-2) cuya expresión se ha documentado en estructuras vasculares y tubulares del riñón. La actividad HO cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo, dando lugar a CO, biliverdina (BV) y bilirrubina (BR), todos ellos productos con actividad biológica. La HO-2 es la isoenzima constitutiva, mientras que, la HO-1 es la isoforma inducida en condiciones patológicas que implican estrés oxidativo como la disfunción renal que aparece en una diabetes tipo- (DM-1), una situación que cursa con una disminución de la biodisponibilidad de NO.

El sulfuro de hidrógeno se sintetiza en el organismo principalmente por la acción de las enzimas cistationinaβ-sintasa (CBS) y cistationinaγ-liasa (CGL) que generan SH<sub>2</sub> a partir del aminoácido L-Cisteína (L-Cis). Estudios recientes destacan los efectos protectores del SH<sub>2</sub> en las lesiones tisulares provocadas tras una isquemia-reperfusión (IRI) renal, una de las principales causas de insuficiencia renal aguda y disfunción del trasplante renal.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue analizar la importancia funcional del sistema Hemoxygenasa (HO) y de la ruta biosintética que conduce a la producción de SH<sub>2</sub>, como parte de los mecanismos que contribuyen a la regulación

de la hemodinámica renal en dos modelos experimentales de disfunción renal: diabetes mellitus tipo-1 (DM-1) e isquemia/reperfusión renal.

Para reproducir los cambios estructurales y funcionales de la diabetes renal, se utilizó un modelo experimental de diabetes inducida por la administración de streptozotocina (STZ) en ratas SpragueDawley (SD), un tóxico específico de células  $\beta$ -pancreáticas. Para analizar el significado funcional de la actividad HO en el riñón diabético de los animales, se empleó la mesoporfirina de estaño (SnMP; 40  $\mu$ mol/kg, i.v) en animales anestesiados. La determinación de expresión de HO -1 y HO-2 se llevó a cabo mediante Western Blot. A su vez, se cuantificó por ELISA las concentraciones renales de proteínas nitrosiladas, como índice de estrés oxidativo. Las concentraciones tisulares de NO in vivo se determinaron mediante voltametría, una técnica altamente selectiva y específica. Para disminuir los niveles de estrés oxidativo se administró Tempol (1mM) en el agua de bebida, durante 12 días previos al experimento agudo.

Para determinar el papel del SH<sub>2</sub> en la IRI tisular, se utilizó un modelo de 45/60 minutos de isquemia-reperfusión renal. Se estudiaron los efectos del sulfhidrato de sodio (un donante de SH<sub>2</sub>); el sustrato enzimático L-cisteína, y los inhibidores de las enzimas CBS y CGL, ácido aminooxiacético y propargilglicina, respectivamente. Las concentraciones corticales renales de SH<sub>2</sub> se midieron electroquímicamente. Además, se analizaron los efectos de la administración intravenosa de estas sustancias sobre la función renal, 24 horas después de una isquemia reperfusión.

Los principales resultados sugieren que la expresión de HO-1, junto con la respuesta vasoconstrictora renal a la inhibición de la HO, se incrementa en ratas diabéticas notablemente hiperglucémicas que muestran bajos niveles de NO. Además, el tratamiento con Tempol en animales diabéticos, que redujo el estrés oxidativo y la expresión de la proteína HO-1, también atenuó la respuesta vascular renal a la inhibición de la HO en animales diabéticos.

Por su parte, la isquemia renal produjo aumento de los niveles endógenos de SH<sub>2</sub> en la corteza renal, aunque sólo el pretratamiento con una fuente exógena de SH<sub>2</sub> parece contribuir a mejorar significativamente la insuficiencia renal observada 24 horas después de la reperfusión tisular.

## **ABSTRACT**

Over the years, knowledge about the role represented by gaseous transmitters in different physiological processes, and specifically in the regulation of renal hemodynamic function, has grown exponentially. These agents are nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and more recently hydrogen sulfide (SH<sub>2</sub>).

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine, by a family of enzymes generically called nitric oxide synthases (NOS). Because of its multiple vasodilatory, antiaggregating and regulating actions of renal function, among others, NO is recognized as a fundamental transmitter for the normal function of the organism. The lack of its synthesis, or mediating actions, often determined by the high levels of oxidative stress, represents the origin of many vascular and organic alterations associated with hypertension, diabetes, or episodes of ischemia / Renal reperfusion.

The enzyme system of hemo-oxygenase (HO) has 2 active isoforms: hemoxygenase-1 (HO-1) and hemoxygenase-2 (HO-2) whose expression has been documented in vascular and tubular kidney structures. The HO activity catalyzes the oxidative degradation of the heme group and produces CO, biliverdin (BV) and bilirubin (BR), products with biological activity. HO-2 is the constitutive isoenzyme, whereas HO-1 represents the isoform induced in pathological conditions involving oxidative stress and renal dysfunction that appears in type-1 diabetes (DM-1), a situation that occurs with a decreased NO bioavailability.

Hydrogen sulphide is mainly synthesized in vivo by the action of the enzymes cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) and cystathionin  $\gamma$ -lyase (CGL). That generates SH<sub>2</sub> from the amino acid L-Cysteine (L-Cis). Recent studies highlight the protective effects of SH<sub>2</sub> on damaged tissue after renal ischemia-reperfusion (IR), a major cause of acute renal failure and renal transplant dysfunction.

The general objective of this Doctoral Thesis was to analyze the functional importance of the Hemoxygenase (HO) system and the biosynthetic pathway that leads the production of SH<sub>2</sub>, as part of the mechanisms that contribute to the regulation of renal hemodynamics in two experimental models of Renal dysfunction: type-1 diabetes mellitus (DM-1) and renal ischemia / reperfusion.

To reproduce the structural and functional changes of renal diabetes, an experimental model of diabetes induced by the administration of streptozotocin (STZ), a specific  $\beta$ -pancreatic cell toxin, in Sprague Dawley (SD) rats was used. To analyze the functional significance of HO activity in the diabetic kidney of animals, tin

mesoporphyrin (SnMP; 40  $\mu\text{mol} / \text{kg}$ , i.v) was used in anesthetized animals. The determination of HO-1 and HO-2 expression was carried out by Western blotting. In turn, the renal constraints of nitrosylated proteins, as an oxidative stress index, were quantified by ELISA. Tissue concentrations of NO in vivo were determined by voltammetry, a highly selective and specific technique. To reduce oxidative stress levels, Tempol (1 mM) was administered to the drinking water for 12 days prior to the acute experiment.

To determine the role of SH<sub>2</sub> in tissue IRI, a 45/60 minute model of renal ischemia-reperfusion was performed. We studied the effects of sodium sulfhydrylate (a SH<sub>2</sub> donor); the enzymatic substrate L-cysteine and the inhibitors of the enzymes CBS and CGL, aminooxyacetic acid and propargylglycine, respectively.

The effects of sodium sulfhydrylate (SH<sub>2</sub> donor) were studied; Renal cortical concentrations of SH<sub>2</sub> were measured electrochemically. In addition, the effects of intravenous administration of these substances on renal function were analyzed 24 hours after ischemia reperfusion.

The main results suggest that HO-1 expression, as well as renal vasoconstrictor response to HO inhibition, is remarkably increased in hyperglycemic diabetic rats showing low NO levels. In addition, treatment with diazepam in diabetic animals, which reduced oxidative stress and expression of the HO-1 protein, also attenuated the renal vascular response to the inhibition of HO in diabetic animals.

Renal ischemia produced increased levels of endogenous SH<sub>2</sub> in the renal cortex, although only pretreatment with an exogenous source of SH<sub>2</sub> seems to contribute to a significant improvement in renal insufficiency observed 24 hours after tissue reperfusion.

# **INTRODUCCIÓN**



## 2. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, están siendo investigadas profundamente un grupo de moléculas denominadas transmisores gaseosos cuya participación en procesos relevantes para los diferentes procesos fisiológicos es de vital importancia. Estos agentes son el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y más recientemente el sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>).

Estos transmisores gaseosos participan en la comunicación intra e intercelular, con alta especificidad, en múltiples funciones y sistemas en el organismo (*Wang R et al, 2003*). Sus funciones son análogas a las hormonas, neurotransmisores y mediadores lipídicos. Sin embargo, presentan características que los distinguen de estos compuestos. Puesto que se trata de gases liposolubles, sus movimientos no están restringidos por las membranas celulares, y por tanto es poco común su almacenamiento en vesículas para su posterior liberación. Aunque se ha sugerido que tanto el CO como el NO pueden estar unidos a proteínas que contienen hemo, y desde ahí puede producirse su liberación (*Ding Y et al, 1999; Leffler CW et al, 2006*), la forma predominante por la que ejercen sus funciones es la síntesis de novo (*Leffler CW et al, 2011*).

En el caso del CO, es producido por la acción de la enzima hemooxigenasa (HO). Esta enzima cataliza la transformación del grupo hemo, generándose cantidades equimoleculares de hierro libre, biliverdina (BV) y el propio CO (*Maines MD et al, 1988*). Algunos estudios han demostrado que la administración de CO a dosis fisiológicas ejerce diversos efectos en el organismo; tales como la vasodilatación, la prevención de la muerte celular, la producción de una respuesta antiinflamatoria y la modulación de la respuesta inmune (*Kristin A et al, 2006*). Concretamente en el riñón, evidencias experimentales indican que diversas estructuras renales están provistas de un sistema HO activo que elabora CO a partir de la metabolización del grupo hemo (*Leffler CW et al, 2011*), y que situaciones que cursan con aumentos de expresión de HO-1, la actividad HO regula la hemodinámica renal,

contrarrestando las acciones de sistemas vasoconstrictores endógenos (*Kaide JJ et al, 2001*) y atenuando la respuesta de autorregulación renal (*Botros FT et al, 2008*).

El NO ejerce influencias sobre un gran número de procesos biosintéticos y metabólicos importantes para la función renal normal, entre los que se incluyen la regulación de las funciones hemodinámicas y tubulares renales (*Baylis C et al, 1996*). Es por ello, que su deficiencia podría contribuir a diversos trastornos fisiológicos, entre los que se incluyen la hipertensión arterial, la arterosclerosis, el envejecimiento o la insuficiencia renal.

Por otro lado, son numerosos los estudios que han tratado de esclarecer la participación del SH<sub>2</sub> en diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Se ha observado que en el sistema nervioso central, mejora las lesiones isquémicas y protege las neuronas (*Ishigami M et al, 2009; Liu YY et al, 2011*). Otros autores han demostrado que en el sistema cardiovascular, el SH<sub>2</sub> está relacionado con la hipertensión, aterosclerosis y lesión miocárdica. Su utilidad en este caso, se ha atribuido a su efecto vasodilatador (*Li YF et al, 2009; Perna AF et al, 2010; Guo W et al, 2013*). Por su parte, a nivel renal, se ha demostrado que el SH<sub>2</sub> participa activamente en las funciones vasculares y tubulares.

A continuación se revisarán los conocimientos más actuales sobre los sistemas que producen los transmisores gaseosos, centrándonos fundamentalmente en el sistema hemo-hemoxigenasa-CO y las rutas biosintéticas que conducen a la formación de SH<sub>2</sub>, a través de su participación en dos modelos de daño renal que se caracterizan porque ambas situaciones cursan con elevados niveles de estrés oxidativo y una notable reducción en la biodisponibilidad del NO renal: la disfunción renal en diabetes y el daño subsecuente a una isquemia reperusión renal.

## 2.1 SISTEMA HEMO-HEMO-OXIGENASA-CO.

### 2.1.1 BIOLOGÍA FUNDAMENTAL DEL SISTEMA HEMO-HO-CO VASCULAR Y RENAL.

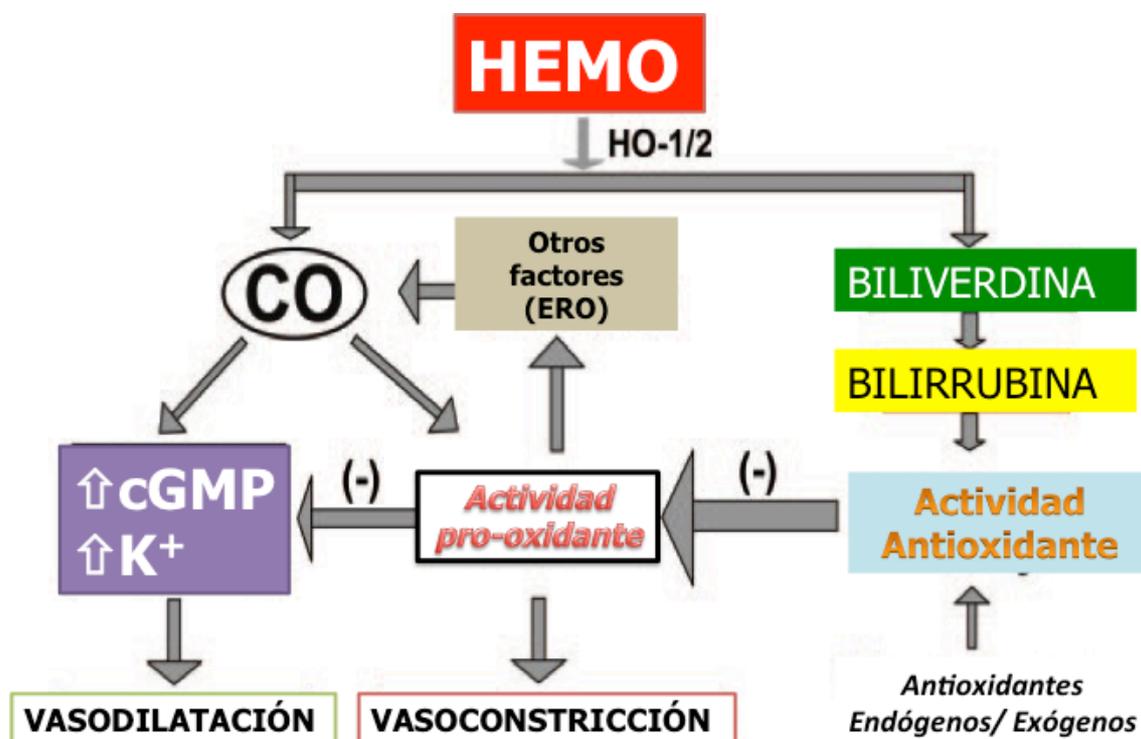
La degradación del grupo hemo (ferroprotoporfirina IX) en el organismo implica su oxidación por la enzima microsomal hemooxigenasa (HO), generándose cantidades equimoleculares de hierro libre, biliverdina (BV) y monóxido de carbono (CO) (*Maines MD et al, 1988*). Todos los productos derivados de la reacción catalizada por la HO son biológicamente activos: el hierro libre es un modulador de la transcripción génica; la BV y su derivado reducido la bilirrubina (BR), muestran propiedades antioxidantes, y finalmente el CO que ejerce, entre otras acciones, influencias vasodilatadoras y reguladoras de la actividad de canales iónicos, en diversos tipos celulares (*Abraham MG et al, 1997; Maines MD et al, 1997; Wang R et al, 1997; Wang T et al, 2003*).

Los mecanismos moleculares por los cuales el CO produce vasodilatación son diversos (*Morita T et al, 1995; Kaide JI et al, 2001; Wang T et al, 2003*) e incluyen:

- I. Activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs).
- II. Estimulación de canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) activados por potasio ( $\text{K}^{+}$ ).
- III. Síntesis disminuida de mediadores constrictores como endotelina (ET).

La GCs es una hemoproteína citosólica formada por dos subunidades,  $\alpha$  (82 Kda) y  $\beta$  (70 Kda). La forma activa y mayoritaria suele ser un heterodímero, aunque las formas heterodiméricas coexisten en equilibrio con los homodímeros inactivos, quizá como mecanismo de regulación fisiológica (*Zabel U et al, 1999*). El mecanismo bioquímico por el cual ciertos vasorreguladores gaseosos activan

la GCs no se conoce completamente, esta molécula pertenecería a un tercer grupo de hemo-proteínas diferentes a las de transporte de oxígeno o de electrones, que se activaría por la unión del NO o CO y no por la unión de O<sub>2</sub> (Stone JR et al, 1994). Con respecto a la ET, en el papel vasodilatador del CO, cabe destacar que las células del músculo liso vascular derivadas del CO, inhibían la producción de la endotelina 1 (ET-1), uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos (Morita T et al, 1995).



*Acciones de los metabolitos derivados de la hemooxigenasa. (Esquema modificado de Circulation Research: 9, 780, 2009).*

Por su parte, la BV y su derivado reducido BR, actúan como antioxidantes inhibiendo a la NADPH oxidasa (Datla SR et al, 2007), la principal fuente vascular de superóxido, y pueden secuestrar al anión superóxido o activar a la superóxido dismutasa extracelular.

Existen actualmente tres isoformas reconocidas de la enzima hemo-oxigenasa; la isoforma HO-1 que es inducible por el estrés oxidativo, daño

renal, diabetes o por el mismo grupo hemo; la HO-2 es responsable de la actividad de la HO renal en condiciones normales (*Da Silva JL et al, 2001*), se trata de una proteína constitutiva y se encuentra principalmente en el testículo y en el cerebro (*Ewing JF et al, 1992; Chang EF et al, 2003; Leffler CW et al, 2011*). Por último, la HO-3 posee muy poca actividad catalítica y su principal función es la de ser una proteína de unión al grupo hemo (*Ryter SW et al, 2006*).

En el riñón y la vasculatura, la expresión de proteínas HO y/o ARNm para HO se han encontrado en el endotelio y células musculares lisas, arterias preglomerulares e interlobares, asa ascendente de Henle, túbulo distal, túbulo conector, células intersticiales medulares y en células principales del túbulo colector (*Da Silva JL et al, 2001; Hill-Kapturczak N et al, 2002*). La HO encontrada en tejidos renales es catalíticamente activa, ya que en las arterias interlobares renales u homogeneizados de riñón incubados con hemo exógeno producen CO, derivado de la reacción catalizada por la HO (*Kaide JI et al, 2001; Rodríguez F et al, 2004*). Junto a estos hallazgos, se ha demostrado la existencia de CO como resultado de la reacción catalizada por la HO en fluido cortical intersticial y en la orina de animales anestesiados. Estas evidencias experimentales indican que diversas estructuras renales están provistas de un sistema HO activo, que elabora CO y otros compuestos a partir del metabolismo del grupo hemo.

Se ha observado que, en situaciones fisiopatológicas que conllevan un aumento de los niveles de estrés oxidativo, la HO-1 podría inducirse en diversos tejidos, incluyendo el sistema vascular y el cerebro; lo que ha llevado a considerar a la HO-1 como un gen de respuesta temprana (*Foresti R et al, 1999*) que se regula a través del estrés, contribuyendo a la respuesta antioxidante en la región promotora (*Leffler CW et al, 2011*). Entre los factores que inducen la formación de la HO-1 se incluyen el grupo hemo, ciertas metaloporfirinas, algunos metales como el hierro y el cobalto, el óxido nítrico (NO) y de modo importante las especies reactivas del oxígeno (ERO) (*Foresti R et al, 1999; Maines MD et al, 2000; Abraham NG et al, 2002*).

En algunos modelos de daño renal, incluyendo la diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), la inducción de la HO-1 se ha clasificado como una respuesta adaptativa y protectora frente al daño tisular mediado por la producción de la molécula antiinflamatoria CO, o de las sustancias antioxidantes BR y BV, así como por un descenso en la producción del pro-oxidante grupo hemo (*Aizawa T et al, 2000; Abraham NG et al, 2002; Goodman AI et al, 2006; Lee SC et al, 2009; Elmarakby AA e al, 2011*). En este sentido, algunos investigadores han demostrado que la inducción de la diabetes con estreptozotocina (STZ) produce un aumento significativo de la HO-1 en tejido renal (*Aizawa T et al, 2000; Abraham NG et al, 2009*). Sin embargo, existen discrepancias en relación a este hallazgo, puesto que otra serie de trabajos publicados constatan que no hay inducción in vivo de esta proteína en respuesta a la hiperglucemia (*Turkseven S et al, 2005; Goodman AI et al, 2006*).

Por el contrario, la HO-2 es considerada una proteína constitutiva, cuyos niveles son relativamente estables en la mayoría de los tejidos. Ciertos estados fisiológicos y/o fisiopatológicos, tales como la hipoxia y la hipotensión, producen un rápido incremento de su actividad enzimática, pero sin alterar su expresión (*Parfenova H et al, 2003; Leffler CW et al, 2003*). No obstante, cabe destacar que las hormonas suprarrenales pueden inducir su formación actuando sobre la región promotora del gen que regula su transcripción (*Liu N et al, 2000*). Es por ello, que las dos isoformas activas de la HO identificadas anteriormente, difieren en su nivel de expresión, localización y regulación.

### **2.1.2 INTERACCIONES ENTRE EL CO Y NO EN LA VASCULATURA: IMPORTANCIA PARA EL RIÑÓN DIABÉTICO.**

Como hemos mencionado previamente, el óxido nítrico (NO) posee acciones reguladoras de la función hemodinámica y tubular del riñón muy bien estudiadas, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (*Baylis C et al, 1996*). El NO es producido a partir de L-Arginina en una reacción catalizada por diversas isoformas de la NO-sintasa (NOS), todas ellas ampliamente distribuidas en el tejido cardiovascular y renal.

Una gran cantidad de trabajos de investigación han tratado de esclarecer el papel del NO en la diabetes. La mayoría de los estudios realizados coinciden en que las respuestas vasculares mediadas por el NO, su biodisponibilidad y la expresión de las isoformas de la NOS se encuentran alteradas en diversos modelos experimentales de diabetes (*Komers R et al, 2003*). Pese a no formar parte de los objetivos, el análisis de la síntesis del NO, así como sus acciones reguladoras sobre la hemodinámica renal en el riñón diabético pueden ser revisadas en trabajos previos (*Botros FT et al, 2006; Kashihara N et al, 2010*)

Tradicionalmente, el estado de la vía de síntesis del NO en el riñón diabético se restringe a estudios que analizan la expresión tisular de enzimas NOS, la actividad in vitro de la NOS, la medida de sus acciones vasculares directas, o la respuesta a inhibidores de su síntesis (*Komers R et al, 2003; Palm F et al, 2005*). Sin embargo, en este trabajo de Tesis Doctoral, las medidas directas de las concentraciones tisulares de NO serán realizadas mediante el empleo de técnicas electroquímicas, altamente selectivas y específicas, las cuales han sido diseñadas y validadas en nuestro laboratorio por los Dr. García Salom y Fenoy Palacios (*Salom MG et al, 2005; Salom MG et al, 2007*).

Un gran número de evidencias funcionales y moleculares sugieren que el CO y el NO interactúan dinámicamente en la vasculatura (*Foresti R et al, 1999; Thorup C et al, 1999; Jhonson KF et al, 2002; Rodríguez F et al, 2003; Botros F et al, 2006; Salom MG et al, 2007*). En principio, resulta difícil predecir el impacto que tendrían las variaciones de los niveles de NO sobre la actividad del sistema hemo-HO en la diabetes ya que, como se ha demostrado previamente, el NO puede inducir expresión de HO-1 (*Datta PK et al, 1999*), pero también puede disminuir la actividad enzimática de HO-2 (*Ding Y et al, 1996*), y la generación renal de CO (*Rodríguez F et al, 2004*). A su vez, se ha comprobado que el aumento de la HO-1 modula negativamente la expresión de la isoforma inducible de la NOs (*Datta PK et al, 1999*) y que la inhibición crónica de la HO aumenta los niveles de esta proteína en animales diabéticos (*Turkseven S et al, 2005*).

En este sentido, trabajos previos demuestran que la vasoconstricción renal inducida por la administración de inhibidores de la HO, fue intensificada,

tanto in vivo como in vitro, cuando los animales eran previamente tratados con L-Nitro-Arginina-Metyl-Ester (L-NAME) para reducir la síntesis de NO (*Botros F et al, 2006; Jhonson KF et al, 2002; Rodríguez F et al, 2003*). Así mismo, es importante mencionar que la reducción de la producción renal de NO se acompañó de incrementos en la excreción urinaria de CO in vivo y de la actividad enzimática de la HO ex vivo la cual fue revertida por adición de NO exógeno al medio de reacción (*Rodríguez F et al, 2004*). De esta forma, el NO podría funcionar como un inhibidor endógeno de la actividad del sistema HO, y los mecanismos vasodilatadores mediados por CO podrían estar particularmente facilitados cuando la disponibilidad de NO se encuentra reducida.

Todas estas controversias existentes en relación a la expresión de isoformas de HO en el modelo experimental de diabetes por inducción con STZ, así como la poca información existente sobre la producción de NO in vivo en el riñón diabético, nos llevaron a plantear el primer objetivo específico de la presente Tesis Doctoral que fue: *Caracterizar el estado del sistema hemooxigenasa renal en términos de expresión de las isoformas HO-1 y HO-2, y niveles de óxido nítrico in vivo, en una en una fase precoz de DM-1 experimental en ratas SD tratadas con estreptozotocina.*

### **2.1.3 ACCIONES ANTIOXIDANTES Y CITOPROTECTORAS DEL SISTEMA HEMO-HO VASCULAR Y RENAL EN DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

El término estrés oxidativo hace referencia a condiciones en que las células están expuestas a niveles excesivos de radicales libres, ya sea por la producción excesiva o bien por superación de la capacidad antioxidante del organismo (*Koya D et al, 2003*). La mayoría de los radicales que se producen *in vivo* son originados tanto a partir de las especies reactivas del nitrógeno (como el peroxinitrito) y del oxígeno (como el superóxido o el hidroxilo). El peroxinitrito es un poderoso oxidante y citotóxico que se forma por la reacción rápida del anión superóxido con el NO. De esta forma, se cree que la

disponibilidad del anión superóxido juega un papel fundamental en la fisiopatología del estrés oxidativo vascular (*Hsieh HJ et al, 2014*). Además, un exceso vascular de superóxido, con el consiguiente aumento de peroxinitrito y la disminución de NO compromete las funciones endoteliales dependientes de NO, provoca alteraciones estructurales de la pared vascular y daña la integridad de las células (*Balla G et al, 1991; Baylis C et al, 1996; Hsieh HJ et al, 2014*). Por lo tanto, se considera al estrés oxidativo (dependiente de un exceso de superóxido) un componente esencial de la fisiopatología de diferentes enfermedades vasculares incluyendo la disfunción vascular producida en la DM-1 (*Kashihara N et al, 2010*). En este sentido, se ha demostrado que la duración de la diabetes es un determinante importante para la producción de NO en el sistema vascular. Inicialmente puede haber un aumento de la síntesis, seguido por un período de producción normal, y a continuación una disminución de su producción a lo largo de la enfermedad (*Piepers GM et al, 1999*). Los datos experimentales de una gran cantidad de estudios indican que una exposición crónica sostenida a altos niveles de glucosa, suprime la biodisponibilidad de NO (*Komers R et al, 2003*).

Estudios previos han establecido que la inhibición de la síntesis del NO, aumenta la actividad renal de la HO (*Rodríguez F et al, 2004*) y aumenta la relevancia funcional del sistema hemo-HO intensificando la vasodilatación inducida por el CO (*Rodríguez F et al, 2003*) y también la vasoconstricción que acompaña a la reducción de los niveles de NO (*Salom MG et al, 2005; Botros FT et al, 2006; Rodríguez F et al, 2003*). Por lo tanto, las acciones del sistema hemo-HO podrían ser particularmente relevantes para influir en la hemodinámica renal en la DM-1, una condición que combina la sobreexpresión de la isoforma HO-1 (*Hayashi K et al, 2001; Koya D et al, 2003; Rosenberger C et al, 2008*) y la deficiencia de la síntesis o la biodisponibilidad del NO (*Ohisi K et al, 1995; Ishii N et al, 2001; Onozato ML et al, 2002; Komers R et al, 2003; Palm F et al, 2005*). De hecho, se ha considerado que la HO-1 podría ejercer funciones protectoras frente a patologías que cursan con daño oxidativo (*Lhuillier F et al, 2003; Arregui B et al, 2004*), como la diabetes y la insuficiencia renal aguda asociada a procesos isquémicos (*López CE et al, 2001;*

*Arregui B et al, 2004*) degradando el grupo hemo y produciendo CO y bilirrubina. Por ello, se considera que el estrés oxidativo podría representar un punto de convergencia del mecanismo de daño renal asociado a estas patologías. La injuria que puede sufrir el riñón en estos casos, se asociaría a un predominio pro-oxidante respecto de las defensas antioxidantes (*Castillo R et al, 2003*).

Aunque como hemos mencionado anteriormente, se cree que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones renales diabéticas (*Onozato ML et al, 2002, Koya D et al, 2003*), debido en parte a una reducida disponibilidad de NO, la interacción entre el sistema hemo-HO y el estrés oxidativo en la regulación de la función vascular, no está definido en su totalidad. Por lo tanto, resulta especialmente interesante analizar los niveles de estrés oxidativo a través de la formación de peroxinitrito en el riñón de animales diabéticos que recibieron (o no) tratamiento con un antioxidante, el Tempol.

El Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo) es un componente de la familia de los nitróxidos, cuyos efectos han sido ampliamente estudiados en diversos modelos animales. El Tempol reacciona con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estudios recientes han demostrado que los efectos del Tempol sobre el oxígeno eran muy similares a los producidos por la SOD celular, sobreponiéndose a los efectos antioxidantes de las propias vitaminas (*Wilcox CS et al, 2010*). Además, se ha demostrado que su uso puede facilitar el metabolismo de diversas especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Sus propiedades químicas le permiten atravesar todo tipo de membranas celulares, lo que permite su administración por vía oral (*Carroll et al., 2000*).

Por otra parte, también se ha demostrado que en determinadas condiciones, el CO puede inducir paradójicamente la vasoconstricción, relacionada con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (*Lamon BD et al, 2009*). Por lo tanto, el efecto de la inducción del sistema HO sobre la función renal en situaciones de aumento de los niveles oxidativos endógenos (como en el caso del riñón diabético) supone un importante objeto de estudio.

Por todo lo anteriormente mencionado, el segundo objetivo específicos de esta Tesis Doctoral fue diseñado para ***Determinar la importancia de los niveles de estrés oxidativo, sobre el estado del sistema HO renal, y los niveles de NO, en animales control y diabéticos por administración de estreptozotocina, en estadios iniciales de la enfermedad.***

#### **2.1.4 ACCIONES VASOREGULATORAS DEL SISTEMA HEMOOXIGENASA EN CONDICIONES NORMALES Y EN DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

La nefropatía diabética (ND) es una enfermedad renal progresiva que afecta aproximadamente al 35% de los pacientes que sufren diabetes y constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal crónica en el mundo occidental (*Ghanim H et al, 2007; Elmarakby AA et al, 2011*). Entre los mecanismos fisiopatológicos que conducen a ND, los factores hemodinámicos, que incluyen hipertensión glomerular y la activación de diversas hormonas vasoactivas, juegan un papel crucial en los estadios iniciales de la enfermedad renal diabética. Se ha descrito que la enfermedad renal diabética se acompaña de cambios en la presión arterial sistémica y la presión renal, lo que provoca hiperfiltración y un aumento del flujo plasmático renal, observado en las primeras fases de la enfermedad (*O´bryan GT et al, 1997; Forbes JM et al, 2013*). Sin embargo, las alteraciones microangiopáticas son las que producen las alteraciones más graves de la enfermedad. Entre estas alteraciones, destaca el engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular, junto a un aumento de la matriz mesangial (*Tsilibary EC et al, 2003*). Estos mecanismos, en colaboración con factores metabólicos, activan diversas vías moleculares que conducen finalmente a glomérulo-esclerosis, fibrosis tubular intersticial, y fallo renal subsiguiente (*Della VM et al, 2000, Da Silva JL et al, 2001; Abraham NG et al, 2009*).

A nivel molecular, la mayor parte de las vías que han sido implicadas en el daño vascular y renal desencadenado por la hiperglucemia, convergen en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Como ya se ha

mencionado, la inducción de la HO-1 ha demostrado ser un elemento importante de la defensa antioxidante del organismo con acciones protectoras sobre la vasculatura y el riñón en la diabetes experimental de varias semanas (*Abraham NG et al, 2009*).

Una gran cantidad de datos experimentales sustentan el papel regulador de la HO en la hemodinámica renal y la función excretora (*Li N et al, 2007*), que parece ser más importante en condiciones patológicas donde se induce la sobreexpresión de la HO-1 (*Aizawa T et al, 2000; Abraham NG et al, 2009*). Se ha demostrado, que el CO administrado exógenamente produce dilatación de las arteriolas pre-glomerulares aisladas, e incrementa el flujo sanguíneo renal (FSR) y la tasa de filtración glomerular (TFG) en animales anestesiados (*Arregui B et al, 2004; Botros FT et al, 2005; Rodríguez F et al 2003*).

A través de la inhibición farmacológica de la HO, nuestro grupo y otros investigadores, hemos demostramos que la reducción de la actividad de la HO renal genera vasoconstricción, tanto *in vivo* como *in vitro*, la cual es suprimida por la presencia de sustancias donantes de CO (*Arregui B et al, 2004; Rodríguez F et al, 2003*).

Además, la administración de un inhibidor de la HO puede potenciar la vasoconstricción renal, e incluso producir incrementos de presión intra-luminal en arterias renales aisladas (*Rodríguez F et al, 2003; Kaide JI et al 2001*). Todos estos estudios llevaron a considerar al CO como un vasodilatador endógeno que se opone, además, a la vasoconstricción de origen miogénico en la circulación renal. A diferencia de la situación fisiológica, la inducción farmacológica de la expresión de HO-1 atenúa la respuesta autorreguladora de la arteriola aferente, a través de la vía de producción del CO y de la activación de la guanilato ciclasa (*Botros FT et al, 2008*). Conjuntamente a sus efectos vasculares, el CO puede ejercer efectos tubulares directos actuando sobre canales iónicos reguladores del transporte de sodio y fluidos en el asa ascendente de Henle (*Wang T et al, 2003*).

Un ejemplo de compuestos que inhiben la HO son el grupo de las metaloporfirinas, y dentro de ellas la mesoporfirina de estaño cuya función es la de fijarse a la HO más ávidamente que el propio factor hemo, bloqueando de

esta manera el acceso del sustrato natural al punto de fijación de la enzima e inhibiendo así la degradación del factor hemo y por consiguiente la producción de bilirrubina (*Drummond GS et al, 1987*). Puesto que estos compuestos carecen de hierro, no pueden fijar el oxígeno, impidiendo así su transformación mediante una reacción de oxidación en bilirrubina por la enzima HO, lo que provoca que permanezcan intactos hasta su excreción.

En condiciones de DM-1, la sobreinducción de HO-1 parece ser citoprotectora y beneficiosa frente al daño vascular ocasionado por mecanismos que implican la mayor producción de CO, así como los antioxidantes bilirrubina y biliverdina, las cuales secuestran al anión superóxido o activan la superóxido dismutasa extracelular, y con ello contribuyen a la menor disponibilidad del pro-oxidante grupo hemo. Se ha demostrado que la inserción del gen HO-1 humano en células endoteliales atenuó el estrés oxidativo mediado por la glucosa, el daño en el ADN y la muerte celular (*Sacerdoti D et al, 2005*).

Dado que el CO puede promover vasodilatación renal, podría disminuir la reactividad vascular a estímulos miogénicos o vasoconstrictores endógenos e influenciar el transporte tubular renal, es posible suponer que la sobreproducción de CO por el riñón diabético origine cambios hemodinámicos y/o excretores que contribuyen a las anomalías funcionales presentes en estadios iniciales de una DM-1. **Por ello, el tercer objetivo específico de la presente Tesis Doctoral fue *Analizar los efectos sobre la función hemodinámica renal de la inhibición aguda de la actividad de HO, con la mesoporfirina de estaño, en animales control y con una DM-1, en presencia o ausencia de Tempol, para reducir el estrés oxidativo.***

## 2.2 SULFURO DE HIDRÓGENO

Tal y como se ha descrito anteriormente, el CO y el NO desempeñan funciones vitales en situaciones fisiológicas normales y sobre todo en situaciones fisiopatológicas. Sin embargo, en la última década, a estas dos moléculas se les ha añadido una tercera, el sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>).

El SH<sub>2</sub> se sintetiza en gran cantidad de células de mamíferos, y al igual que ocurre con el NO y el CO, sus efectos fisiológicos podrían derivar de la interacción con diversas moléculas de señalización celular (*Toohey JI et al, 1989*).

El papel fisiológico del SH<sub>2</sub> fue propuesto inicialmente en base a que facilitaba la inducción de la potenciación a largo plazo del hipocampo mejorando la actividad de los receptores de N-metil-d-aspartato (NMDA) (*Abe K. Et al, 1996*), regulando el estado redox y manteniendo el equilibrio excitatorio / inhibitorio en la neurotransmisión (*Tripatara P et al, 2008*). Posteriormente, se demostró que el SH<sub>2</sub> también ejercía acciones relajantes sobre el músculo liso vascular al activar los canales de K<sup>+</sup> dependientes de adenosina trifosfato (ATP), y en los que participaba el Ca<sup>2+</sup> (*Mustafa AK. et al, 2011*), así como su implicación directa en la liberación de insulina y la angiogénesis (*Kimura H, 2014*).

Todas estas acciones fisiológicas han sugerido su participación directa en diversos procesos de señalización, sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que ponen de manifiesto sus múltiples efectos fisiológicos, los mecanismos de sus acciones aún no han sido totalmente definidos.

### **2.2.1 GENERACIÓN ENDÓGENA Y METABOLISMO DEL SH<sub>2</sub>.**

El SH<sub>2</sub> es sintetizado endógenamente a partir del aminoácido L-cisteína por las enzimas cistationina β-sintasa (CBS), cistationina γ-liasa (CGL) y en menor medida por la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3-MST) en una gran variedad de tejidos de mamíferos (*Wang R et al, 2002; Tripatara P et al, 2008*). Los sustratos de CBS y CGL son homocisteína y cistationina respectivamente; el sustrato de 3-MST es el 3-mercaptopiruvato, que se produce a partir de L-cisteína (*Wang R et al, 2012; Malgorzata I et al, 2016*).



Otra vía de formación de SH<sub>2</sub> se asocia con la conversión de cistina en persulfuro de cisteína denominada tiocisteína, en una reacción catalizada por la CGL dependiente de piridoxal fosfato y CBS (*Cavallini D et al, 1960*); a su vez la tiocisteína puede ejercer de sustrato para la Rodanasa mitocondrial (tiosulfato sulfurotransferasa) produciendo finalmente SH<sub>2</sub>.

La actividad de estas dos enzimas contribuiría, presumiblemente, a las relativamente altas concentraciones de SH<sub>2</sub> detectadas en tejidos de mamíferos, como producto final de la CBS y la CGL (*Yamamoto et al, 2012*). El SH<sub>2</sub> ejerce, además, un efecto de retroalimentación negativo sobre la actividad de ambas enzimas, por tanto la elevación de la concentración de SH<sub>2</sub> produciría la inhibición de la actividad catalítica de la CGL y de la tasa gluconeogénica a partir de cisteína (*Wang R. et al, 2011*).

Las vías enzimáticas para la producción de SH<sub>2</sub> son específicas de cada tejido. En algunos tejidos la CBS y la CGL coexisten, mientras que en otros, predomina solo una de ellas. En hígado, riñón, intestino delgado, (*Bhatia M et al, 2005*) corazón (*Yang et al, 2008*) y páncreas (*Finkelstein et al, 2003; Yamamoto et al, 2013*), la CGL es la mayoritaria (*Malgorzata I et al, 2016*). Por su parte, la CBS ha sido aislada en el cerebro, hígado, páncreas (*Kaneko et al, 2006*) y riñón (*Yusuf M et al, 2005; Yamamoto J et al, 2013*). Concretamente en el riñón, se ha detectado la presencia tanto de CBS como de CGL, principalmente en los túbulos proximales (*House JD et al, 1997; Ishii et al, 2004*); no obstante, la producción y los mecanismos de acción del SH<sub>2</sub> a nivel renal siguen estando por determinar.

### **2.2.2 ACCIONES FISIOLÓGICAS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO. ALTERACIONES DE SU PRODUCCIÓN.**

Las propiedades fisiológicas del SH<sub>2</sub> endógeno son similares a las de otros transmisores gaseosos. Al igual que el NO, el SH<sub>2</sub> funciona como un factor de relajación derivado de las células endoteliales (*Mustafa AK et al, 2011*).

Las enzimas responsables de la producción del SH<sub>2</sub> han sido analizadas en los sistemas cardiovascular, nervioso, inmunológico, renal, respiratorio,

gastrointestinal, reproductivo, hepático y endocrino (Wang R et al, 2003; Xia M et al, 2009). Por lo que la alteración en la producción del SH<sub>2</sub>, podría contribuir significativamente al correcto funcionamiento de estos sistemas.

La producción endógena de SH<sub>2</sub> parece estar implicada en la neurotransmisión (Wang R et al, 2002), la angiogénesis (*Papapetropoulos A et al, 2009; Bos EM et al, 2013*), la relajación vascular (*Yamamoto J et al, 2013*), la regulación de la actividad proteica (*Mustafa AK et al, 2009*), la proliferación celular y la apoptosis (*Yang G et al, 2004*).

A nivel renal, los efectos del SH<sub>2</sub> se manifiestan principalmente con cambios en la función vascular, así como en las funciones tubulares. Entre las funciones tubulares, se ha observado que el SH<sub>2</sub> podría ser el responsable de promover un aumento de la tasa de filtración glomerular (TFG) y la disminución de la reabsorción tubular de sodio (*Beltowski J et al, 2010*). Dada su implicación en los procesos fisiológicos descritos anteriormente, no es de extrañar que la alteración de su producción sea responsable de una gran variedad de alteraciones metabólicas.

Estudios previos han puesto de manifiesto que la producción endógena del SH<sub>2</sub> podría ser la responsable de la cicatrización de úlceras gástricas (*Wallace JL et al, 2007*). Además, su producción endógena ha demostrado ser capaz de atenuar las lesiones producidas por un infarto de miocardio y mejorar la cicatrización de úlceras en ratones (*Elrod JW et al, 2007*). Recientemente se ha demostrado, que una disminución de los niveles endógenos de SH<sub>2</sub> podría provocar gloméruloesclerosis asociada a hiperhomocisteinemia en ratones (*Sen U et al, 2009*). En este mismo estudio, la administración de NaHS mejoró el daño renal producido en estos animales.

Todo ello proporciona evidencias de que tanto el SH<sub>2</sub> que se sintetiza endógenamente, como el administrado de forma exógena, podría tener un papel crucial en las funciones vasculares (*Zhao W et al, 2001*).

### **2.2.3 ACCIONES DEL SULFURO DE HIDRÓGENO DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

La isquemia-reperfusión (IR) es una de las causas más comunes de fracaso renal agudo. La lesión producida por una IR renal es una condición clínica grave asociada a diversos procesos fisiopatológicos, tales como trasplantes renales, shock hemorrágico, cirugía vascular, nefrectomía parcial o traumatismos severos (*Anaya-Prado R et al, 2002*). Además, está íntimamente asociado a un mal pronóstico, a largo plazo, en lo que a función renal se refiere (*Boom H. et al, 2000*). Recientemente ha sido puesto de manifiesto que la isquemia producida durante un trasplante renal, es responsable del fracaso funcional primario en un 20-30 % de los casos (*Zhibin X. et al, 2009*). Las lesiones producidas por un estado de isquemia reperfusión renal suponen una de las principales causas de insuficiencia renal aguda y están directamente relacionadas con el desarrollo y progresión de enfermedad renal crónica (*Zhibin X et al 2009; Salom MG et al, 2007*).

Las lesiones ocasionadas por una isquemia-reperfusión (IR) se inician con la propia isquemia renal que conduce a la activación de neutrófilos y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (*Salom et al, 2007*). Además, la posterior reperfusión potencia el daño renal mediante el inicio de una respuesta inflamatoria compleja, que implica mediadores vasculares y humorales, lo que contribuye a la necrosis y la apoptosis de las células tubulares renales, el edema celular y la obstrucción tubular renal (*Hosgood SA et al, 2010; Zhu J et al, 2012*). En tejidos isquémicos, la hipoxia aumenta la actividad de la caspasa, la cual provoca la acumulación intracelular de  $Ca^{2+}$  provocando la muerte celular (*Ozbilgin S et al, 2016*).

Trabajos previos han demostrado que el SH<sub>2</sub> puede ser cardioprotector, neuromodulador y protector en ciertas situaciones que cursan con estados de hipoxia prolongados (*Kimura Y et al, 2004; Wang R et al, 2012*). Recientemente, se le han atribuido propiedades protectoras en diversos modelos de isquemia, incluyendo cerebro, intestino, pulmón, hígado y miocardio a través de acciones antioxidantes y antiapoptóticas (*Li L et al, 2006*;

*Bos EM et al, 2012*). Concretamente, se ha observado que la deficiencia o ausencia de los genes relacionados con la CGL en ratones, predisponía a padecer lesiones renales irreversibles tras una IR y que la administración exógena de SH<sub>2</sub> reducía la morbilidad y mortalidad de estos animales (*Tripatara P et al, 2008; Bos EM et al, 2013*).

Diversos estudios han demostrado que el aumento de la producción de ERO producidas durante la isquemia renal, son las responsables de la disfunción endotelial que acompaña al proceso isquémico. Además, en el periodo post-isquémico, el estrés oxidativo puede ser el factor determinante en el deterioro de la función renal (*Salom et al. 2007*). Junto al aumento en la producción de ERO, la activación de ciertas citocinas y quimiocinas (*Kim et al, 2012*) podrían contribuir a la potenciación del daño renal producido por el proceso de isquemia.

Los mecanismos por los cuales la formación de ERO contribuyen a la progresión del daño renal producido tras una IR pueden ser los siguientes: inducen la peroxidación de lípidos, provocan la disfunción de ciertas proteínas, alteran la estructura celular y su integridad, contribuyen a la ruptura del ADN y la producción de ciertas respuestas inflamatorias (*Bonventre JV et al, 1993; Dobashi K et al, 2000; Kim JI et al, 2013*).

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la isquemia renal produce un aumento significativo en las concentraciones de NO medular, el cual se mantiene durante la isquemia y retorna a niveles pre-isquémicos durante la reperfusión (*Salom MG et al, 2005*). Estos trabajos han concluido que la isquemia renal va acompañada de un aumento de las ERO, que son los responsables de la inactivación del óxido nítrico (NO) y la formación de peroxinitrito, para finalmente producir la disfunción endotelial característica de este proceso (*Salom et al, 2007*).

El tratamiento exógeno con SH<sub>2</sub> podría inducir un estado hipometabólico, similar al producido en un estado de hibernación (*Bos EM et al, 2009*). El mecanismo involucrado en este caso, sería la reducción de la actividad mitocondrial mediante la unión reversible al citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria, reduciendo así el consumo de oxígeno mitocondrial y su potencial

de membrana (Yong R et al, 2001; Elrod JW et al 2007). A su vez, la menor demanda de oxígeno tras el tratamiento con SH<sub>2</sub> podría ser el responsable de los efectos protectores que se le atribuyen a esta sustancia en procesos de IR (Elrod JV et al, 2007; Bos et al, 2009).

Además, el SH<sub>2</sub> administrado exógenamente podría desempeñar una función desintoxicante durante el estrés oxidativo neutralizando la formación de ERO y especies reactivas de nitrógeno, propias de un proceso isquémico mediante la recuperación de los niveles de glutatión (Kimura Y et al, 2010; Bos EM et al, 2012) e incluso por eliminación directa de las ERO producidas en las mitocondrias, junto a la supresión del aumento excesivo de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Kimura Y et al, 2013; Kimura H. 2014). Aún con todo ello, el papel del SH<sub>2</sub> durante la IR renal sigue estando por esclarecer.

Con estos antecedentes, ***se plantea el objetivo de analizar el papel del SH<sub>2</sub> y sus vías enzimáticas tras una isquemia reperusión renal.***

#### **2.2.4 DETECCIÓN ENDÓGENA DE LAS CONCENTRACIONES DE SULFURO DE HIDRÓGENO.**

La determinación de las concentraciones de SH<sub>2</sub> es fundamental para analizar la contribución de este transmisor gaseoso en la isquemia renal, así como la correlación de sus niveles con los cambios fisiopatológicos observados.

El rango fisiológico en condiciones normales ha sido estimado entre 10-100 µM, tanto en animales como en humanos (Hyspler R et al, 2002; Wang R et al, 2012). Sin embargo, otros estudios afirman que los niveles de sulfuro plasmático muestran valores inferiores a 0,55 µM (Sparatore A et al, 2009) e incluso algunos autores han sido incapaces de detectar SH<sub>2</sub> en sangre mediante sensores polarográficos (Whitefield NL et al, 2008). Conviene destacar, que estos sensores detectan únicamente gas libre, por lo que los valores obtenidos podrían ser más bajos que los reales.

Las discrepancias entre los estudios realizados con los sensores polarográficos, han provocado que actualmente se utilicen electrodos específicos para detectar iones azufre. Estos electrodos tienen un límite de

detección de 1-10 $\mu$ M. Además, son capaces de detectar el azufre total incluyendo sus formas ácidas, unidas o libres. Esta cualidad, los hace adecuados para mediciones en sangre, tejidos y medios de cultivo (*Wang R et al, 2012*). Por ello, la presente Tesis Doctoral *propone como objetivo, la medida in vivo de los niveles renales de SH<sub>2</sub> mediante un microelectrodo selectivo.*



**HIPÓTESIS**



### **3. HIPÓTESIS**

- La activación del sistema hemooxigenasa, principalmente a través de la inducción de la HO-1, derivada de los altos niveles de estrés oxidativo, contribuye a la regulación de la hemodinámica renal en la disfunción renal asociada a una diabetes tipo-1.
- La isquemia renal induce un incremento de los niveles tisulares de SH<sub>2</sub>, que puede prevenir del fallo renal agudo subsecuente a una isquemia-reperusión renal.



# OBJETIVOS



## 4. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral, fue analizar la importancia funcional del sistema Hemooxigenasa (HO) y de la ruta biosintética que conduce a la producción de SH<sub>2</sub>, como parte de los mecanismos que contribuyen a la regulación de la hemodinámica renal en dos modelos experimentales de disfunción renal: diabetes mellitus tipo-1 (DM-1) e isquemia/reperfusión renal.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- I. Caracterizar el estado del sistema hemooxigenasa renal en términos de expresión de las isoformas HO-1 y HO-2, y niveles de óxido nítrico, en una en una fase precoz de DM1 experimental en ratas SD tratadas con estreptozotocina.
- II. Determinar la importancia de los niveles de estrés oxidativo, sobre el estado del sistema HO renal, y los niveles de NO *in vivo*, en animales control y diabéticos por administración de estreptozotocina, en estadios iniciales de la enfermedad.
- III. Analizar los efectos sobre la función hemodinámica renal de la inhibición aguda de la actividad de HO, con la mesoporfirina de estaño, en animales control y con una DM-1, en presencia o ausencia de Tempol para reducir el estrés oxidativo.
- IV. Determinar *in vivo* los niveles de sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) generados en la corteza del riñón izquierdo, durante una isquemia renal de 45 minutos y una reperfusión de 60 minutos.
- V. Evaluar el papel del SH<sub>2</sub> y, de las vías enzimáticas responsables de su síntesis, en el fallo orgánico subsiguiente a una isquemia/reperfusión renal.



**MATERIAL  
Y  
MÉTODOS**



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Para todos los protocolos experimentales se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley (SD) con pesos comprendidos entre  $270 \pm 30$  gr, procedentes del animalario de la Universidad de Murcia. Estas ratas se mantuvieron con una dieta estándar y libre acceso al agua de bebida, en un ciclo constante de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los protocolos experimentales cumplen lo dispuesto en la normativa legal vigente sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como su explotación, transporte y sacrificio (Real Decreto 53/2013) aprobados en las Directivas Europeas vigentes (Directiva 2010/63/CE). Los procedimientos de experimentación que aquí se incluyen, están aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

### **5.2 INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

Como herramienta para el estudio de los factores hemodinámicos que participan en el origen y progresión de la enfermedad renal diabética, utilizamos un modelo de diabetes experimental insulino-dependiente que implica la administración de un tóxico específico de las células beta pancreáticas, la estreptozotocina (STZ). Este modelo reproduce la mayoría de los cambios estructurales y funcionales de la diabetes renal. Para ello, se les administró por vía intravenosa una solución de STZ (65 mg/kg) (*Carbonell LF et al., 1987*) en dosis única disuelta en citrato sódico (Sigma Aldrich, Co) a pH= 4,5, o bien únicamente este último (vehículo).

Además, se monitorizaron la comida y bebida diaria ingerida por los animales durante todo el procedimiento (Tablas 1).

Para evaluar el papel del estrés nitrosativo, tras 48 horas desde la administración de STZ o del vehículo, las ratas control y diabéticas, recibieron un tratamiento crónico con un análogo de la enzima superóxido dismutasa (SOD) durante 12 días, el 4-hidroxi-tempo (Tempol, 1 mmol / l, en el agua de bebida) (*Chen YJ et al, 2008*). Dado que la ingesta de agua fue mayor en los animales diabéticos que en los animales control, se ajustó la concentración de Tempol en el agua de bebida, para igualar la dosis con respecto a los animales control ( $33,5 \pm 0,7$  mg / día, n=11 en ratas control y  $34,5 \pm 0,3$  mg / día, n = 14, en ratas diabéticas).

### **5.2.1 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE.**

Para controlar los niveles de glucemia y evitar la cetosis en las ratas tratadas con STZ, se realizaron controles diarios de glucosa en sangre mediante un medidor comercial (Breeze 2, Bayer, España). Para ello, la muestra de sangre se tomó de la cola y cada vez que se realizó una medición de glucemia capilar se siguió la misma secuencia: apertura del glucómetro para introducir el disco con las tiras reactivas, extracción de la tira que se iba a usar, introducción de la lanceta, punción en la cola presionando el botón azul y absorción de la sangre por capilaridad. El glucómetro utilizado únicamente permitía mediciones de 10 a 600 mg/dl de glucosa en sangre.

El funcionamiento del glucómetro consiste en que la sangre penetra por capilaridad en la tira reactiva hasta el conducto interno, donde se encuentra el reactivo. A través de un microvoltaje generado por el medidor, se produce la reacción química de la sangre con la enzima de la tira reactiva (glucosa oxidasa y ferrocianuro de potasio); esta enzima oxida a la glucosa presente en la muestra, generando una corriente de electrones hacia el medidor, proporcional a la cantidad de analito (glucosa) generando un valor numérico en mg/dl.

### **5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c).**

Además de realizar controles glucémicos diarios, se midió la HbA1c el día del sacrificio para obtener el nivel promedio de glucosa en sangre durante los 14 días de diabetes. Se trata de un importante marcador del estado metabólico a largo plazo en pacientes diabéticos y puede usarse como método fiable para su detección (*Bode BW et al, 2007*). La HbA1c es el resultado de una reacción lenta, no enzimática e irreversible relacionada con la concentración de glucosa en sangre y la vida media del eritrocito (de 90 a 120 días en el humano y de 45 a 50 días en la rata). En esta reacción no mediada por enzimas, se produce una unión entre la hemoglobina del eritrocito y la glucosa circulante. Por ello, su concentración plasmática es estable y directamente proporcional a la concentración de glucosa (*Giller Y et al, 2013*). De este modo, la prueba nos permite obtener el nivel promedio de glucemia durante los últimos 45 a 50 días en ratas, no requiriendo un estado de ayuno previo y presentando una baja variabilidad individual (*Bode BW et al, 2007*).

La medición se efectuó empleado un dispositivo AC1Now+ (Bayer, España) que utiliza el método de cromatografía líquida (HPLC) para el análisis (*Weykamp CW et al, 1993*). La muestra se tomó de la parte distal de la cola de las ratas y se utilizaron los componentes del kit AC1Now+ siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se llenó el colector de sangre por capilaridad, se introdujo en el cuerpo del muestreador, que contenía ferrocianuro en una solución de detergente amortiguada, y se agitó de 6 a 8 veces. Una vez mezclada la sangre con la solución, se colocó verticalmente sobre una superficie plana durante 2 minutos. Posteriormente, el cartucho, con anticuerpos contra HbA1c, se insertó en el monitor. Se retiró la base del muestreador, para depositarla sobre el cartucho y comenzar el análisis. El resultado se obtuvo tras 5 minutos.

### **5.3 EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA HEMO-OXIGENASA RENAL.**

Tras 14 días desde la inyección de la STZ (65mg/kg IV), se extrajeron los riñones de cada rata, separándose corteza y médula renal. Para ello, se descapsuló el riñón cuidadosamente, mediante unas pinzas de punta fina. Posteriormente se realizaron cortes transversales con una hoja de bisturí. Con la ayuda de un microscopio (Olympus SZ-40) y unas tijeras especializadas, se separó cada una de las partes.

Una vez obtenidas la corteza y la médula renal se mantuvieron en una solución fría de PBS y se conservaron a -80°C. Para determinar la expresión de la HO-1 y la HO-2, se determinó la concentración de proteínas y se realizó un Western Blot (apartado 5.4).

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague Dawley control de tres meses de edad(HO-1, n=11; HO-2, n=12)
- 2) Ratas Sprague Dawley control tratadas con Tempol (1mM) en agua de bebida durante 12 días (HO-1, n=4; HO-2, n=4).
- 3) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir la diabetes tipo-1 (HO-1, n=11; HO-2, n=12).
- 4) Ratas Sprague –Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir la diabetes tipo-1 y suplementadas con Tempol (1 mMol) (HO-1, n=11; HO-2, n=9).

## **5.4 ELECTRO-INMUNOTRANSFERENCIA ( WESTERN BLOTTING).**

### **5.4.1 EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE TEJIDO.**

El nivel de expresión de enzimas será analizado en el tejido cortical renal de animales control y tras el tratamiento con STZ. Tras su recogida, los tejidos serán conservados a  $-80^{\circ}$  en nitrógeno líquido, para su posterior homogenización y determinación. Se utilizarán anticuerpos específicos para los niveles de expresión de la HO-1 y la HO-2.

El día de su procesado, el tejido cortical renal se homogeneizó en solución fría de RIPA buffer que contiene 50 mM de NaCl, 1,0% de IGEPAL CA-630, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, 50 mM de Tris a pH 8,0. Las proteínas del tejido cortical aislado fueron extraídas por homogenización en Tris-HCl buffer a pH 7,4 conteniendo 1% NP-40, 0,25% deoxicolato sódico, 1mmol/L EDTA y 10% de un inhibidor de proteasas y PMSF 1mM (Sigma Aldrich, Saint-Louis, EEUU). Los homogeneizados fueron entonces centrifugados (10,000g durante 30 min) y los sobrenadantes procedentes de la corteza y médula renal, fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

### **5.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

El ensayo realizado está basado en el método Bradford (1976) y consistió en determinar la concentración de proteínas solubles. Para ello, adicionamos un colorante ácido, Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad) a la solución de proteínas. La absorbancia máxima para una solución ácida del colorante de Coomassie cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión con las proteínas. El colorante de Coomassie se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina. Posteriormente, comparamos los resultados obtenidos con una curva estándar obteniendo una medición relativa de la concentración de proteínas.

### 5.4.3 ELECTROFORESIS.

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis reductora en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se utilizó una cubeta de electroforesis vertical, usando geles al 12,5% (Criterion Precast Gel). Para que los resultados fueran comparables, se cargó la misma cantidad de proteínas por calle para todas las muestras objeto del estudio. La cantidad de proteína establecida fue de 40 µg prot/calle. A estas se añadió una cantidad de tampón de carga, correspondiente a una dilución 1:2 con respecto a la cantidad de proteína. El tampón de carga se preparó a una concentración de 0,5% de mercaptoetanol en buffer Laemmli (Biorad Technologies) para la desnaturalización proteica. Además, se añadió un marcador de precisión colorimétrico para la detección de proteínas (BioRad technologies), cuyo rango óptimo era entre 10-250 kD.

Una vez añadido el marcador y todas las muestras, se reservó una calle para el control positivo. En el caso de la HO-1, se consideró una disolución compuesta por un 10% de proteína, 50 % del tampón de carga y 40 % de agua destilada como dicho control. En el caso de la HO-2 se utilizó una dilución 1:1 de proteínas y tampón de carga (*Rodríguez F et al, 2003; Roddríguez F et al, 2004*).

Posteriormente, se calentaron las muestras durante 5 minutos a 90°C. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras estaban listas para ser cargadas en el gel o bien ser guardadas a -80°C para ensayos posteriores.

Seguidamente se montó la cubeta de los geles y se vertió el tampón de electroforesis (Running Buffer), compuesto por Tris 50mM, glicina 384mM y SDS al 2% hasta cubrir prácticamente los geles pero sin que hubiera comunicación entre los compartimentos interior y exterior. Se separaron las proteínas conectando los electrodos a una fuente eléctrica y se separaron las muestras aplicando un voltaje constante (200mV). La separación se detuvo en el momento en que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

#### **5.4.4 TRANSFERENCIA WESTERN BLOTTING Y DETECCIÓN INMUNOQUÍMICA.**

Tras su separación en gel, las muestras se transfirieron mediante un sistema húmedo a membranas Inmuno-Blot de PVDF previamente activadas en metanol y finalmente en agua destilada. La transferencia se realizó en frío, a 400mA durante 1,5 horas en una cubeta de transferencia Trans-Blot (BioRad), utilizando un tampón de transferencia preparado de la siguiente forma: 70% de agua destilada, 20% de metanol y 10% de tampón transferencia 10X (30,3g de Tris HCl y 136,75 g de glicina en 500 ml de agua destilada).

Una vez concluida la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C en TBS-T (0,05%) con 5% de leche desnatada en polvo y en agitación.

Finalizado el bloqueo, se incubó la membrana con los anticuerpos primario y secundario en TBS-T con leche desnatada en polvo al 5%, a temperatura ambiente durante 1 hora y con agitación continua; los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpos específicos de la HO-1 (Enzo Life Sciences) y HO-2 (MBL international). Como control de carga se empleó la actina.

Finalmente se reveló la membrana utilizando un kit de bioluminiscencia, ECL Plus (Amersham Biosciences. Little Chalfont, UK). Las películas fueron analizadas por un scanner de imagen de modo variable Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) y las bandas de proteínas fueron cuantificadas mediante densitometría, usando el software Scion Image.

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>	<b>DETECCIÓN</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
<i>Ratón Anti-OH-1, monoclonal. Isotipo IgG2b</i>	HO-1	1/1000	Enzo Life Sciences
<i>Conejo Anti-OH-2, policlonal (36kDa)</i>	HO-2	1/1000	MBL international corporation
<i>Ratón monoclonal Isotipo IgG2b</i>	Péptido amino terminal de $\beta$ -actina	1/3000	Fisher Scientific

<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
<i>Anti-ratón IgG, Fab 2 (cabra)</i>	1/2000	Enzo Life Sciences
<i>Anti-conejo IgG peroxidasa policlonal (cabra)</i>	1/2000 (HO-1) y 1/4000 ( $\beta$ -actina)	Sigma Aldrich

### 5.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RENAL DE NITROTIROSINA.

Dado que el NO y el anión superóxido reaccionan rápidamente para dar peroxinitrito y que dentro de sus acciones se encuentra la nitrosilación de residuos de tirosina de las proteínas, la elevación de nitrotirosina en tejidos se ha utilizado habitualmente como un índice indirecto de estrés oxidativo debido

a la formación de peroxinitrito (Rodríguez F et al, 2010). Para la medida de la nitrotirosina renal en homogenizados de corteza y médula, se cuantificó la cantidad de proteínas nitrosiladas como indicador de la formación de peroxinitritos, empleando un test ELISA para nitrotirosina (Hycult biotechnology; Uden, The Netherland). La nitrosilación del aminoácido tirosina se produce tanto para la tirosina libre como para la tirosina unida a proteínas.

El test ELISA es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima en fase sólida. Las muestras de tejido cortical y medular, se incuban en los pocillos. En estos está presente un anticuerpo con biotina que enlaza con la nitrotirosina. A su vez, el conjugado estreptavidina-peroxidasa se unirá igualmente al anticuerpo biotinilado y reaccionará con el sustrato, la tetrametilbenzidina (TMB). La reacción enzimática se detiene mediante la adición de ácido cítrico.

Previamente a la realización del ensayo, se determinó la cantidad de proteínas presentes en cada una de las muestras que se analizaron (apartado 5.4.2), procedentes de la médula y la corteza renal. A continuación, se añadió a cada uno de los pocillos una cantidad conocida de proteína, así como el anticuerpo con biotina en proporción 1:1. Una vez transcurrido el tiempo necesario para que tuviera lugar la reacción, se fueron añadiendo la estreptavidina y la TMB. Posteriormente, se midió la absorbancia a 450 nm. Representando la absorbancia a esta longitud de onda, frente a las correspondientes concentraciones (logaritmo), se obtuvo una curva estándar que nos permitió obtener los valores de nitrotirosina renal (pmol/mg de proteína).

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague Dawley control de tres meses de edad (n=12).
- 2) Ratas Sprague Dawley control tratadas con Tempol (1mM) en agua de bebida durante 12 días (n=9)
- 3) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir diabetes tipo-1 (n=8).

- 4) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir diabetes tipo-1 y suplementadas con Tempol (1 mMol) (n=11).

## **5.6 MEDIDA IN VIVO DE LA CONCENTRACIÓN CORTICAL RENAL DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).**

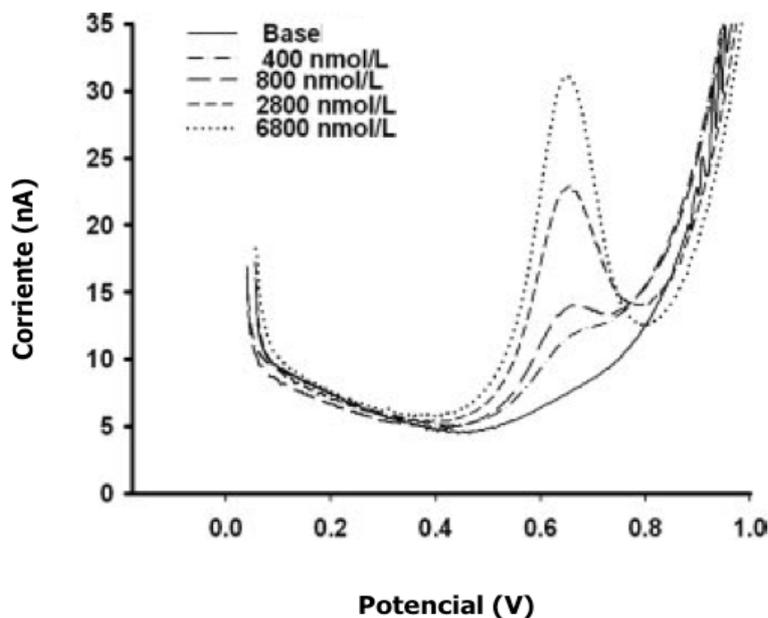
### **5.6.1 CALIBRACIÓN DEL MICROSENSOR DE ÓXIDO NÍTRICO.**

Las medidas de NO en la corteza renal se obtuvieron mediante un electrodo previamente calibrado. Para ello se empleó un sistema de tres electrodos; el sensor de NO ejercía como el electrodo de trabajo, un fino alambre de platino como electrodo auxiliar y un alambre de Plata/ Cloruro de plata fue empleado como electrodo de referencia. Se utilizaron los siguientes parámetros con respecto a la voltametría diferencial de doble pulso: el rango del potencial de 0,0-1,0 V, la velocidad de barrido de 10mV/s, el pulso 1 de 50mVx60ms, el pulso 2 de 80mVx60 ms, la duración del pre-pulso de 100ms y el tiempo de reposo de 180ms. Bajo estas condiciones, las soluciones de NO producen un pico de oxidación a 650mV.

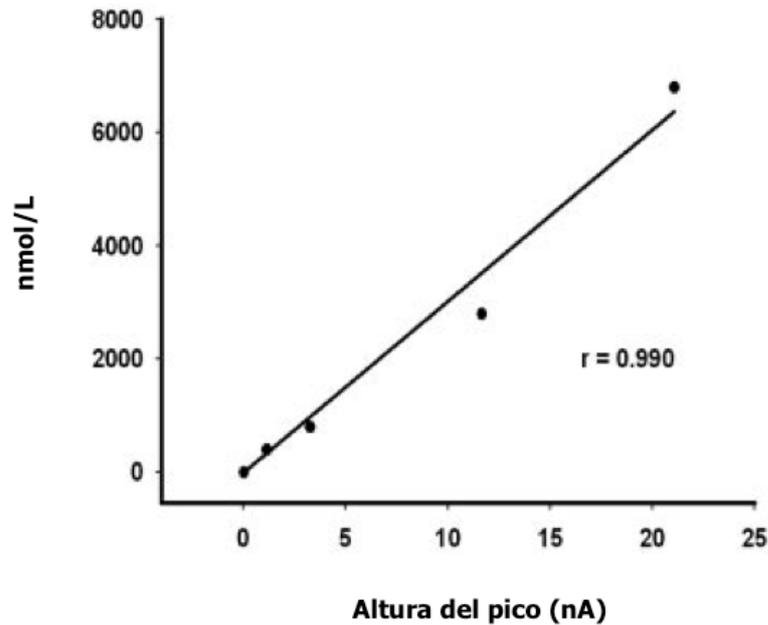
Las fibras de carbono (30 micras; Textron) estaban sujetas a un alambre de cobre con pegamento de plata, acoplado a través de la apertura de una micropipeta de vidrio y sellado mediante resina epoxi. A continuación, los electrodos fueron sometidos a una fuente calor controlado a 50° C durante 24 horas. Una vez realizado el montaje, se les aplicó una corriente de onda triangular (70 Hz, 2,5 V / 30 s) seguido de un potencial constante (1,6 V / 20 s) en una disolución de PBS con un pH de 7,4. Posteriormente, las puntas de los micro-electrodos se cubrieron con seis capas de Nafion (5% en alcoholes alifáticos; Sigma Aldrich). Por último, se introdujeron las puntas en una disolución de diclorhidrato de o-fenilendiamina (5 mmol / l en 0,1 M PBS) y a su vez se aplicó un potencial constante (0,9 V vs. referencia Ag / AgCl durante 120 s).

Estudios previos han demostrado que estos micro-electrodos son altamente específicos y selectivos para las medida NO (*Pontie M et al, 2000*). La corriente de oxidación del NO específica se detecta a un potencial de 0,65 V y la altura del pico es proporcional a la concentración de NO en el medio.

Estos sensores se calibraron usando una solución de PBS NO-saturada en condiciones anaerobias a 37 ° C. Esta técnica se ha validado previamente en nuestro laboratorio para medir los niveles de NO tejido renal (*Salom MG et al, 2005*). Para medir NO renal, se manipuló, mediante un microforceps, una pequeña porción de la cápsula renal (<1 mm<sup>2</sup>), de manera que el micro-electrodo se insertó directamente en la corteza renal a una profundidad de 1-1,5 mm, sin hemorragia visible. El electrodo de referencia y los electrodos auxiliares se colocaron en el soporte renal, en estrecho contacto con el riñón, y se bañaron en PBS caliente a 37 ° C (*López B et al, 2003; Salom MG et al, 2005*).



**Calibración típica de un microelectrodo de óxido nítrico (NO): registros voltamétricos obtenidos con concentraciones crecientes de una solución de NO pura (*Salom MG et al, 2005*).**



Recta de calibración y coeficiente de correlación lineal calculado utilizando el valor del pico de la altura media obtenido a partir de 3 curvas consecutivas, que preceden a la inyección de cada una de las diferentes concentraciones de NO utilizadas para la calibración del electrodo (Salom MG et al, 2005).

### **5.6.2 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN CORTICAL RENAL DE NO EN ANIMALES CONTROL Y DIABÉTICOS TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON TEMPOL.**

Las ratas se prepararon quirúrgicamente siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado 5.7. A continuación, se realizó una laparotomía y se apartó el paquete intestinal, de manera que quedara expuesto el riñón izquierdo. Posteriormente, el riñón se colocó en una copa de metacrilato, donde se acomodó e inmovilizó con la ayuda de suero salino atemperado. Mediante el uso de un micromanipulador (Kanetec), se insertó en la corteza renal un microelectrodo de fibra de carbono selectivo para el NO. El sensor estaba conectado a un potencióstato (ISO-NO Mark II, WPI) y a su vez a un sistema de adquisición de datos computerizado. Esta técnica de medida de NO mediante voltimetría diferencial, ha sido validada previamente en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Salom MG et al, 2005).

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague Dawley control de tres meses de edad (n=10).
- 2) Ratas Sprague Dawley control tratadas con Tempol (1mM) en agua de bebida durante 12 días (n=8)
- 3) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir la diabetes tipo-1 (n=10).
- 4) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg) para inducir la diabetes tipo-1 y suplementadas con Tempol (1 mMol) (n=4).

### **5.7 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO GENERAL PARA DETERMINAR LA FUNCIÓN HEMODINÁMICA RENAL EN RATAS ANESTESIADAS.**

Previamente a la intervención, los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas pero sin limitación en el acceso al agua de bebida. Las ratas fueron pesadas y anestesiadas mediante una inyección intramuscular de ketamina (Ketamidor RichterPharma) a razón de 30 mg/kg y Tiopental (Braun Vetcare) por vía intraperitoneal (50 mg/kg); posteriormente se les rasuró la zona abdominal, la parte anterior del cuello y la zona inguinal. A continuación se les colocó en una mesa termostatzada para mantener estable la temperatura corporal en torno a los  $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; la temperatura se monitorizó durante todo el procedimiento mediante el uso de un termómetro digital ubicado en el recto. Por último, las extremidades se fijaron a la tabla con el objeto de facilitar la cirugía.

Se realizó una traqueotomía mediante una incisión longitudinal en la línea media de la cara anterior del cuello, se separaron los haces musculares y se accedió a la tráquea; tras su disección se realizó un corte entre dos anillos traqueales, por donde se introdujo una cánula de polietileno (2mm de diámetro

interior) con el fin de mantener libre la vía respiratoria y evitar el acúmulo de secreciones.

A continuación, se realizó una incisión en la zona inguinal izquierda, y se separó la grasa subcutánea por disección roma, de manera que quedaran expuestas la arteria y la vena femoral, rodeada de algunas fibras nerviosas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus SZ-40), un iluminador de luz fría (Euromex EK-1) y unas pinzas de punta roma se disecaron, separando cuidadosamente el paquete vasculo-nervioso de sus fascias y aislando vena y arteria. La arteria se rodeó por tres hilos de sutura de lino 4-0 (LorcaMarin, España). Uno de los hilos se anudó distalmente, otro se tensó proximalmente para cortar el flujo sanguíneo y el último se anudó, sin llegar a apretarlo totalmente, y se dejó junto al situado en posición distal. Se realizó un pequeño corte en la arteria y mientras se abrió con unas pinzas uno de sus labios, con otras se introdujo en el orificio un catéter de polietileno (580  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 965  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, 15cm de longitud y con el extremo a insertar adelgazado por calor), previamente lleno de solución salina isotónica heparinizada (heparina Rovi S.A. 10 U.I./ml), se anudó a su alrededor el último hilo de sutura, se liberó el hilo proximal que cortaba el flujo sanguíneo y con la ayuda de dos pinzas se hizo progresar el catéter hasta situarlo en la íliaca común o final de la aorta abdominal. El catéter se conectó a un transductor de presión (Minebea 2412PS, USA) el cual estaba unido a un sistema computerizado de medida de la presión arterial; mediante este catéter, se pudo monitorizar el hematocrito del animal a lo largo de todo el experimento, además de obtener muestras de plasma arterial. Una vez se comprobó la correcta ubicación del catéter, su permeabilidad, así como una óptima señal de presión, se anudaron completamente las ligaduras alrededor del mismo para fijarlo y evitar movimientos indeseados.

El mismo procedimiento se siguió con la vena femoral derecha. En este caso, el catéter (580  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 965  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, 15cm de longitud ) se conectó a una bomba de jeringa (ProSense NE-1000) a través de la cual los animales comenzaron a recibir, desde el mismo momento

de la cateterización, una infusión salina isotónica (Grifols, cloruro sódico 0,9%) con un 2 % de albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich Co.) y con <sup>3</sup>H-inulina (New England Nuclear, 1 $\mu$ Ci/mL) para la obtención de los valores de tasa de filtración glomerular (TFG) tal y como se describió en trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio (*López B et al, 2001; Rodríguez F et al, 2003*).

Posteriormente, se efectuó una incisión longitudinal en el abdomen, desde el apéndice xifoides hasta la altura de la vejiga urinaria. Después se llevó a cabo otra incisión en sentido transversal, en la hemipared izquierda, a la altura de la parte inferior de la parrilla costal. Para evitar hemorragias que pudieran dificultar el procedimiento, se ligaron con una sutura quirúrgica estéril de 2-0 (LorcaMarin, S.A.) los vasos costales que discurrían por dicha zona. Para facilitar la manipulación de la zona renal izquierda, el paquete intestinal se introdujo por debajo de la hemipared derecha, envolviéndolo en una gasa impregnada con suero fisiológico. Se realizó un corte en la cúpula vesical para que el riñón derecho pudiera drenar. Con el fin de obtener muestras de orina, se realizó un fino corte en la parte superior de la vejiga urinaria drenando la orina existente. A continuación, se introdujo un catéter de polietileno de 580  $\mu$ m de diámetro interno, 965  $\mu$ m de diámetro externo, 15cm de longitud y con el extremo a insertar sometido al calor para una mejor adaptación. Una vez situado en el interior de la vejiga, se inmovilizó con lino 4-0 y se comprobó su permeabilidad. En la arteria renal izquierda se ajustó una sonda electromagnética (Transonic Flowprobe, NY, USA) conectada a un fluxómetro que midió el flujo sanguíneo renal.

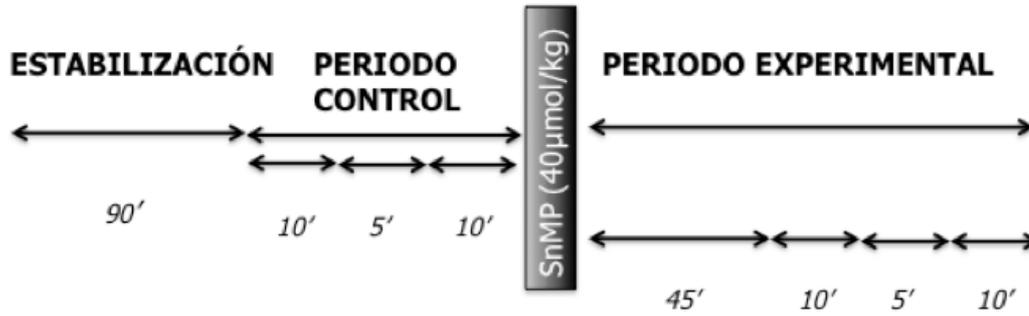
Una vez finalizada la preparación quirúrgica, mediante tubos de microhematocrito heparinizados (longitud: 75 $\pm$ 1 mm, diámetro interno: 1,15 $\pm$ 0,05 mm, diámetro externo: 1,55 $\pm$ 0,05 mm), se extrajeron 3 muestras de sangre arterial para valorar el hematocrito. En caso de hemoconcentración, se corrigió mediante administración de albúmina de suero bovino al 6 % por la vena femoral (aproximadamente 0,5 mL de albúmina por cada punto de hematocrito) y se ajustó en torno a un 44%.

## **5.8 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA HO EN LA FUNCIÓN HEMODINÁMICA RENAL DE RATAS ANESTESIADAS CONTROLES Y DIABÉTICAS, POR ADMINISTRACIÓN DE STZ .**

Para analizar los cambios en los parámetros hemodinámicos renales se realizaron experimentos de función renal en los grupos de ratas macho controles y diabéticas, con y sin tratamiento crónico de Tempol, a través del agua de bebida (1 mmol/L). Para ello se procedió de manera similar a la preparación quirúrgica general descrita anteriormente y tras el correspondiente periodo de estabilización postquirúrgico, se administró por vía intravenosa mesoporfirina de estaño (SnMP, Frontier Scientific) a una dosis de 40  $\mu$ moles/kg (Rodríguez F et al, 2003). Se ha demostrado que las metaloporfirinas que inhiben la HO, disminuyen el flujo sanguíneo medular renal en ratas normales (Zou AP et al, 2000) y el flujo sanguíneo renal total en ratas con hipoxia crónica (O'Donoghuy TL et al, 2000). Estos hallazgos sugieren que los productos de la reacción catalizada por la HO, podrían contribuir a los mecanismos vasodilatadores renales.

Para la utilización de la SnMP, se preparó una disolución de ésta en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  , a una concentración de 50 mmol/L (Sigma Aldrich, Co). A continuación se aplicaron ultrasonidos para evitar precipitados, junto a una filtración clarificante justo antes de su uso. Debido a la fotosensibilidad de las porfirinas, se prepararon soluciones SnMP y se realizaron los experimentos bajo condiciones de luz reducida (Rodríguez F et al, 2003).

Una vez terminado el procedimiento quirúrgico, se procedió a un periodo de estabilización de 90 minutos. Durante el cual, se monitorizó el hematocrito de la rata y la PAM. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos aclaramientos renales control de 10 minutos, con 5 minutos de diferencia entre ellos. A continuación, se administró la SnMP por vía intravenosa (40  $\mu$ moles/kg). Transcurridos 45 minutos, tiempo suficiente para que el compuesto ejerciera su efecto, se realizaron dos aclaramientos renales experimentales de manera similar a los que se realizaron durante el periodo control.



**Protocolo experimental para la determinación de la función renal tras la inhibición de la HO por administración de mesoporfirina de estaño (SnMP, 40 μmoles/kg).**

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague–Dawley control anestesiadas y con administración intravenosa de vehículo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ( 50mM), (n=7). *Grupo 1.*
- 2) Ratas Sprague Dawley control anestesiadas y con administración intravenosa de SnMP ( 40μmol/kg), (n=11). *Grupo 2.*
- 3) Ratas Sprague Dawley control anestesiadas y con administración intravenosa de SnMP ( 40μmol/kg), sometidas durante los 12 días previos a la administración de Tempol (1mMol) en el agua de bebida (n=8). *Grupo 3.*
- 4) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg), anestesiadas y con administración intravenosa de vehículo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ( 50mM), (n=8). *Grupo 4.*
- 5) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg), anestesiadas y con administración intravenosa de SnMP ( 50μmol/kg), (n=8). *Grupo 5.*
- 6) Ratas Sprague Dawley tratadas con STZ (65 mg/kg), anestesiadas y con administración intravenosa de SnMP (

50 $\mu$ mol/kg), sometidas durante los 12 días previos a la administración de Tempol (1mMol) en el agua de bebida (n=8). *Grupo 6.*

## **5.9 ESTUDIO DE LAS ACCIONES DEL SULFURO DE HIDRÓGENO SOBRE LA FUNCIÓN RENAL.**

### **5.9.1 CALIBRACIÓN DEL MICROELECTRODO SELECTIVO PARA EL SULFURO DE HIDRÓGENO.**

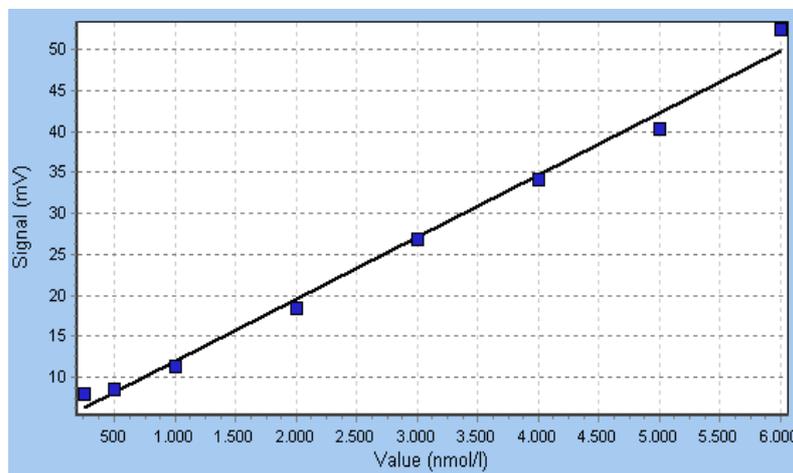
El microsensor de SH<sub>2</sub> es un sensor amperométrico miniaturizado con una referencia interna y un ánodo de protección. El sensor está conectado a un picoamperómetro de alta sensibilidad y el ánodo está polarizado contra la referencia interna. El SH<sub>2</sub> del medio es impulsado por la presión parcial externa, penetrando a través de la membrana por la punta del sensor. En la solución de electrolitos, los iones SH se oxidan inmediatamente, produciendo sulfuro y ferrocianuro.

La señal del sensor se genera mediante la reoxidación del ferrocianuro en el ánodo, localizado en el extremo del sensor (*Jeroschewski P et al., 1996*). El picoamperómetro convierte la corriente de reducción resultante en una señal de voltaje. El electrodo de protección interno está polarizado para el SH<sub>2</sub> y ayuda a mantener una proporción constante de ferri- a ferro cianuro, minimizando así la corriente cero. Para evitar procesos de fotodegradación, el microsensor de SH<sub>2</sub> debe mantenerse lo más alejado posible de la luz ultravioleta y azul del espectro visible.

La calibración del microelectrodo selectivo de SH<sub>2</sub> debe realizarse una vez estabilizada la señal, para ello se dejó sumergido en agua sin electrolitos 24 horas antes del proceso de calibración y en condiciones de oscuridad. Durante ese tiempo, el microelectrodo estaba conectado a un dispositivo computerizado de adquisición de datos, en su versión de picoamperómetros.

Transcurridas 24 horas, se preparó una solución madre de sulfuro (0,01M sulfuros totales), la cual se obtuvo disolviendo 0,22g Na<sub>2</sub>S \* 9 H<sub>2</sub>O en 100 ml

de agua en condiciones anaeróbicas y con arrastre de N<sub>2</sub> en un recipiente tapado (Bewick et al, 1952; Cline J et al, 1969). A continuación, se preparó la solución de calibración consistente en una disolución de HCl al 10% libre de oxígeno y con un pH de 3,5. Una vez preparadas ambas disoluciones y con el microelectrodo despolarizado, se sumergió en la solución de calibración y se monitorizó a 36,5 °C. Una vez estabilizado, se obtuvo la señal correspondiente al punto 0, a continuación se fueron inyectando, mediante una microjeringa de vidrio, concentraciones crecientes de la solución madre, obteniéndose la recta de calibración representada en la gráfica.



Recta de calibración típica obtenida del software Unysense Co, para el microelectrodo selectivo de SH<sub>2</sub>. El eje Y muestra la señal en mV obtenida a concentraciones crecientes de SH<sub>2</sub> (eje X). Coeficiente de correlación :  $r=0,9871$ .

### 5.9.2 MEDIDA *IN-VIVO* DE LA CONCENTRACIÓN RENAL DE SULFURO DE HIDRÓGENO.

A estos grupos de animales se les realizó un procedimiento quirúrgico similar al descrito en el apartado 5.7, sin embargo en este caso se disecó la arteria femoral izquierda para la administración intrarrenal de los fármacos (López B et al 2001; López B et al 2003). Con el objeto de evitar que los cambios en el tono simpático provocaran modificaciones en la función renal, se

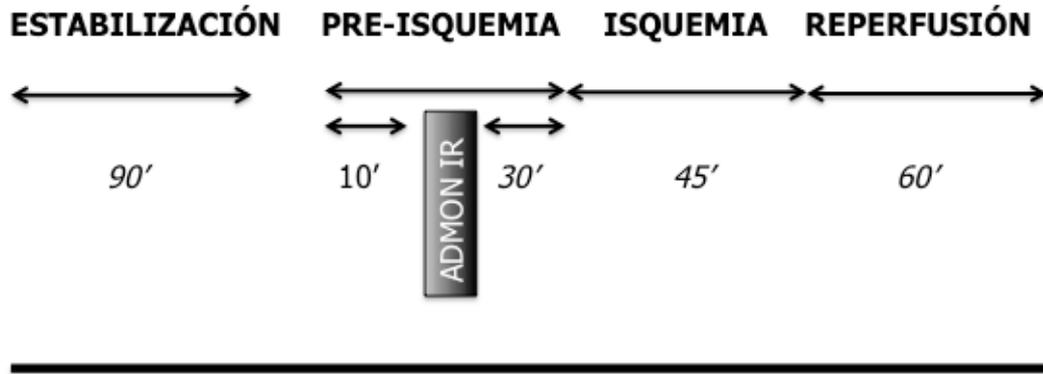
denervó el riñón izquierdo aplicando cuidadosamente una solución de fenol (Sigma-Aldrich Co.) al 10% en etanol absoluto (Panreac Química Sau, España) sobre la arteria renal.

La arteria se cateterizó de forma similar a la descrita anteriormente, insertando un catéter de polietileno (200 µm de diámetro interno, 500 µm de diámetro externo, 20 cm de longitud y con extremo a insertar adelgazado por calor) que se hizo progresar a través de la aorta abdominal hasta insertarlo en la arteria renal izquierda. El catéter se conectó a una bomba peristáltica (Watson Marlow 505-S) que se fijó a una tasa de infusión de 3mL/h y a través de la cual se administró solución salina (grupo 12), sulfhidrato de sodio (NaHS, 1 mg/kg) (grupo13), donante de grupos sulfhidrilo; L-cisteína (L-cis, 50 mg/kg) (grupo 14), sustrato enzimático; ácido aminooxiacético (AOAA, 3 mg/kg)(grupo 15), un inhibidor de la cistationina β-sintasa; propargilglicina (PPG, 40 mg/kg) (grupo 16), un inhibidor de la cistationina Y-liasa y AOAA+PPG (grupo 17). La infusión restante, hasta completar una tasa de infusión final de 2 mL/100g/h, se realizó a través de la vena femoral derecha.

<b>FÁRMACOS ADMINISTRADOS</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>DOSIS</b>	<b>ABREVIATURA</b>
<i>Sulfhidrato de sodio</i>	Donante de grupos sulfhidrilo	1mg/kg	NaHS
<i>L-cisteína)</i>	Sustrato enzimático para el SH2	50mg/kg	L-cis
<i>Ácido aminooxiacético</i>	Inhibidor de la CBS	3mg/kg	AOAA
<i>Propargilglicina</i>	Inhibidor de la CGL	40mg/kg	PPG

Una vez finalizada la laparotomía y apartado el paquete intestinal, se disecó el riñón izquierdo separándolo de la grasa perirrenal y de la glándula suprarrenal, de forma que quedara sujeto únicamente por las estructuras del hilio renal. A continuación se colocó en una copa de metacrilato, en donde se acomodó, inmovilizó y mantuvo a una temperatura de  $36 \pm 0,5$  °C a lo largo de todo el experimento, con la ayuda de suero salino atemperado. Con el riñón correctamente posicionado, y mediante el uso de un micromanipulador (Kanetec) se insertó en la corteza renal un microelectrodo de fibra de vidrio selectivo para el SH<sub>2</sub> (Unisense A/S) de 100µm de diámetro, a una profundidad de 1,5 mm. El sensor estaba conectado a un sistema de adquisición de datos computerizado que previamente había sido calibrado (apartado 5.9.1). Tras comprobar la lectura estable del microsensor, y con el objetivo de evitar movimientos inoportunos del riñón, se preparó una disolución de agar (Sigma Aldrich) al 1% en solución salina y se dejó enfriar hasta una temperatura de 37°C, a continuación mediante una pipeta pasteur se colocó el agar cuidadosamente sobre la copa de metacrilato y el riñón, de forma que éste quedara inmovilizado y se obtuviera una lectura estable de las concentraciones de SH<sub>2</sub>.

Tras la cirugía, se dejó un periodo de 90 minutos de estabilización y posteriormente, durante el periodo pre-isquémico, se realizó un primer aclaramiento previo a la administración intrarrenal de los fármacos. Después de 30 minutos, se procedió a la interrupción del flujo sanguíneo mediante un dispositivo de cierre (Clamp). Durante los 45 minutos de isquemia, se analizaron 9 periodos de 5 minutos. A continuación, se retiró el clamp y se analizó el periodo de reperfusión durante 6 periodos de 10 minutos cada uno.



*Protocolo experimental para determinar la concentración cortical renal del SH<sub>2</sub> in vivo.*

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague Dawley control de tres meses de edad (n=5).
- 2) Ratas Sprague Dawley tratadas con sulfhidrato de sodio (NaHS, 1mg/kg) por vía intrarrenal (n=6).
- 3) Ratas Sprague Dawley tratadas con L-cisteína (L-cis, 50mg/kg) por vía intrarrenal (n=5).
- 4) Ratas Sprague Dawley tratadas con ácido aminooxiacético (AOAA, 3mg/kg) por vía intrarrenal (n=3).
- 5) Ratas Sprague Dawley tratadas con propargilglicina (PPG, 40 mg/kg) (n=3).
- 6) Ratas Sprague Dawley tratadas con PPG + AOAA (n=6).

### **5.9.3 VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN A LAS 24 HORAS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN RENAL.**

En este caso, los animales fueron anestesiados con isofluorano (Abbot Laboratories, España) por vía inhalatoria, pues tanto la inducción y particularmente la recuperación después de la anestesia son rápidas. Para ello se utilizó un circuito cerrado de anestesia que consta de un vaporizador regulado, en el que se introduce el isofluorano en estado líquido y una corriente

de flujo de oxígeno controlada por un rotámetro. El vaporizador añade anestésico al flujo de gas en una proporción controlable entre 0-5%.

Una vez anestesiados, se les rasuró la parte anterior del cuello así como la zona costal izquierda y se les colocó en una mesa termostaticada. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión a nivel de la vena yugular izquierda, en la cual se administraron: solución vehículo (suero fisiológico 0,9%) ( grupo 7, n=6); sulfhidrato de sodio (NaHS), como donante de grupos sulfhidrilo (grupo 8, n=13) (1 mg/kg); L-cisteína (L-cis, 50 mg/kg) (grupo 9, n=7) como sustrato enzimático; propargilglicina (PPG, 40 mg/kg) un inhibidor de la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL) junto a ácido aminooxiacético (AOAA, 3 mg/kg) (Sigma Aldrich Co) un inhibidor la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) (grupo 10, n=5) y AOAA+PPG+L-cis (grupo 11, n=5). Transcurridos 15 minutos (periodo suficiente para que los fármacos ejerzan plenamente su efecto), se realizó una pequeña incisión en la zona intercostal izquierda, quedando expuesto el riñón izquierdo. A continuación, mediante un clamp tipo Blalock se procedió a la isquemia total de la arteria y la vena renal izquierda durante un periodo de 45 minutos.

Transcurridas 24 horas, se anestesió a los animales con ketamina intramuscular (30 mg/kg) y tiopental (50 mg/kg); posteriormente se realizó un procedimiento similar al descrito en el apartado 5.7, con la diferencia de que en este caso únicamente cateterizamos la arteria y vena femoral derecha. Además, para obtener muestras de orina del riñón izquierdo, se disecó su uréter al nivel de su tercio medio y se realizó un corte en su pared, por donde se introdujo un catéter de polietileno (580  $\mu$ m de diámetro interno, 965  $\mu$ m de diámetro externo, 15cm de longitud y extremo a insertar adelgazado por calor) que se inmovilizó con lino 4-0.

Una vez finalizado el periodo de estabilización postquirúrgico, se realizaron dos aclaramientos de 10 minutos con un intervalo entre ellos de 15 minutos.

El protocolo experimental descrito fue realizado en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratas Sprague –Dawley control de tres meses de edad (n=6). Grupo 7.
- 2) Ratas Sprague Dawley tratadas con sulfhidrato de sodio (NaHS, 1mg/kg) por vía intravenosa (n=13). Grupo 8.
- 3) Ratas Sprague Dawley tratadas con L-cisteína (L-cis, 50mg/kg) por vía intravenosa (n=7). Grupo 9
- 4) Ratas Sprague –Dawley tratadas con ácido aminooxiacético (AOAA, 3mg/kg) y propargilglicina (PPG, 40mg/kg) por vía intravenosa (n=5). Grupo 10.
- 5) Ratas Sprague –Dawley tratadas con PPG + AOAA+ L-cis (n=5). Grupo 11.

## **5.10 DETERMINACIONES ANALÍTICAS. TÉCNICAS DE MEDIDA.**

### **5.10.1 MEDIDA DEL FLUJO SANGUÍNEO RENAL.**

En la presente Tesis Doctoral, el FSR se ha determinado mediante la utilización de sondas electromagnéticas de 0,7-0,8 mm de diámetro interior, conectadas a un fluxímetro electromagnético (Skalar MDL-1401).

### **5.10.2 FLUJO URINARIO**

El volumen de orina se ha determinado gravimétricamente: la orina de cada periodo es recogida en tubos previamente pesados en una balanza de precisión (Mettler, AB54). Una vez terminado el periodo, se pesaron los tubos y, considerando la densidad de la orina igual a la del agua, se calcula el flujo de orina con arreglo a la siguiente fórmula:

$$FO = \frac{P_L - P_V}{T * P_R}$$

Siendo:

- ❖ FO= Flujo de orina ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ ) $\mu$
- ❖ PL = Peso del tubo lleno ( $\mu\text{g}$ )
- ❖ PV = Peso del tubo vacío ( $\mu\text{g}$ )
- ❖ T = tiempo de duración del periodo (min)
- ❖ PR = Peso del riñón (g)

### 5.10.3 HEMATOCRITO.

Para la determinación del hematocrito, se recoge sangre de la cánula arterial en dos capilares heparinizados de 75 mm de longitud (Brand); una vez llenos, se taponan uno de los extremos con plastilina y se centrifugan (Hermle, Z230HA) a 10.000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, con lo que se consigue separar la fracción plasmática de la columna de hematíes. A continuación, se colocan los capilares en un lector de hematocritos (Grigel), que indica el porcentaje del contenido del capilar que corresponde a los hematíes.

### 5.10.4 TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR.

La tasa de filtración glomerular se determinó calculando el aclaramiento de inulina marcada con tritio ( $^3\text{H}$ -Inulina, New England Nuclear). La  $^3\text{H}$ -Inulina se administra en la infusión junto al suero y la albúmina en concentración  $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . La radioactividad presente en plasma y orina se mide en un contador de centelleo líquido (Betamatic, Kontron). El aclaramiento de Inulina o, lo que es lo mismo, la tasa de filtración glomerular, se calculó de la siguiente forma:

$$\text{TFG} = \frac{[\text{U}_i] * \text{FO}}{\text{P}_i}$$

Siendo:

- ❖ TFG = Tasa de filtración glomerular ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ )
- ❖  $[U_i]$  = Concentración urinaria de Inulina
- ❖  $P_i$  = Concentración Plasmática de Inulina
- ❖ FO = Flujo de orina ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ )

### **5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

En todos los grupos de animales estudiados se ha representado el valor medio  $\pm$  el error estándar de cada periodo. El estudio de las diferencias entre las medidas de un mismo grupo y entre grupos se ha realizado mediante un análisis de varianza (dos vías) para medidas repetidas (ANOVA), seguido también del test de la T de Fisher para determinación de diferencias significativas entre ellas. Otros datos fueron analizados mediante el test T de Student para observaciones pareadas. Consideramos que la diferencia entre medidas es estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS



## **6. RESULTADOS**

Los resultados que se presentan a continuación son la media  $\pm$ error estándar de cada uno de los parámetros analizados durante los diferentes periodos experimentales, en los animales de cada grupo. Los datos de seguimiento de los animales para la monitorización del consumo de agua, comida y niveles de glucemia, corresponden al valor medio de cada parámetro recogido durante la semana previa al experimento agudo.

En los experimentos diseñados para analizar la función renal, los valores del periodo control y del periodo experimental recogidos en los grupos 1-11, se han obtenido calculando el valor medio de los dos aclaramientos renales realizados en las mismas condiciones. Los valores correspondientes a las concentraciones de NO y SH<sub>2</sub>, son la media  $\pm$  error estándar obtenidos en cada uno de los periodos individuales, realizados en las mismas condiciones.

En el caso de los experimentos en los que se analizó la expresión de las proteínas HO-1 y HO-2 en el tejido renal, se muestran los resultados obtenidos por densitometría, así como el ratio entre la medida de la densidad óptica obtenida en la bandas correspondientes a cada isoforma de la hemo-oxigenasa y la obtenida de las bandas correspondientes de beta-actina, usada como control de carga.

### **6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES.**

#### **6.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS RATAS CONTROL Y DIABÉTICAS, CON Y SIN TRATAMIENTO CRÓNICO DE TEMPOL.**

En la Tabla 1 se representan los resultados correspondientes a las características generales de los grupos analizados, durante el periodo de seguimiento previo a la realización del experimento agudo de función renal, o de recogida de tejidos. Como puede observarse, transcurridas dos semanas desde la inducción de la diabetes, las características basales de los grupos

analizados diferían considerablemente. Comparado con el grupo control, los animales tratados con STZ, mostraron niveles significativamente elevados de glucosa, y signos típicos de una diabetes no controlada tales como, polidipsia, aumento de la ingesta de comida y una mayor relación entre el peso corporal/peso riñón (tabla 1). Como índice de mal control glucémico, se observó que los valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c; %), tras 14 días de la inducción de la diabetes, fueron significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) en los grupos de animales tratados con STZ ( $14 \pm 0,6\%$ ;  $n=7$ ) comparados con el grupo control ( $6 \pm 0,5\%$ ;  $n=10$ ). Cabe destacar, que el tratamiento con Tempol (1mMol) durante 12 días, no modificó ninguno de estos parámetros tanto en animales control como en animales con diabetes tipo-1.

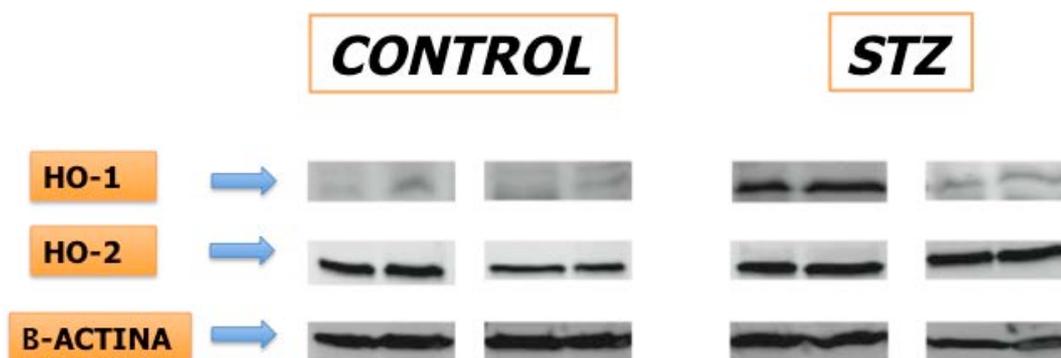
## **6.2 EXPRESIÓN RENAL DE LAS ISOFORMAS DE LA HO (HO-1 y HO-2) EN ANIMALES CONTROL Y DIABÉTICOS, CON Y SIN TRATAMIENTO CRÓNICO DE TEMPOL.**

En la figura 1 podemos observar los datos correspondientes a la expresión renal de la proteína HO-1 en relación a la expresión de la beta actina (control de carga) analizada por western blot, en los grupos control y STZ, tratados o no, con el antioxidante Tempol en el agua de bebida. Tal y como muestra el panel B, la expresión de la proteína HO-1, medida con unidades arbitrarias, y en relación a la expresión de B-actina, mostró valores significativamente mayores en animales tratados con STZ que en animales control ( $0,31 \pm 0,05$  vs  $0,13 \pm 0,03$ , respectivamente). Además, la inducción de la expresión proteica de HO-1, fue prevenida en animales tratados previamente con el análogo de la superóxido dismutasa, Tempol, añadido en el agua de bebida ( $0,19 \pm 0,02$ ).

Como era esperable, la expresión de la isoforma constitutiva HO-2 fue muy similar en los animales diabéticos y los animales sin diabetes, tanto en presencia como en ausencia del tratamiento con Tempol (figura 1, paneles A y B). Cabe destacar, que el tratamiento con Tempol no tuvo ningún efecto sobre la expresión de las proteínas HO-1 o HO-2 en relación a la encontrada en animales control sin tratamiento.

Por tanto, la administración de STZ en ratas SD, no modificó la expresión de la proteína HO-2, pero aumentó considerablemente la expresión de la isoforma HO-1. Este efecto fue bloqueado por el tratamiento crónico simultáneo con Tempol, para reducir el estrés oxidativo.

**A)**



**B)**

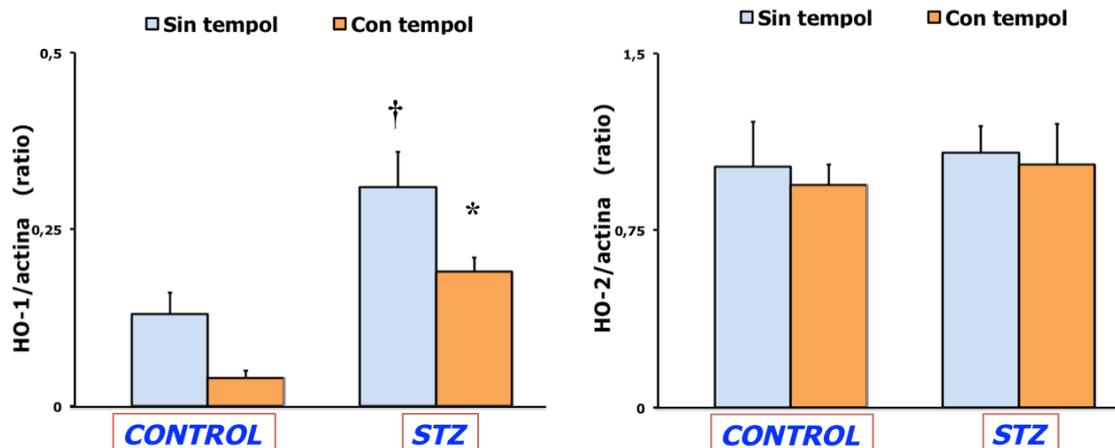


FIGURA 1. A) Expresión de la hemo-oxigenasa (HO) -1, -2 y la  $\beta$ -actina (control de carga) por inmunotransferencia de proteínas procedentes de riñones de ratas control (HO-1, n= 11; HO-2, n=12), control con Tempol (HO-1, n= 4; HO-2, n=4) o estreptozotocina (STZ) (HO-1, n= 11; HO-2, n=12) y STZ con Tempol (HO-1, n= 11; HO-2, n=9). B) Las gráficas muestran los datos de densitometría, que representan la relación entre la densidad de las isoformas de la HO y las bandas de  $\beta$ -actina en cada grupo. † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente a los animales control; \* representa  $P < 0,05$  frente a los animales con STZ y sin tratamiento con Tempol.

### **6.3 CONTENIDO DE NITROTIROSINA RENAL EN ANIMALES CONTROL Y DIABÉTICOS, CON Y SIN TRATAMIENTO CRÓNICO DE TEMPOL.**

La figura 2 representa los valores correspondientes al contenido renal de nitrotirosina obtenida del tejido renal homogeneizado de los distintos grupos experimentales. Los datos se muestran como concentración de proteínas nitrosiladas por mg de proteína. Como puede observarse, la concentración de proteínas nitrosiladas en los riñones de los animales diabéticos fue mayor ( $p < 0,05$ ) que la determinada en el tejido renal procedente de animales control ( $6,43 \pm 0,57$  pmol/mg de proteína vs.  $4,37 \pm 0,35$  pmol/mg de proteína, respectivamente). El tratamiento crónico con Tempol en el agua de bebida, previno el incremento de la nitrotirosina renal en los riñones de los animales diabéticos, los cuales mostraron niveles similares de proteínas nitrosiladas a los observados en los animales control ( $3,8 \pm 0,4$  pmol/mg de proteína vs.  $4,3 \pm 0,3$  pmol/mg de proteína, respectivamente). Adicionalmente, la administración de Tempol en animales control, no afectó a los niveles renales de nitrotirosina comparados con el grupo control sin tratamiento.

Por consiguiente, la administración de STZ a ratas SD, provocó un aumento considerable de la concentración renal de proteínas nitrosiladas, como índice de formación de peroxinitrito, y de estrés oxidativo. Estos efectos fueron bloqueados por el tratamiento crónico simultáneo con Tempol, administrado en el agua de bebida, durante los 12 días previos al experimento agudo.

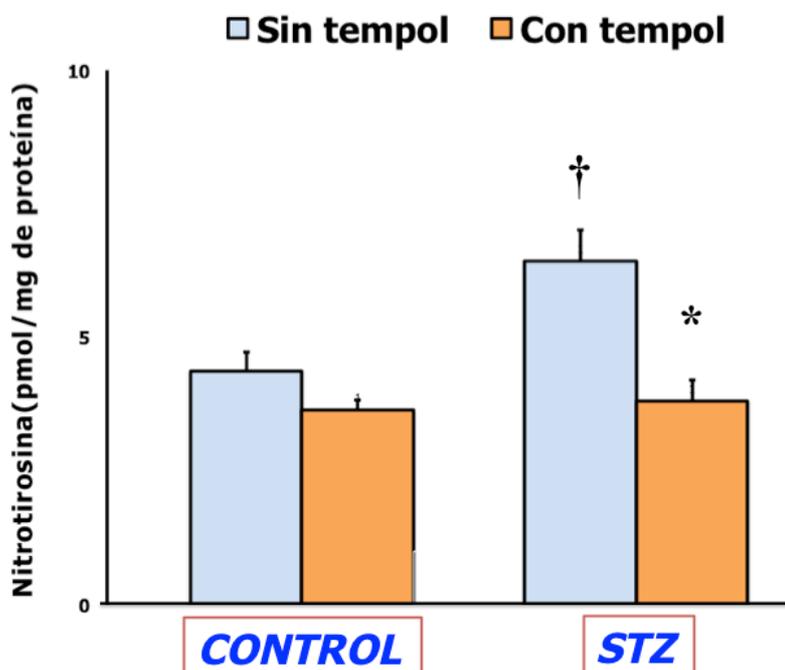


FIGURA 2. Contenido de nitrotirosina en el homogeneizado renal obtenido de las ratas control (n = 12), control suplementado con Tempol (n = 9), STZ (n = 8) y STZ con Tempol (n = 11). † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor obtenido en los animales del grupo control. \* representa  $P < 0,05$  frente animales STZ sin tratamiento con Tempol.

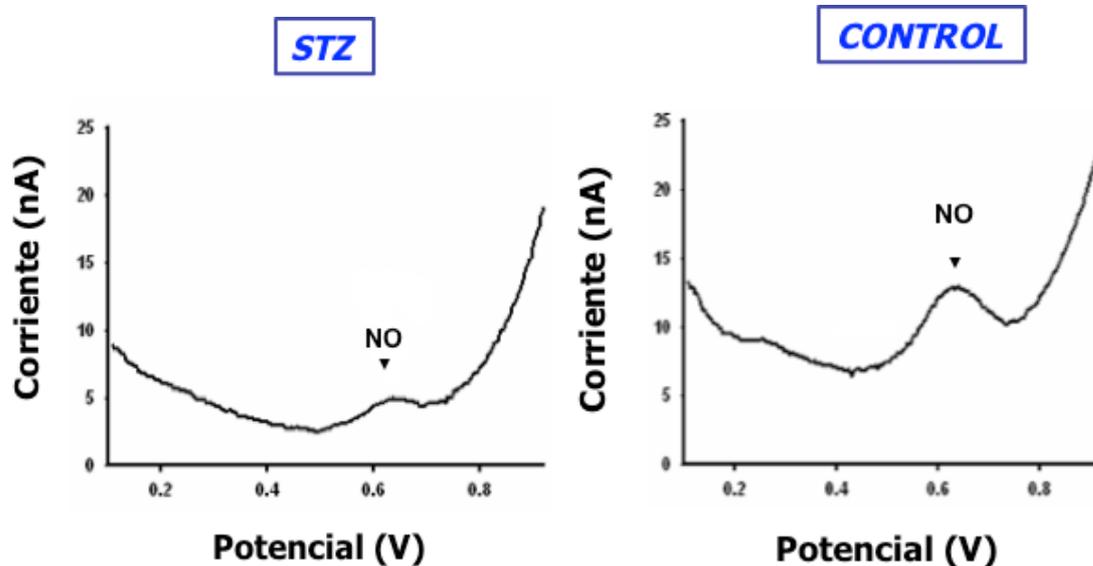
#### 6.4 CONCENTRACIÓN IN VIVO DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA CORTEZA RENAL DE RATAS CONTROL Y DIABÉTICAS CON Y SIN ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE TEMPOL (1mmol/L) EN EL AGUA DE BEBIDA.

La figura 3 muestra un ejemplo representativo de las curvas voltamétricas individuales obtenidas para la medida "in vivo" de la concentración de NO en animales anestesiados control y STZ, con y sin tratamiento simultáneo con Tempol, para reducir el estrés oxidativo. Cabe señalar, que en estas imágenes, la altura del pico obtenida a 650mV es proporcional a la concentración medida de óxido nítrico (NO) en el tejido en cuestión (figura 3).

Como puede observarse en la figura 4, la determinación in vivo de la concentración renal de óxido nítrico, mostró diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Así, las concentraciones basales de NO, encontradas en

la corteza renal de ratas diabéticas ( $259 \pm 49$  nmol/L), fueron significativamente menores que las concentraciones de NO en animales control ( $666 \pm 92$  nmol/L). Sorprendentemente, la administración crónica de Tempol no previno la reducción en los niveles de NO observada en la corteza renal de los animales diabéticos ( $301 \pm 98$  nM). Adicionalmente, el tratamiento antioxidante no tuvo efectos sobre los niveles corticales de NO en el grupo de animales control sin DM-1, ( $566 \pm 92$  nM).

Finalmente, a pesar de las diferencias basales obtenidas en los concentración de NO en la corteza renal, la administración aguda del inhibidor de la HO (SnMP) no tuvo efectos, sobre los niveles de NO en el periodo basal. Las concentraciones de NO (en nmol/l) fueron de  $476 \pm 88$  vs  $498 \pm 86$ ,  $n=4$ ; periodo basal y SnMP, respectivamente en animales control; y de  $174 \pm 46$  vs  $244 \pm 46$ ; periodo basal y SnMP, respectivamente, en animales tratados con STZ;  $p > 0.05$  en todos los casos.



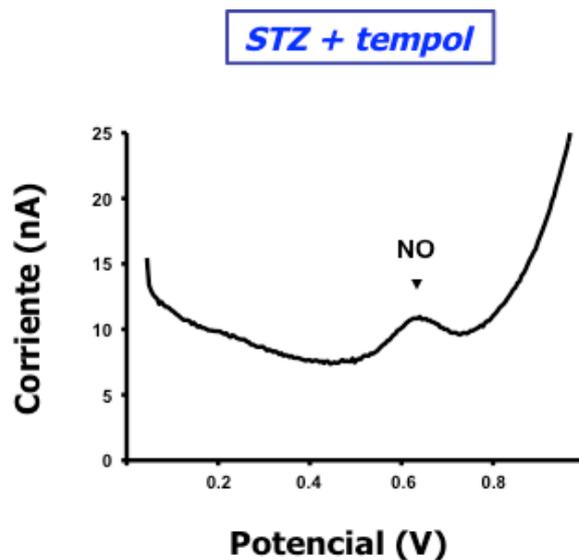


FIGURA 3: Representación de las curvas voltamétricas individuales observadas en condiciones basales en animales control , STZ y STZ +Tempol. La altura del pico obtenido a 650 mV es proporcional a la concentración de óxido nítrico (NO) presente en el tejido cortical renal.

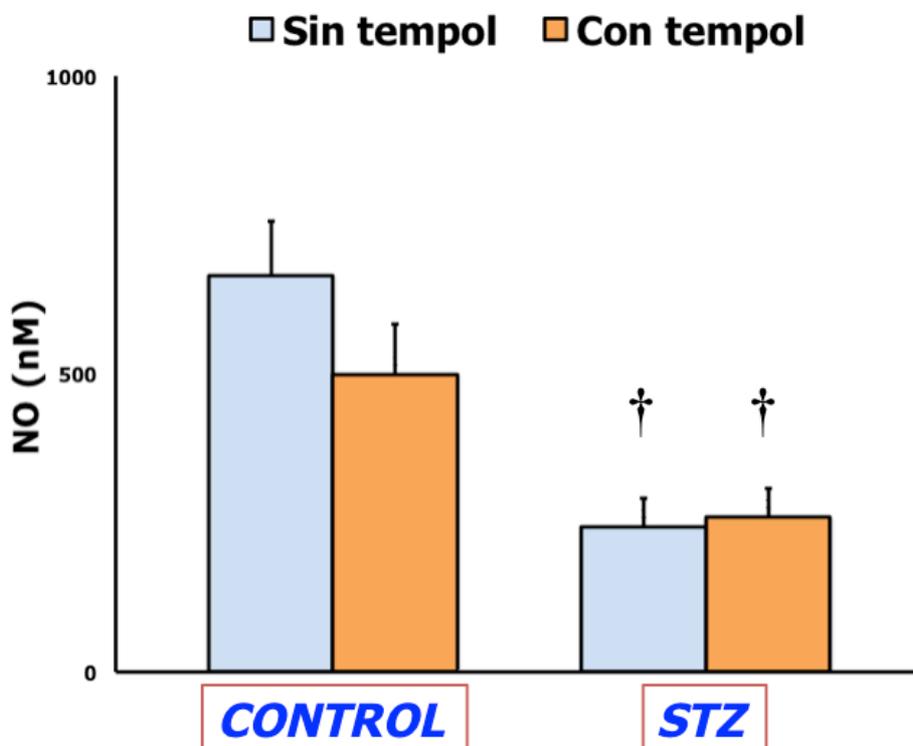


FIGURA 4. Niveles corticales renales (nM) de NO en animales control (n = 10), control con Tempol (n = 8), STZ (n = 10) o STZ con Tempol (n = 4). Los resultados corresponden a las medias  $\pm$  EE. † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente a los animales control.

## **6.5 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE STZ (65mg/kg, IV) SOBRE LA HEMODINAMICA RENAL Y PAM EN RATAS SPRAGUE DAWLEY PARA INDUCIR UNA DIABETES TIPO-1.**

En la Tabla 2 se muestran los valores correspondientes a los periodos basales, previos a cualquier tratamiento, de todos los animales controles y diabéticos, con y sin tratamiento con Tempol. Este procedimiento nos permite establecer con mayor claridad los efectos de la infusión de STZ, sobre la hemodinámica renal y PAM.

Como puede observarse en la Tabla 2, cuando se comparan con los animales control, las ratas tratadas con STZ, para inducir DM-1 mostraron valores disminuidos de PAM, ( $113 \pm 2$  mmHg vs  $120 \pm 3$  mmHg), de FSR ( $5.8 \pm 0.3$  ml/min vs  $7.7 \pm 0.3$  ml/min), y una RVR incrementada ( $20 \pm 1$  mmHg/ml/min vs  $16 \pm 1$  mmHg) con aumentos en la fracción de filtración ( $0.30 \pm 0.03$  vs  $0.40 \pm 0.02$ ); diabetes vs control, respectivamente, y  $p < 0.05$  en todos los casos.

El tratamiento crónico con Tempol, en el agua de bebida, no tuvo efectos sobre la PAM ni la hemodinámica renal de los animales del grupo control. Sin embargo, la administración de Tempol provocó en los animales diabéticos por administración de STZ, en relación con los animales diabéticos sin tratamiento, una disminución significativa de la TFG ( $1754 \pm 159$  vs  $2517 \pm 145$ ;  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ ; STZ +Tempol vs STZ, respectivamente), con descensos en la fracción de filtración ( $0.31 \pm 0.04$  vs  $0.40 \pm 0.02$  STZ+Tempol vs STZ, respectivamente).

## **6.6 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA ACTIVIDAD DE HO ENDÓGENA SOBRE LA HEMODINÁMICA RENAL EN RATAS ANESTESIADAS CONTROLES Y DIABÉTICAS, CON Y SIN TRATAMIENTO CRÓNICO DE TEMPOL.**

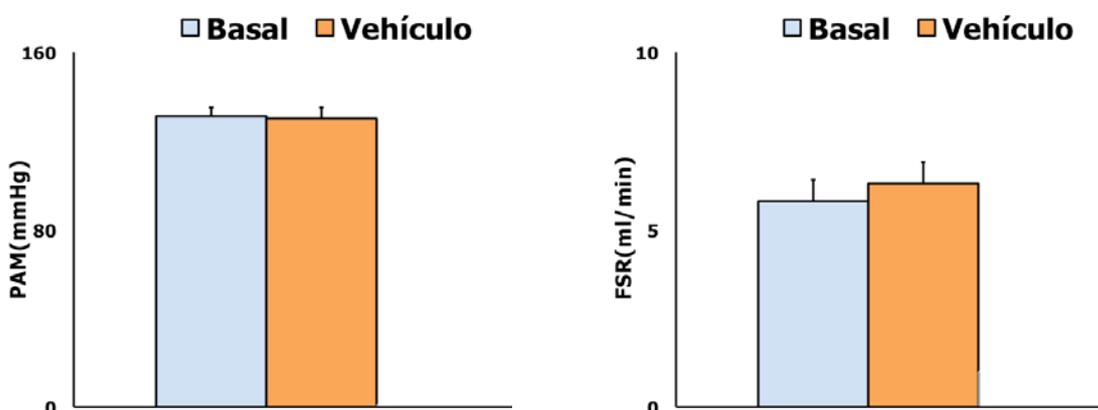
En las Tablas 3-8 y en las figuras 5-10, se muestran los cambios de PAM, RVR, FSR y TFG en los grupos de animales control, en respuesta a la

administración de un inhibidor de la HO (SnMP), o el vehículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), y tratados o no con Tempol (1mM) en el agua de bebida.

- *Efectos sobre la PAM, y la hemodinámica renal de la administración intravenosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en animales control.*

Como puede observarse en la Tabla 3 y la figura 5, la administración del vehículo de la SnMP,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , no tuvo efecto sobre la PAM ni tampoco sobre la hemodinámica renal en animales control (tabla 3). De modo que los valores de PAM o RVR fueron muy similares en el periodo basal, y tras la administración de vehículo, (PAM;  $131 \pm 4$  mmHg. vs  $130 \pm 5$  mmHg, respectivamente y RVR  $24 \pm 3$  mmHg/ml/min vs  $23 \pm 3$  mmHg/ml/min, respectivamente), constatándose la estabilidad de la preparación y el mantenimiento de todos los parámetros analizados durante el desarrollo del experimento. Estos hallazgos descartan que las variaciones observadas fueran consecuencia de las maniobras quirúrgicas ejecutadas.

**GRUPO 1 : CONTROL +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$**



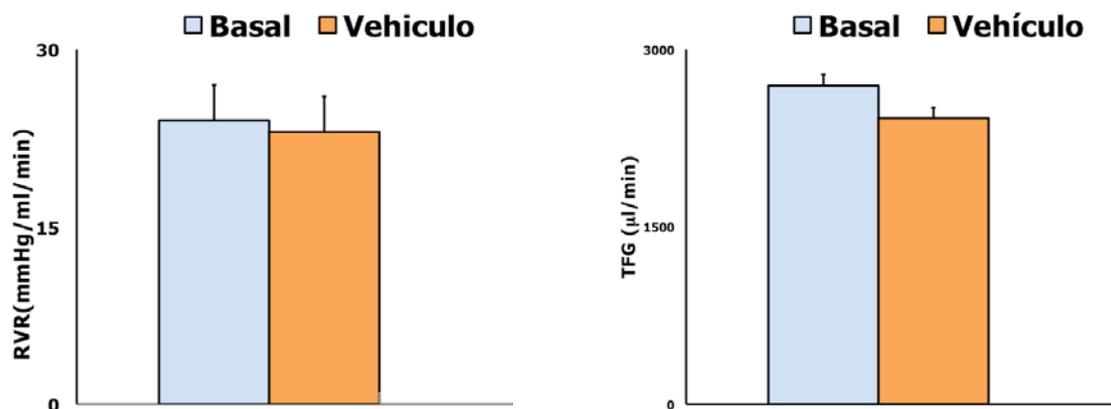


FIGURA 5. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) de la administración de la solución vehículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50mM IV) en ratas control ( $n = 7$ ).

- *Efectos sobre la PAM, y hemodinámica renal de la administración intravenosa de SnMP (40  $\mu\text{mol/kg}$ ) en animales control.*

En la tabla 4 y la figura 6, se muestran los cambios de PAM y función hemodinámica renal en respuesta a la administración de un inhibidor de la HO, SnMP, en los grupos de ratas control, de 3 meses de edad.

Como puede observarse, los valores de PAM tras la administración de SnMP ( $117 \pm 2$  mmHg) fueron muy similares a los mostrados en el periodo basal ( $120 \pm 3$  mmHg). Igualmente, como puede observarse en la tabla 4 y la figura 6, los valores de FSR o RVR correspondientes al periodo basal, no difieren apreciablemente con respecto a los valores obtenidos tras la administración de la SnMP (40 $\mu\text{mol/Kg}$ ), para inhibir la actividad de la HO endógena (FSR;  $7.5 \pm 0.4$  ml/min. vs  $7.9 \pm 0.5$  ml/min; basal vs SnMP, respectivamente o RVR;  $16 \pm 1$  mmHg/ml/min vs  $15 \pm 1$ ; basal vs SnMP, respectivamente).

En resumen, la administración intravenosa del inhibidor de HO, SnMP, no provocó diferencias estadísticamente significativas en la hemodinámica renal ni en la PAM de los animales del grupo control.

## GRUPO 2: CONTROL + SnMP

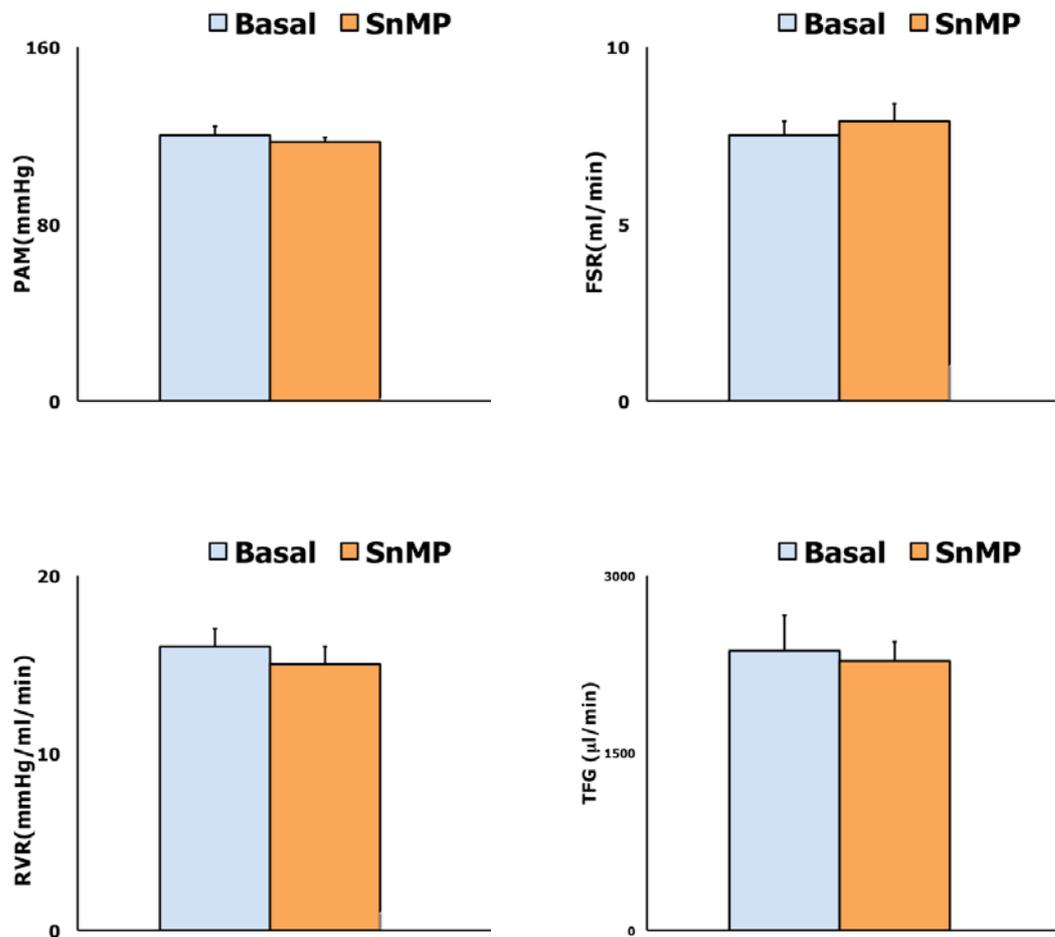


FIGURA 6. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) de la administración de mesoporfirina de estaño (SnMP, 40  $\mu\text{mol}$  / kg IV) en ratas control (n = 11).

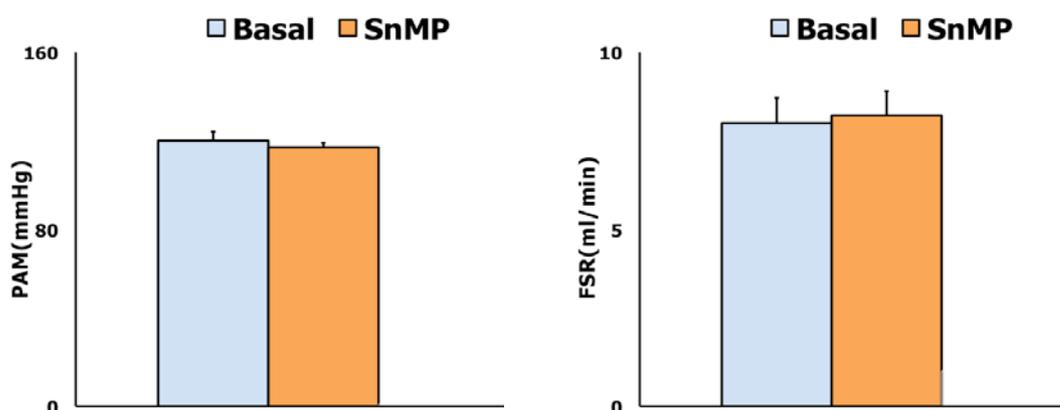
- *Efectos sobre la PAM, y la hemodinámica renal de la administración intravenosa de SnMP (40  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) en animales control tratados con Tempol (1mmol/L).*

En la figura 7 y tabla 5 se representan los cambios de PAM, FSR, RVR y TFG correspondientes a los periodos basal y tras la administración de SnMP en animales control tratados con el antioxidante Tempol en el agua de bebida,

previamente al experimento agudo. Como puede observarse, la inhibición aguda de la HO, mediante la administración de SnMP, no tuvo efectos sobre el FSR ni sobre la resistencia vascular renal (RVR), en los grupos de animales control. Estos animales mostraron valores similares de PAM ( $120 \pm 4$  mmHg vs  $117 \pm 4$  mmHg), FSR ( $8.0 \pm 0.7$  ml/min. vs  $8.2 \pm 0.7$  ml/min) y RVR ( $15 \pm 1$  mmHg/ml/min. vs  $15 \pm 2$ , periodos basal vs SnMP, respectivamente). Sin embargo, en animales tratados con Tempol, la administración de SnMP indujo un descenso ( $p < 0.05$ ) en los valores correspondientes a la TFG, ( $2105 \pm 121$ .  $\mu\text{L}/\text{min}$  vs  $1700 \pm 152$   $\mu\text{L}/\text{min}$ , periodo basal vs SnMP, respectivamente).

Por tanto, el tratamiento previo con Tempol en el grupo de animales control (figura 7 y tabla 5) no manifestó alteraciones de la PAM, ni del FSR tras la administración de SnMP. Sin embargo, en presencia de Tempol, sí se produjo una disminución de la TFG tras la administración de SnMP, en comparación al periodo basal.

**GRUPO 3: CONTROL TEMPOL + SnMP**



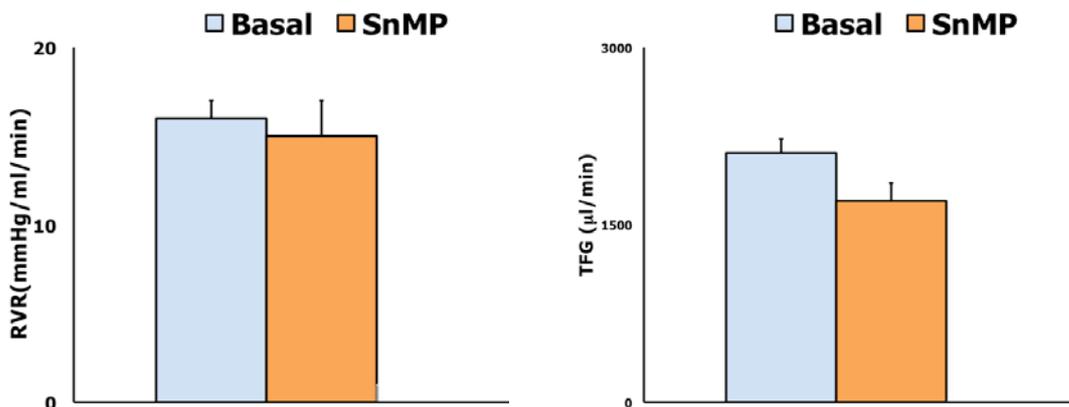


FIGURA 7. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) de la administración de mesoporfirina de estaño (SnMP, 40 μmol /kg IV) en ratas control con Tempol, 1mmol/L (n = 8).

- *Efectos sobre la PAM, y la hemodinámica renal de la administración intravenosa de vehículo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en animales con diabetes tipo-1.*

En la figura 8 y la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en los animales a los que les fue inducida la diabetes (grupo 4) y que fueron tratados con el vehículo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tal y como se refleja en la figura 8 y la tabla 6, la administración del vehículo en este grupo experimental no provocó alteraciones de la PAM, FSR o TFG, en comparación con el periodo basal. Estos resultados aseguran la estabilidad de la preparación experimental y la constancia de todos los parámetros analizados en relación al tiempo. De este modo, los valores de PAM, RVR y TFG fueron en los periodos basal y vehículo, respectivamente y en todos los casos: PAM (111 ±4 mmHg vs 108 ±4 mmHg), y RVR (21 ±1 mmHg/ml/min. vs 22 ±2) y TFG (2643 ±97 μL/min vs 2358±148 μL/min).

### GRUPO 4: STZ + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

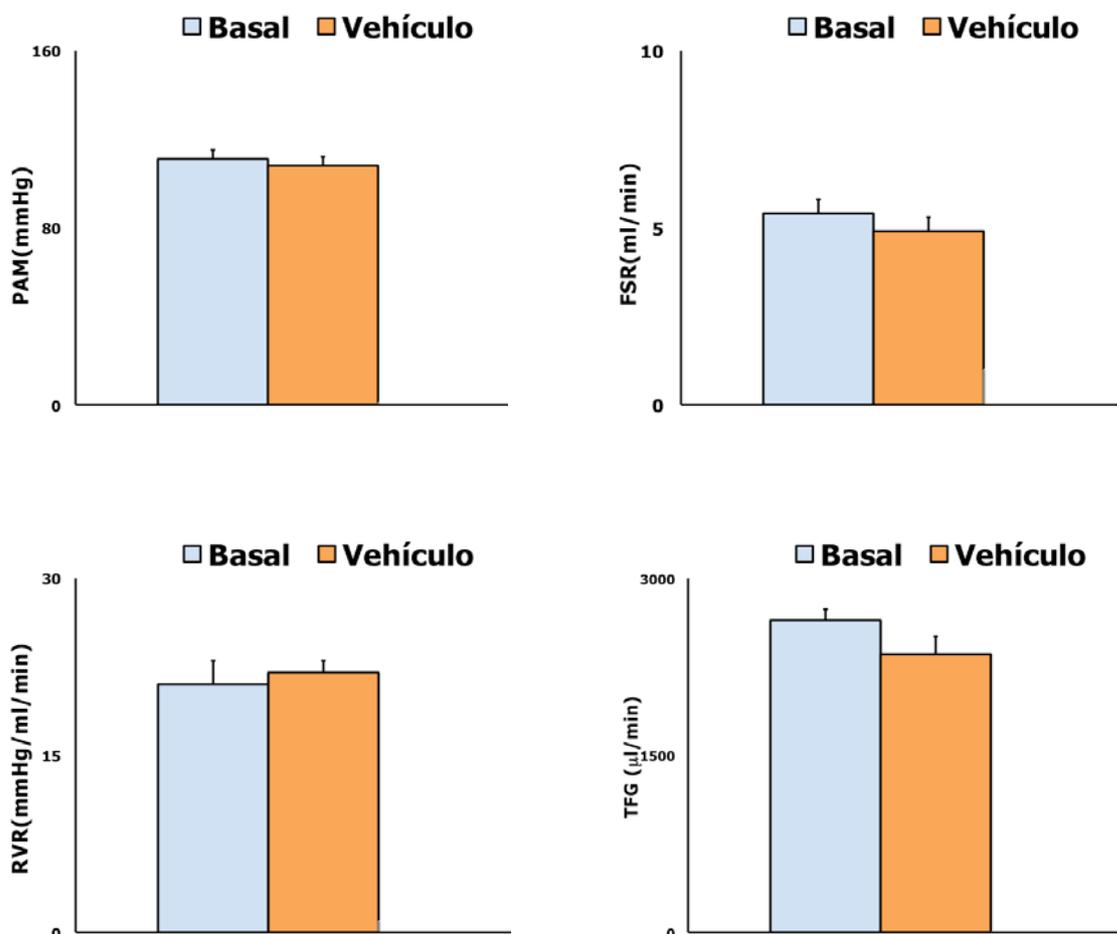


FIGURA 8. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) de la administración de la solución vehículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 mM IV) en ratas tratadas con STZ (n = 8).

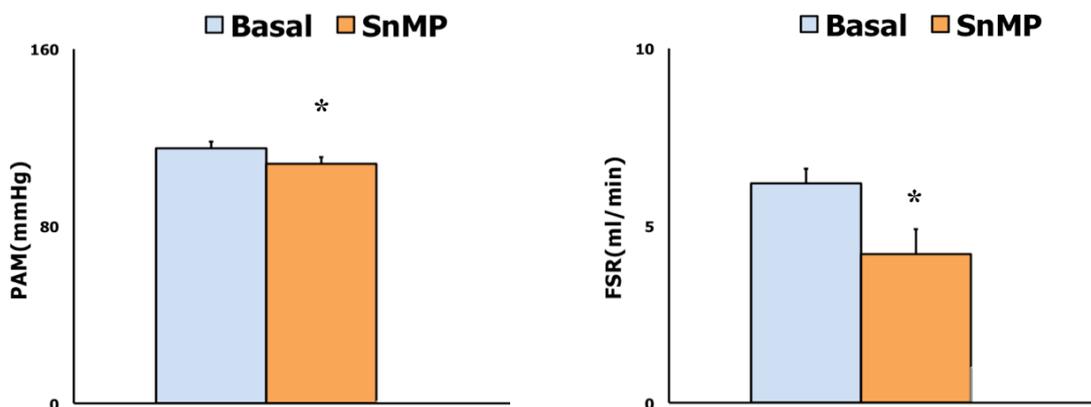
- *Efectos sobre la PAM, y hemodinámica renal de la administración intravenosa de SnMP en animales con diabetes tipo-1.*

En la tabla 7 y en la figura 9 se muestran los cambios de PAM y función hemodinámica renal en respuesta a la administración de un inhibidor de HO, SnMP, en los grupos de animales diabéticos de 3 meses de edad. Como puede

observarse, la inhibición aguda de la HO produjo una pequeña, aunque significativa, reducción de los valores de la PAM ( $115 \pm 3$  mmHg vs  $108 \pm 3$  mmHg, periodo basal vs SnMP, respectivamente) ( $p < 0,05$ ) acompañada de descensos en la TFG ( $2400 \pm 268$ .  $\mu\text{L}/\text{min}$  vs  $1531 \pm 144$   $\mu\text{L}/\text{min}$ , descensos en el FSR ( $6.2 \pm 0.4$  ml/min. vs  $4.2 \pm 0.7$  ml/min; periodos basal y SnMP, respectivamente;  $p < 0.05$ ) y un incremento significativo en los valores correspondientes a la RVR, sin manifestarse alteraciones significativas en la fracción de filtración renal.

Por consiguiente, a diferencia de lo que ocurría en animales control, en los que la inhibición aguda de la actividad de la HO no modificó la PAM o la hemodinámica renal, en animales con DM-1 esta maniobra provocó una intensa vasoconstricción renal.

**GRUPO 5: STZ + SnMP**



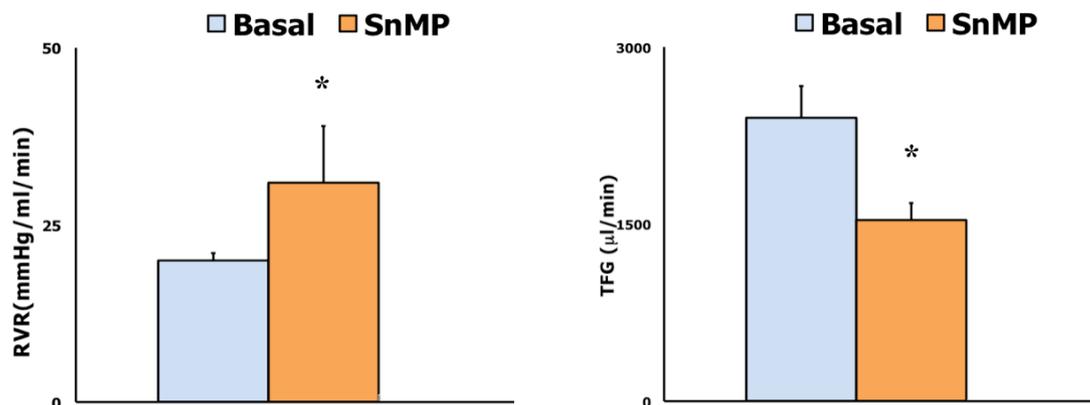


FIGURA 9. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) de la administración con mesoporfirina de estaño (SnMP, 40 µmol / kg IV) en ratas tratadas con STZ (n = 8). \* representa P < 0,05 con respecto a los datos anteriores a la administración de SnMP.

- *Efectos sobre la PAM, y hemodinámica renal por la administración intravenosa de SnMP en animales con diabetes tipo-1 y tratamiento con Tempol (1 mmol/L).*

La figura 10 muestra los periodos basal y experimental (tras la inhibición de la SnMP) correspondientes a los animales a los que se les indujo una DM-1, y que además recibieron tratamiento crónico con Tempol (grupo 6). Con este protocolo se pretende analizar específicamente la participación de los niveles de estrés oxidativo en la respuesta hemodinámica renal al inhibidor de HO, en animales diabéticos.

A diferencia de lo ocurrido en animales con DM-1 no tratados, la presencia de Tempol evitó los efectos de la SnMP sobre los valores de PAM, FSR o RVR, observados en animales diabéticos sin tratamiento. De este modo, los incrementos en valor absoluto de RVR con respecto al periodo basal ( $\Delta$ ), inducidos por SnMP, fueron significativamente menores en el grupo de animales con STZ+Tempol ( $\Delta = 1 \pm 1$  mmHg/ml/min) comparado con los encontrados en animales diabéticos sin dicho tratamiento ( $\Delta = 12 \pm 6$  mmHg/ml/min).

La administración del inhibidor de HO en este grupo de animales, disminuyó la TFG respecto al periodo basal,  $p < 0.05$ . Aunque el efecto de SnMP sobre este parámetro tendió a ser menor en ratas diabéticas con Tempol ( $\Delta = -566 \pm 207 \mu\text{l}/\text{min}$ ) comparado con el observado en ratas STZ sin tratamiento ( $\Delta = -878 \pm 206 \mu\text{l}/\text{min}$ ), las diferencias en ambos decrementos no alcanzaron significación estadística.

**GRUPO 6: STZ TEMPOL + SnMP**

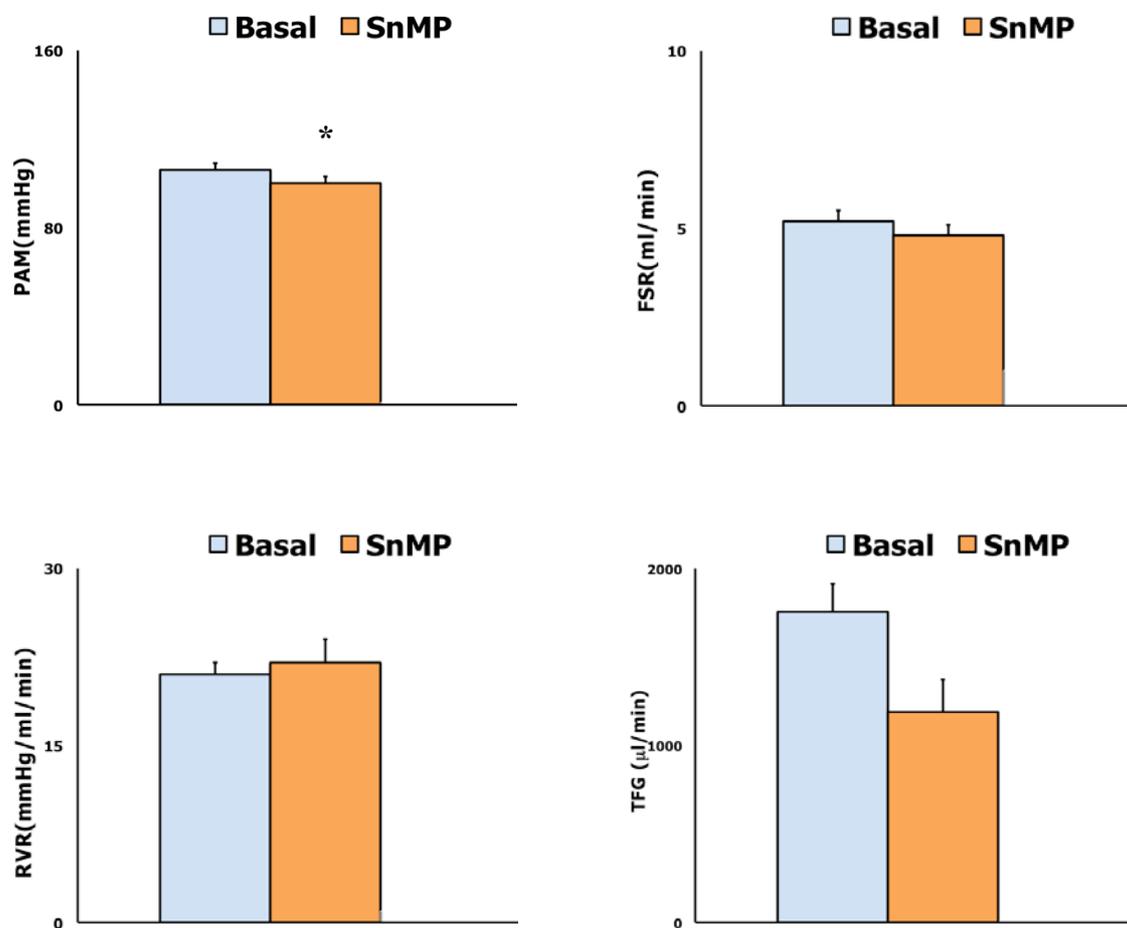


FIGURA 10. La presión arterial media (PAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), la resistencia vascular renal (RVR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), antes (barras azules) y después (barras naranjas) del tratamiento con mesoporfirina de estaño (SnMP,  $40 \mu\text{mol} / \text{kg IV}$ ) en ratas tratadas con STZ y con Tempol,  $1 \text{mmol}/\text{L}$  ( $n = 8$ ). \* representa  $P < 0,05$  con respecto a los datos anteriores a la administración de SnMP.

## **6.7 EFECTOS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN RENAL.**

### **6.7.1 CONCENTRACION *IN VIVO* DE SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA CORTEZA RENAL DE RATAS DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

- *Efectos sobre los niveles de SH<sub>2</sub> por la administración intrarrenal de sulfhidrato de sodio (NaHS, 1mg/kg) y L-cisteína (L-cis, 50mg/kg), durante la isquemia-reperfusión renal.*

La figura 11 muestra las concentraciones nanomolares de SH<sub>2</sub> en la corteza renal de los grupos control, sulfhidrato de sodio (NaHS, 1mg/kg) y L-cisteína (L-cis, 50 mg/kg). En ella se distinguieron los periodos basales, de administración de fármacos, de isquemia y de perfusión. Como puede observarse, los niveles de SH<sub>2</sub> durante los periodos basales de los grupos control, L-cis o NaHS (grupos 12, 13 y 14 respectivamente) no mostraron diferencias significativas entre ellos, lo que fue indicativo de que la cirugía realizada no interfirió apreciablemente en los resultados obtenidos. La administración de solución salina, NaHS o L-cisteína por vía intrarrenal durante el periodo experimental no generó modificación de los niveles del SH<sub>2</sub> en la corteza renal. Sin embargo, la isquemia renal provocó aumentos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en los grupos 12-14, con respecto a los periodos basales (control:  $19027 \pm 1998$  nM; NaHS:  $18912 \pm 2521$  nM; L-cis  $16927 \pm 3166$  nM). Como muestran los resultados, este aumento tuvo tendencia creciente a lo largo de los 45 minutos que duró la isquemia. Transcurrido ese tiempo, la perfusión generó una disminución significativa de las concentraciones de SH<sub>2</sub> en los grupos experimentales analizados. Los resultados mostraron que durante este periodo, los niveles de SH<sub>2</sub> retornaron a valores similares a los obtenidos durante el periodo basal y experimental. La administración de L-cisteína y NaHS no generó diferencias con respecto al grupo control.

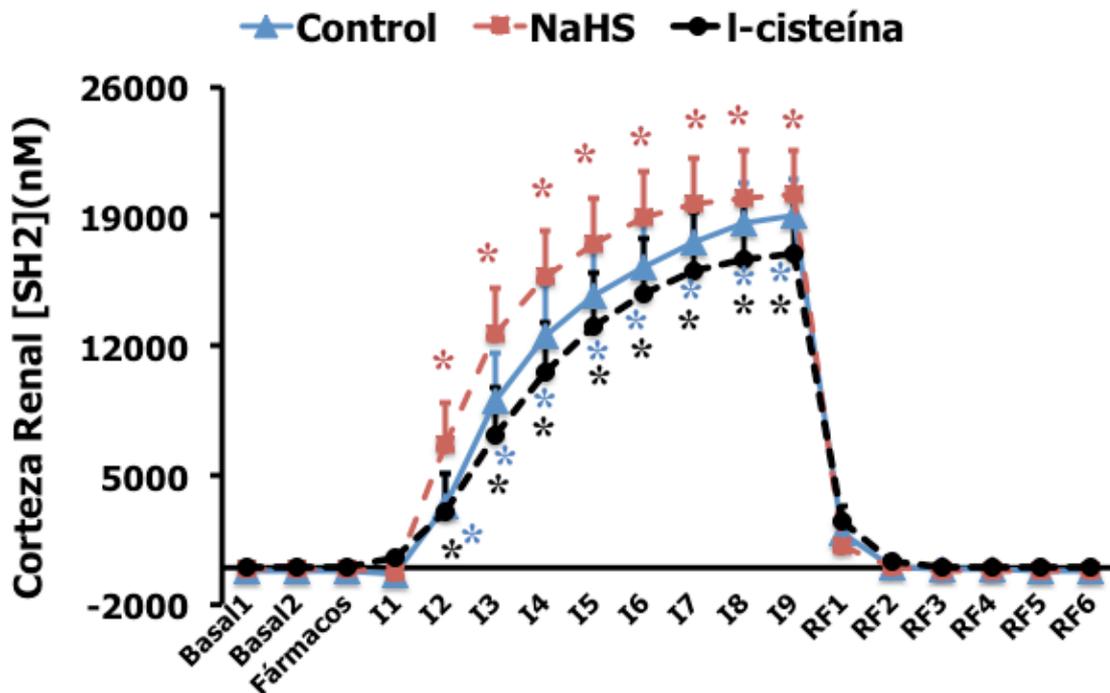
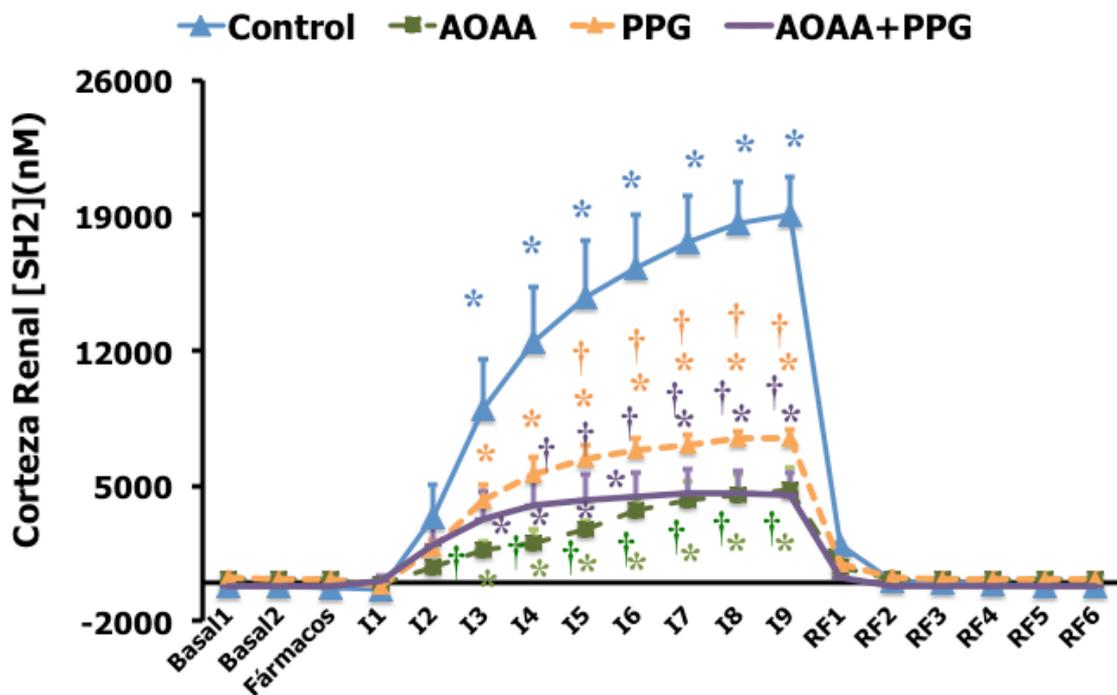


FIGURA 11. Concentración de SH<sub>2</sub> en la corteza renal izquierda durante los periodos basal, de administración de fármacos, isquemia y reperfusión de los grupos control (grupo 12, n=6), NaHS (grupo 13, n=6) y L-cisteína (grupo 14, n=5). \* representa P < 0,05 con respecto al valor correspondiente al periodo basal.

- *Efectos sobre los niveles de SH<sub>2</sub> por la administración intrarrenal de ácido aminooxiacético (AOAA, 3mg/kg), propargilglicina (PPG, 40 mg/kg) o la combinación de ambas (AOAA+PPG), durante la isquemia-reperfusión renal.*

En la figura 12 se muestran las concentraciones de SH<sub>2</sub> obtenidas en la corteza renal durante la IR. La administración de los inhibidores AOAA (3mg/kg) o PPG (40mg/kg), así como la combinación de ambos durante el periodo de administración de fármacos (grupos 15-17), no provocaron variaciones de los niveles de SH<sub>2</sub> durante su administración intrarrenal, previa a la isquemia. Sin embargo, durante el proceso isquémico, pudo observarse que pese a que la concentración de SH<sub>2</sub> en la corteza renal fue mayor que la observada en el periodo basal, el efecto de los fármacos AOAA, PPG y AOAA+PPG dieron lugar a un aumento significativamente menor ( $4770 \pm 1139$  nM,  $7511 \pm 443$  nM y  $4556 \pm 1139$  nM, respectivamente) que el observado en el grupo control NaHS

o L-cis ( $19027 \pm 1998$  nM,  $18912 \pm 2521$  nM y  $16927 \pm 3166$  nM, respectivamente). La combinación de sus efectos (grupo 17) contribuyó igualmente a esta reducción en los niveles de SH<sub>2</sub> en la corteza renal durante la isquemia. No obstante, en la reperfusión se observó que las concentraciones de SH<sub>2</sub> retornaron a valores pre-isquémicos.



**FIGURA 12.** Concentración de SH<sub>2</sub> en la corteza renal izquierda durante los periodos basal, de administración de fármacos, isquemia y reperfusión de los grupos control (grupo 12, n=6), AOAA (grupo 15, n=3), PPG (grupo 16, n=3) y AOAA+PPG (grupo 17, n=6). \* representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente al periodo basal. † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en los animales control.

### **6.7.2 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE L-CISTEÍNA, SULFHIDRATO DE SODIO Y SUS INHIBIDORES, SOBRE LA FUNCIÓN RENAL, 24 HORAS DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.**

Las figuras 12-15 y la tabla 9, representan los valores correspondientes a la tasa de filtración glomerular transcurridas 24 horas desde la realización de la isquemia del riñón izquierdo frente al riñón contralateral (riñón derecho) y con administración intravenosa de suero salino (grupo 7, n=6), sulfhidrato de sodio (NaHS, 1mg/kg) (grupo 8, n=13), L-cisteína, (L-cis, 50 mg/kg) ( grupo 9, n=7), propargilglicina (PPG, 40 mg/kg) para inhibir la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL) junto a ácido aminooxiacético (AOAA, 3 mg/kg) para inhibir la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) o la administración conjunta de los inhibidores con L-cis (AOAA+PPG+L-cis).

La figura 13 representa la TFG en los grupos control y NaHS (7 y 8 respectivamente). Se puede observar que su valor disminuyó significativamente 24 horas después de la isquemia. No obstante, la administración de NaHS provocó una menor disminución de este parámetro con respecto al grupo control.

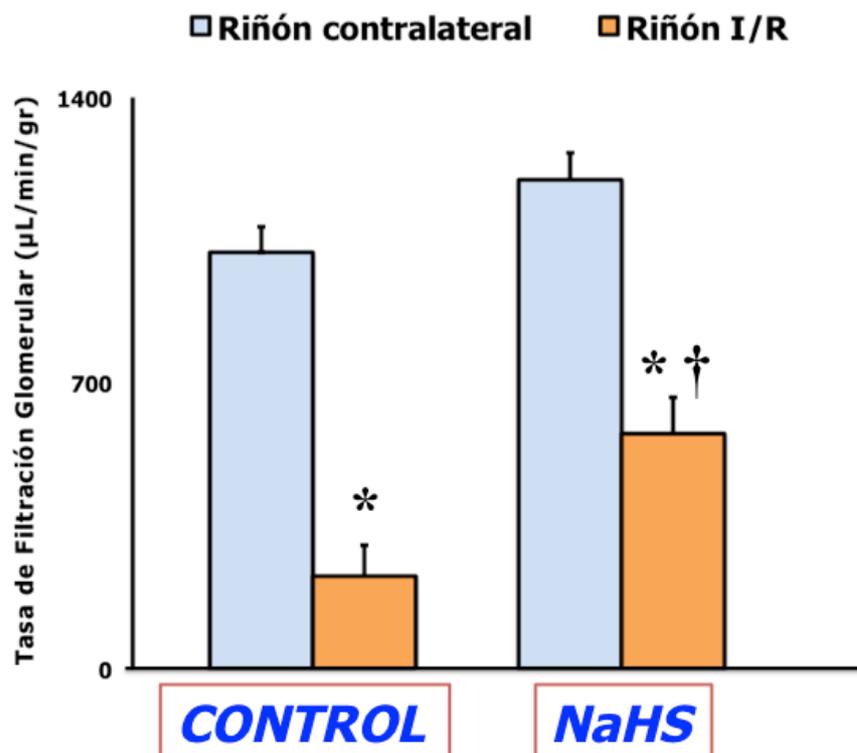


FIGURA 13. Tasa de filtración glomerular (TFG) tras 24 horas de una isquemia de 45 minutos en animales control (grupo 7, n=6) y animales NaHS (grupo 8, n= 13) . Las barras azules representa el riñón contralateral (riñón derecho), las barras naranjas representan al riñón I/R (riñón izquierdo). \* representa  $P < 0,05$  con respecto al riñón contralateral. † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente a los animales de control.

En el grupo de animales que recibieron el tratamiento con los inhibidores enzimáticos (grupo 10) se observó una disminución significativa 24 horas después de la realización de la isquemia (figura 14). Conviene destacar, que no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la TFG entre los grupos control y PPG+AOAA ( grupos 7 y 10, respectivamente).

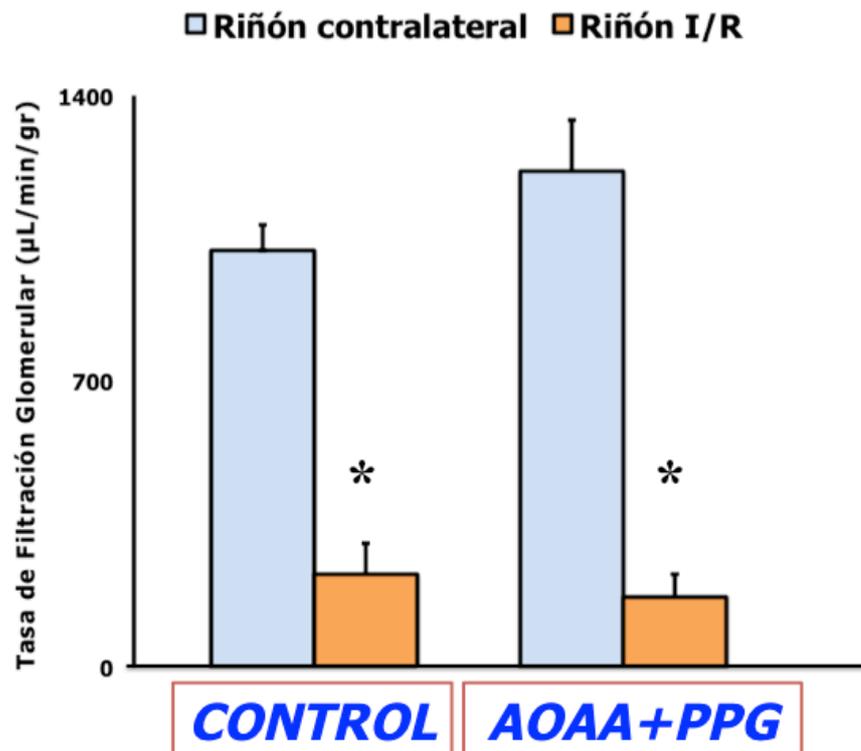


FIGURA 14. Tasa de filtración glomerular (TFG) tras 24 horas de una isquemia de 45 minutos en animales control (grupo 7, n=6) y animales AOAA+PPG (grupo 10, n=8). Las barras azules representa el riñón contralateral (riñón derecho), las barras naranjas representan al riñón I/R (riñón izquierdo). \* representa  $P < 0,05$  con respecto al riñón contralateral.

La figura 15 muestra la TFG obtenida en los animales que recibieron tratamiento con el sustrato enzimático (L-cis) previo a la realización de la isquemia renal. Tras 24 horas, los animales del grupo 9, mostraron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la TFG en el riñón isquémico en comparación con el riñón contralateral. Sin embargo, la administración de L-cis contribuyó a un menor aumento observado en este parámetro con respecto al grupo control.

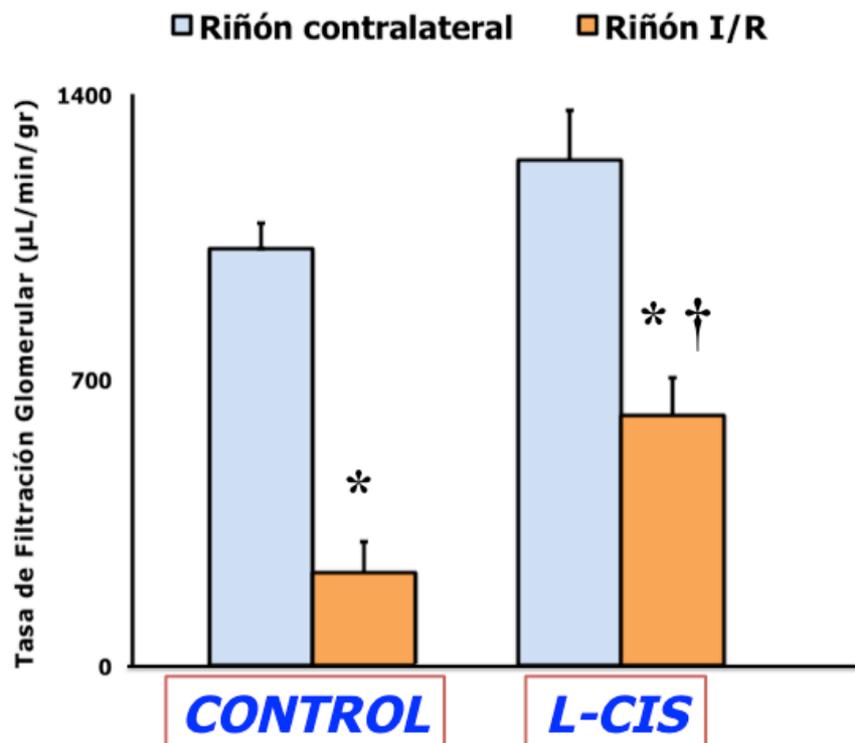


Figura 15. Tasa de filtración glomerular (TFG) tras 24 horas de una isquemia de 45 minutos en animales control (grupo 7, n=6) y animales L-cis (grupo 9, n= 7) . Las barras azules representa el riñón contralateral (riñón derecho), las barras naranjas representan al riñón I/R (riñón izquierdo). \* representa  $P < 0,05$  con respecto al riñón contralateral. † representa  $P < 0,05$  con respecto al valor correspondiente a los animales de control.

Los resultados correspondientes a la administración intravenosa del sustrato enzimático, L-cisteína, junto con los inhibidores (grupo 11) pueden observarse en la figura 16 y la tabla 9. La isquemia provocó una disminución de la TFG observada 24 horas después. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 11 y 7 (control y AOAA+PPG+L-cis, respectivamente).

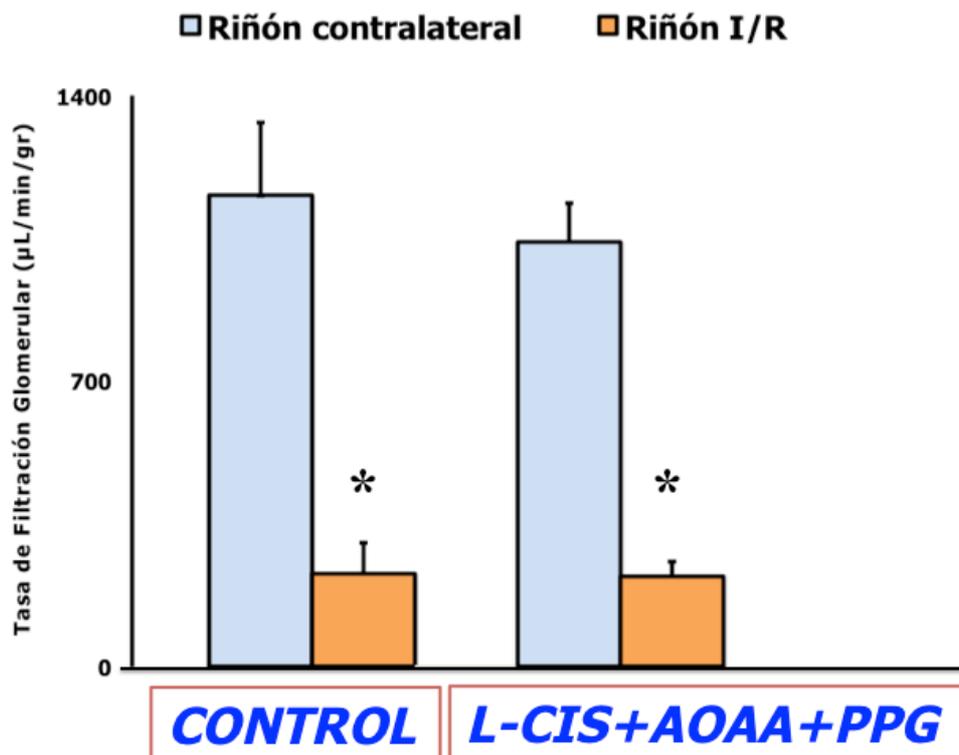


FIGURA 16. Tasa de filtración glomerular (TFG) tras 24 horas de una isquemia de 45 minutos en animales control (grupo 7, n=6) y animales L-cis+AOAA+PPG (grupo 11, n= 5) . Las barras azules representa el riñón contralateral (riñón derecho), las barras naranjas representan al riñón I/R (riñón izquierdo). \* representa  $P < 0,05$  con respecto al riñón contralateral.



# TABLAS



**TABLA 1. Características generales de los animales control y diabéticos por administración de STZ (65mg/kg IV), sin y con tratamiento crónico con Tempol (1mmol/l).**

	<b>CONTROL</b>		<b>STZ</b>	
	SIN TEMPOL (n=8)	CON TEMPOL (n=8)	SIN TEMPOL (n=8)	CON TEMPOL (n=8)
<b>PESO CORPORAL (g)</b>	308 ± 8	338 ± 5	250 ± 86 †	254 ± 5 †
<b>PESO RIÑONES (g)</b>	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,1 †	2,3 ± 0,1 †
<b>PR/PC ratio (%)</b>	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,1 †	0,9 ± 0,0 †
<b>GLUCOSA PLASMA (mg/dl)</b>	103 ± 9	111 ± 3	445 ± 27 †	479 ± 33 †
<b>INGESTA AGUA (g/día)</b>	31 ± 2	39 ± 1	233 ± 18 †	205 ± 6 †
<b>INGESTA COMIDA (g/día)</b>	23 ± 2	23 ± 0	40 ± 3 †	39 ± 3 †

Los valores son las medias ± EE; † representa  $p < 0,05$  frente a sus correspondientes controles.

**TABLA 2. Presión arterial y parámetros hemodinámicos renales en animales control y diabéticos por administración de STZ (65mg/kg IV), sin y con tratamiento crónico con tempol (1mmol/l).**

	<b>CONTROL</b>		<b>STZ</b>	
	SIN TEMPOL (n=8)	CON TEMPOL (n=8)	SIN TEMPOL (n=8)	CON TEMPOL (n=8)
<b>PAM (mmHg)</b>	120± 3	120 ± 4	113 ± 2 †	106 ± 3 †
<b>FSR (ml/min)</b>	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,7	5,8 ± 0,3 †	5,2 ± 0,3 †
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	47 ± 0,6	45 ± 0,7	46 ± 0,4 †	46 ± 0,2 †
<b>RVR (mmHg/ml/min)</b>	16 ± 1	15 ± 1	20 ± 1 †	21 ± 1 †
<b>TFG (µL/min)</b>	2327 ± 171	2105 ± 121	2517 ± 145 †	1754 ± 159 †#
<b>FF</b>	0,3 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,40 ± 0,02 †	0,31 ± 3 #

*Los valores son las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración. † representa p < 0,05 frente a sus correspondientes controles.*

**TABLA 3. Presión arterial media y parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas control antes (basal) y después (experimental) de la administración de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 mM (vehículo). GRUPO 1.**

	<b>BASAL (n=7)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (n=7)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	<i>131 ± 4</i>	<i>130 ± 5</i>
<b>FSR (ml/min/g)</b>	<i>5,8 ± 0,6</i>	<i>6,3 ± 0,6</i>
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<i>46 ± 1</i>	<i>47 ± 1</i>
<b>RVR (mmHg/ml/min/g)</b>	<i>24 ± 3</i>	<i>23 ± 3</i>
<b>TFG (μL/min/g)</b>	<i>2694 ± 92</i>	<i>2417 ± 89</i>
<b>FF</b>	<i>0,15 ± 0,02</i>	<i>0,13 ± 0,02</i>

*Los valores corresponden a las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración.*

**TABLA 4.** *Presión arterial media y parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas control antes (basal) y después (experimental) de la administración de SnMP, 40 μmoles/kg. GRUPO 2.*

	<b>BASAL (n=11)</b>	<b>SnMP (n=11)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	<i>120 ± 3</i>	<i>117 ± 2</i>
<b>FSR (ml/min)</b>	<i>7,5 ± 0,4</i>	<i>7,9 ± 0,5</i>
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<i>46 ± 1</i>	<i>47 ± 1</i>
<b>RVR (mmHg/ml/min/g)</b>	<i>16 ± 1</i>	<i>15 ± 1</i>
<b>TFG (μL/min/g)</b>	<i>2366 ± 296</i>	<i>2276 ± 163</i>
<b>FF</b>	<i>0,30 ± 0,12</i>	<i>0,27 ± 0,1</i>

*Los valores corresponden a las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración; VO, volumen de orina. \* representa P <0,05 frente al periodo basal.*

**TABLA 5. Presión arterial media y parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas control + Tempol (1 mmol/L) , antes (basal) y después (experimental) de la administración de SnMP, 40 μmoles/kg. GRUPO 3.**

	<b>BASAL (n=8)</b>	<b>SnMP (n=8)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	<i>120 ± 4</i>	<i>117 ± 4</i>
<b>FSR (ml/min)</b>	<i>8,0 ± 0,7</i>	<i>8,2 ± 0,7</i>
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<i>45 ± 1</i>	<i>48 ± 1</i>
<b>RVR (mmHg/ml/min/g)</b>	<i>15 ± 1</i>	<i>15 ± 2</i>
<b>TFG (μL/min/g)</b>	<i>2105 ± 121</i>	<i>1700 ± 152</i>
<b>FF</b>	<i>0,25 ± 0,02</i>	<i>0,20 ± 0,03</i>

*Los valores corresponden a las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración; VO, volumen de orina.*

**TABLA 6.** *Parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas diabéticas por administración de STZ (65mg/kg) , antes (basal) y después de la administración de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ,50mM(vehículo). GRUPO 4.*

	<b>BASAL (n=8)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (n=8)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	<i>111 ± 4</i>	<i>108 ± 4</i>
<b>FSR (ml/min)</b>	<i>5,4 ± 0,4</i>	<i>4,9 ± 0,4</i>
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<i>46 ± 1</i>	<i>46 ± 1</i>
<b>RVR (mmHg/ml/min)</b>	<i>21 ± 2</i>	<i>22 ± 1</i>
<b>TFG (µL/min/g)</b>	<i>2643 ± 97</i>	<i>2358 ± 148</i>
<b>FF</b>	<i>0,47 ± 0,03</i>	<i>0,47 ± 0,04</i>

*Los valores corresponden a las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración; VO, volumen de orina.*

TABLA 7. Parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas STZ, antes (basal) y después (experimental) de la administración de SnMP, 40  $\mu$ moles/kg. GRUPO 5.

	BASAL (n=8)	SnMP (n=8)
PAM (mmHg)	115 $\pm$ 3	108 $\pm$ 3
FSR (ml/min)	6,2 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,7 *
HEMATOCRITO (%)	45 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1
RVR (mmHg/ml/min/g)	20 $\pm$ 1	31 $\pm$ 8 *
TFG ( $\mu$ L/min/g)	2400 $\pm$ 268	1531 $\pm$ 144 *
FF	0,34 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,06

Los valores corresponden a las medias  $\pm$  EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración; VO, volumen de orina. \* representa  $P < 0,05$  frente al periodo basal.

**TABLA 8. Parámetros hemodinámicos renales correspondientes a ratas STZ +Tempol, antes (basal) y después (experimental) de la administración de SnMP, 40 μmoles/kg. GRUPO 6.**

	<b>BASAL (n=8)</b>	<b>SnMP (n=8)</b>
<b>PAM (mmHg)</b>	<i>106 ± 3</i>	<i>100 ± 3</i>
<b>FSR (ml/min)</b>	<i>5,2 ± 0,3</i>	<i>4,8 ± 0,3</i>
<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<i>46 ± 1</i>	<i>46 ± 1</i>
<b>RVR (mmHg/ml/min/g)</b>	<i>21 ± 1</i>	<i>22 ± 2</i>
<b>TFG (μL/min/g)</b>	<i>1754 ± 159</i>	<i>1188 ± 183 *</i>
<b>FF</b>	<i>0,32 ± 0,04</i>	<i>0,20 ± 0,03 *</i>

*Los valores corresponden a las medias ± EE; PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; TFG, tasa de filtración glomerular; RVR, resistencia vascular renal; FF, fracción de filtración; VO, volumen de orina. \* representa P <0,05 frente al periodo basal.*

**TABLA 9.** *Parámetros correspondientes a la tasa de filtración glomerular de ratas macho tras 24 horas de la isquemia renal.*

	<b>TFG CONTRALATERAL (<math>\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}</math>)</b>	<b>TFG IR (<math>\mu\text{L}/\text{min}/\text{gr}</math>)</b>
<b>CONTROL</b>	$1154,66 \pm 177,11$	$226,75 \pm 75,83$ *
<b>NaHS</b>	$1198 \pm 66,04$	$575,20 \pm 89,57$ * †
<b>L-cis</b>	$1239,21 \pm 120,79$	$613,81 \pm 90,62$ * †
<b>AOAA+PPG</b>	$1125,53 \pm 137,36$	$278,24 \pm 28,00$ *
<b>AOAA+PPG+L-cis</b>	$1041,91 \pm 94,64$	$220,71 \pm 38,69$ *

*Los valores corresponden a las medias  $\pm$  EE; TFG, tasa de filtración glomerular; Contralateral, riñón derecho; IR, riñón izquierdo. Control (GRUPO 7), NaCl 0,9%; sulfhidrato de sodio (NaHS) (GRUPO 8), 1mg/Kg; L-cisteína (L-cis) (GRUPO 9), 50mg/kg; ácido aminoacético, 3mg/kg; propargilamina (PPG) (GRUPO 10), 40mg/kg y la administración conjunta de los inhibidores con el sustrato (AOAA+PPG+L-cis) (GRUPO11). \* representa  $P < 0,05$  frente al riñón contralateral. † representa  $p < 0,05$  frente al grupo control.*



# DISCUSIÓN



## 8. DISCUSIÓN

La presente Tesis Doctoral trató de dilucidar la importancia funcional del sistema hemooxigenasa (HO), y de la ruta biosintética que conduce a la producción del SH<sub>2</sub>, como parte de los mecanismos que contribuyen a la regulación de la hemodinámica renal en dos modelos experimentales de disfunción renal: diabetes mellitus tipo-1 (DM-1) e isquemia/reperfusión (IR) renal.

Los resultados de este trabajo demuestran un papel muy significativo del estrés oxidativo, y de la inducción de la isoforma HO-1 (por consiguiente de sus metabolitos), en el mantenimiento de la hemodinámica renal en ratas severamente hiperglucémicas con DM-1, una situación que cursa con una reducida biodisponibilidad de NO.

Dentro del primer objetivo de esta Tesis Doctoral, se analizó la expresión de las isoformas 1 y 2 de la hemo-oxigenasa (HO) en el tejido renal de ratas SD control y con DM-1, tras la administración de estreptozotocina (STZ). Así como los efectos producidos por la administración crónica, durante 12 días, de un mimético de la superóxido dismutasa (tempol). Además, en estos animales se estudió el contenido de nitrotirosina renal como marcador de la formación de peroxinitritos.

Hasta la fecha, se han utilizado numerosos modelos biológicos en animales, que reproducen la mayoría de las manifestaciones clínicas de la diabetes humana, mediante diversos métodos. Entre ellos, se encuentra la inducción farmacológica con estreptozotocina en roedores. Este fármaco provoca la destrucción selectiva de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, única fuente de insulina en el organismo (*Steiner DJ et al, 2010*). La sensibilidad al fármaco puede variar según la cepa de rata, el sexo, la edad, el estado nutricional y, por supuesto, la especie animal. Además hay que destacar que el momento, la dosis y la vía de administración, resultan determinantes para el tipo de diabetes que se pretenda inducir (*Carbonel LF et al, 1987; Al-*

*Awar A et al, 2016*). En la rata adulta, la administración de una dosis única de este agente farmacológico (65 mg/kg), vía intravenosa, causa una deficiencia rápida y casi total de insulina y, por lo tanto, niveles elevados de hiperglucemia que simulan la diabetes de tipo-1 (*Carbonell LF et al, 1987*).

En nuestro estudio, la administración del tóxico pancreático (STZ) provocó en lo animales, tras 14 días de su administración, hiperglucemia severa, polidipsia, polifagia, y aumentos de la relación entre el peso del riñón y el peso corporal, todas ellas manifestaciones típicas de una DM-1. Además, encontramos signos de una hiperglucemia mantenida a largo plazo, como consecuencia de una diabetes mal controlada, tal y como muestran los valores excesivamente elevados de la HbA1C. En cuanto a las manifestaciones renales, se ha observado que en algunos trabajos la inducción del estado diabético (dependiendo de la duración y la gravedad del modelo de DM-1 inducido) puede producir inicialmente un estado de hiperfiltración renal (*Bell TD et al, 2008; Brands MW et al, 2004; Koya D et al, 1997; Marwaha A et al, 2006*), aunque no todos los estudios coinciden con estos hallazgos (*Ishii N et al, 2001; Onozato ML et al, 2002; Chen H et al, 2005; Palm F et al, 2005*). Con el tiempo, este estado determina el desarrollo de la hipertrofia renal y la nefropatía diabética posterior (*Forbes JM et al, 2013*). Por todo ello y a pesar de las limitaciones, este modelo experimental se considera un modelo válido para el estudio de las alteraciones renales ocasionadas por el desarrollo de una DM-1, similares a las desarrolladas en la especie humana.

Los resultados de nuestro estudio mostraron una baja expresión de la HO-1 en condiciones normales, lo que concuerda con algunos estudios previos realizados en riñones de ratas control (*Da Silva JL et al, 2001; Hayashi K et al, 2001; Rodríguez F et al, 2004; Goodman AI et al, 2006; Botros FT et al, 2008*). En nuestro estudio, la inducción de la DM-1 provocó también una elevación de su expresión, que además va acompañada de un aumento en los niveles de nitrotirosina renal. En concordancia a los resultados obtenidos, algunos investigadores han demostrado que el estado diabético viene acompañado de una producción excesiva de superóxido renal o vascular y de un aumento de la

concentración renal de nitrotirosina (*Ishii N et al, 2001; Koya D et al, 2003; Onozato ML et al, 2002; Turkseven S et al, 2005*), lo que podría estimular la expresión de la HO-1 en varios tejidos (*Abraham NG et al, 2009*). Por el contrario, otros trabajos previos, usando modelos experimentales similares, han encontrado niveles elevados de nitrotirosina, incluso sin la elevación de la proteína HO-1 (*Turkseven S et al, 2005 ; Goodman AI et al, 2006; Elmarakby AA et al, 2012*). Todos estos resultados sugerirían, por tanto, que el estrés oxidativo contribuye de modo fundamental a los aumentos de expresión y presumiblemente de actividad, de la HO-1.

En nuestro estudio, el aumento en la expresión de la HO-1 obtenida en el riñón de ratas tratadas con STZ concuerda con otros estudios realizados, donde se localizó específicamente un incremento en la expresión de la HO-1 en los glomérulos (*Hayashi K et al, 2001; Koya D et al, 2003*), la médula renal (*Rosenberg C et al, 2008*) y ciertos tejidos vasculares (*Wang R et al, 2001*) de animales con diabetes. Por el contrario, y como hemos mencionado ya, esta sobreexpresión de HO-1 no es un hallazgo general, puesto que otros investigadores no han podido demostrar que se produzca su inducción en tejidos vasculares o renales de animales diabéticos tratados con insulina, en estados más avanzados de la enfermedad (*Turkseven S et al, 2005; Goodman AI et al, 2006*). Una posible explicación para ello, es que las diferencias en las condiciones experimentales derivadas del estado diabético, tales como la duración de la diabetes, los niveles de estrés oxidativo o los valores de glucemia alcanzados, e incluso la presencia o la ausencia de tratamiento con insulina, sean factores determinantes que pongan de manifiesto las diferencias existentes entre los diferentes estudios en relación a los niveles de proteína HO-1 en el tejido renal diabético.

Los resultados obtenidos en los grupos experimentales con el tratamiento antioxidante con tempol, indican que esta sustancia farmacológica normalizó el aumento, tanto en la expresión de la proteína HO-1 como de los niveles de nitrotirosina renal en las ratas tratadas con STZ, sin afectar a estos parámetros en las ratas control. Este hecho sugiere una relación causal entre el estrés

oxidativo y la sobreexpresión de la isoforma HO-1 durante el desarrollo de una DM-1, en el tejido renal de ratas Sprague Dawley adultas (*Koya D et al, 2003; Turkseven S et al, 2005*).

En contraste a los niveles de HO-1, la expresión de la isoforma HO-2 no mostró diferencias en cuanto a su expresión en los riñones de ratas controles y diabéticas. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que los niveles de HO-2 se mantuvieron muy estables, y no sujetos a estimulación por factores externos, indicando que esta isoforma es la responsable de la actividad de la HO basal en condiciones normales (*Turkseven S et al, 2005; Wang R et al, 2001*). Así mismo, otros estudios previos sugieren que la HO-1 es la principal isoforma, y la que contribuye de forma más significativa a la actividad total del enzima HO, cuando hay aumentos de su expresión (*Aizawa T et al, 2000; Da Silva JL et al, 2001; Li P et al, 2004; Botros FT et al, 2008*) y del mismo modo podría ocurrir en animales diabéticos.

Una gran cantidad de trabajos experimentales han analizado el estado de la función endotelial, los niveles de NO, y su importancia para la regulación de la función vascular en la diabetes (*Ohisi K et al, 1995; Schnackenberg CG et al, 2001; Onozato ML et al, 2002; Komers R et al, 2003; Palm F et al, 2005; Satoh M et al, 2005*). Se ha demostrado que tanto la expresión de las isoformas de la NOS y/o la biodisponibilidad del NO, así como las respuestas vasculares y reguladoras de la hemodinámica mediada por el propio NO, están alteradas en ciertos modelos de diabetes experimental y en la diabetes clínica (*Komers R et al, 2003*), por lo que la disfunción endotelial en la DM-1, podría hallarse en el origen de las complicaciones vasculares observadas en esta patología.

Con respecto a los niveles *in vivo* de NO, los animales hiperglucémicos de nuestros experimentos, mostraron bajas concentraciones de NO en la corteza renal con respecto a los animales control. Este resultado vendría a confirmar lo encontrado en algunos estudios realizados con anterioridad, en los cuales se utiliza una técnica electroquímica similar a la empleada en este trabajo (*Palm F et al, 2005*). Mediante esta técnica de medida, fuimos capaces de determinar las concentraciones de NO a tiempo real medidas directamente en el tejido

renal cortical de los animales anestesiados (*Salom MG et al, 2005; Salom MG et al, 2007*). Curiosamente, en el trabajo previo de *Palm F et al, 2005* los niveles reducidos de NO en animales con DM-1, se atribuyeron a la reducida biodisponibilidad del sustrato de la NOS, la L-Arginina. Por otra parte, también se ha sugerido que la deficiencia en los niveles de NO en estas condiciones, podrían ser una consecuencia directa de los aumentos de superóxido (*Ohisi K et al, 1995; Schnackenberg CG et al, 2001*) o el desacoplamiento de los sistemas enzimáticos, NADPH oxidasa, que conducen al aumento de la producción de superóxido (*Kashihara N et al, 2010*). En nuestro caso, la causa exacta del déficit de NO es totalmente desconocida, pero hay que destacar que el tratamiento con Tempol, para reducir los niveles de superóxido y otros compuesto oxidativos, no fue asociada a una recuperación de los niveles de NO en animales con DM-1 hasta los niveles control. Estos hallazgos sugieren que otros factores, en adición a los niveles de superóxido, son importantes para explicar la deficiente biodisponibilidad del NO en estadios iniciales de una DM-1, hallada en el riñón diabético.

Además de las alteraciones encontradas en la producción de NO, y de los cambios metabólicos asociados al desarrollo de una DM-1, en este modelo experimental encontramos alteraciones manifiestas en la hemodinámica renal de animales infundidos con STZ. Como en trabajos previos de otros investigadores (*Hostetter TH et al, 1981; Palm F et al, 2005*), las ratas hiperglucémicas de nuestros experimentos mostraron reducciones en la FSR, con incrementos de la RVR en comparación con las ratas control. En estos animales encontramos, además, que la TFG fue desproporcionadamente mayor que el flujo plasmático renal, lo que resultó en una fracción de filtración elevada, consistente con el aumento de la presión glomerular en esta etapa de diabetes, sin tratamiento con insulina, lo que ratifica los resultados de estudios previos a éste (*Koya D et al, 1997; Chen H et al, 2005*). Por el contrario, otros estudios utilizando STZ para inducir la DM-1 en animales suplementados con insulina con mejor control glicémico, encontraron una TFG elevada, o hiperfiltración y / o aumentos asociados de FSR (*Bell TD et al, 2008; Brands*

*MW et al, 2004*), (*Ishii N et al, 2001; Onozato ML et al, 2002; Komers R et al, 2003*) en estadios iniciales de una DM-1, que fueron casi siempre asociados a aumentos de la enzima NOS, elevada biodisponibilidad o síntesis del NO (*Forbes JM et al, 2013*). En resumen, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados en animales tratados con STZ para inducir una DM-1, las diferencias entre los distintos estudios y condiciones experimentales no permiten concluir un efecto consistente y definitivo sobre los efectos que tiene la administración de STZ, para inducir una DM-1, sobre la hemodinámica renal

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han intentado establecer los efectos del tratamiento antioxidante sobre la hemodinámica renal en la diabetes, no obstante los resultados siguen siendo contradictorios. Algunos trabajos han demostrado que el tratamiento antioxidante podría alterar la hemodinámica renal (*Koya D et al, 2003*), sin embargo no se trata de un hallazgo común en todas los estudios (*Schnackenberg CG et al, 2001; Marwaha A et al, 2006*). En nuestro trabajo, el tratamiento antioxidante con tempol, además de bloquear la inducción de la HO-1 y de la nitrotirosina, provocó una reducción de la TFG y de la fracción de filtración en animales diabéticos, sin modificar estos parámetros en animales control. Aunque no tenemos una explicación satisfactoria para este efecto, se puede especular con la posibilidad de que el bloqueo de la inducción de la HO-1 por tempol en ratas diabéticas, tiende a reducir los niveles de FSR, afectando con ello de forma significativa a la tasa de filtración glomerular. Los mecanismos moleculares que explicarían estos efectos no se conocen de forma precisa, pero la acción combinada de la reducción de los niveles de HO-1, y de sus metabolitos derivados, así como la reducida biodisponibilidad de NO crearían un escenario de mayor predominancia de influencias vasoconstrictoras en el riñón diabético, y vistos en conjunto, e indicarían que existen otros mecanismos, además del estrés oxidativo, que provocan la deficiencia del NO y la disminución del FSR en las ratas diabéticas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, con la administración de SnMP indican que existe una influencia limitada de la actividad endógena de la

HO sobre la hemodinámica renal en condiciones basales (*O'Donoghuy TL et al, 2000; Botros F et al, 2006*). Sin embargo, la administración de SnMP en animales diabéticos provocó un descenso significativo del FSR, con incrementos de la RVR, que fueron atenuados en presencia de Tempol para reducir el estrés oxidativo.

Como en otros estudios, las condiciones patológicas asociadas a elevados niveles de estrés oxidativo (como es el caso de la diabetes), muestran una expresión aumentada de la proteína HO-1 como parte de los mecanismos compensadores que se ponen en marcha para contrarrestar los efectos deletéreos del estrés oxidativo en estas situaciones (*Botros FT et al, 2005; Goodman AI et al, 2006; Turkseven S et al, 2005; Rodríguez F et al, 2011; Salom MG et al, 2007; Elmarakby AA et al, 2012*). Así mismo, en estas situaciones, el aumento de expresión de HO-1 puede desencadenar aumentos de actividad de esta isoforma, que expliquen los efectos hemodinámicos más pronunciados de la SnMP, observados sobre los valores correspondientes al FSR y la RVR de ratas diabéticas. Estos resultados coinciden con otros trabajos previos, en los cuales los aumentos de expresión de HO-1 se acompañaron de una mayor vasoconstricción tras la administración de la SnMP (*Li P et al, 2004*). En todo caso, a pesar de que los niveles de la isoforma HO-2 no variaron apreciablemente en animales diabéticos respecto a los animales control, un incremento de la actividad enzimática de la isoforma HO-2 por efecto de la diabetes no es completamente excluible a partir de nuestros resultados.

Inesperadamente, la administración de la SnMP (para inhibir la actividad de la HO) en los grupos control con tratamiento crónico con tempol, provocó una reducción significativa de los valores correspondientes a la TFG. Puesto que se observaron los mismos efectos en animales diabéticos tratados con tempol (en los cuales la proteína HO-1 no aparecía regulada positivamente), parece probable que la administración crónica de este antioxidante modifique la hemodinámica glomerular, de tal manera que ésta se convierta en dependiente de la actividad de la HO-2. Los mecanismos subyacentes a esta dependencia son actualmente desconocidos.

Asumiendo la complejidad del escenario y los múltiples factores involucrados en los efectos observados, todos estos datos demostrarían, por primera vez, que la actividad de la HO participa en la regulación de la hemodinámica renal en el riñón diabético.

Estos resultados no son del todo sorprendentes si observamos las acciones vasodilatadoras demostradas del sistema, y de sus productos, como el CO (Kaide JI et al, 2001; Arregui B et al, 2004; Rodríguez F et al, 2004; Botros F et al, 2006; Botro F et al, 2008), sobre la hemodinámica renal, y todas aquellas evidencias en las que se demuestra que la administración de metaloporfirinas, presumiblemente a través de la reducción de CO, inducen vasoconstricción renal, particularmente en condiciones en las que la expresión de la HO-1 está incrementada (Aizawa T et al, 2000; O'Donoghuy TL et al, 2000; Botros F et al, 2008), o la síntesis de NO está reducida (Rodríguez F et al, 2003; Botros F et al, 2006). Teniendo en cuenta que estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la SnMP fue efectiva para reducir la producción de CO dependiente de la actividad de la HO, y su excreción en orina (Rodríguez F et al, 2003), es posible sugerir que los efectos de la SnMP sobre la hemodinámica renal en la DM-1, puedan ser consecuencia directa de la pérdida de las acciones vasodilatadoras del CO. En adición a los efectos directos del CO sobre la vasculatura, se ha demostrado que este gas se opone a las influencias vasoconstrictoras inducidas por agonistas  $\alpha$ -1 (Kaide JI et al, 2001), originándose un mayor efecto constrictor de éstos tras la inhibición de la HO (Kaide JI et al, 2001; Rodríguez F et al, 2003; Li P et al, 2004), sobre todo en presencia de inhibidores de la síntesis de NO (Rodríguez F et al, 2003). Por tanto, la mayor respuesta vasoconstrictora inducida por SnMP podría deberse también, indirectamente, a una mayor influencia de sistemas vasoconstrictores, incluyendo a los radicales libres de oxígeno, que han sido activados durante la situación de diabetes (Ishii N et al, 2001; Onozato ML et al, 2002; Koya D et al, 2003; Brands MW et al, 2004). Alternativamente, en nuestras condiciones experimentales la presencia de altos niveles HO-1 podría tener como consecuencia la generación de biliverdina y /o bilirrubina a partir del

metabolismo del grupo hemo, y serían necesarios estudios adicionales para determinar, de modo preciso, los mecanismos moleculares a través de los cuales la inhibición de la actividad endógena de la HO promueve la vasoconstricción renal en animales diabéticos.

En resumen, los resultados de este primer bloque de experimentos, muestran que la expresión de la HO-1 junto con la respuesta vasoconstrictora renal a la inhibición de la HO, se incrementa en ratas diabéticas con hiperglucemia notable que muestran una reducción en la biodisponibilidad renal de NO. Además un tratamiento antioxidante, con Tempol, en animales diabéticos, reduce el estrés oxidativo y previene el incremento de HO-1 renal asociado a una DM-1, a la vez que también atenuó la respuesta vascular renal a la inhibición de la HO. Por tanto, los altos niveles de estrés oxidativo estimulan la expresión de la proteína HO-1 y las acciones vasculares renales mediadas por la HO en el riñón de ratas diabéticas, una condición ligada a reducida disponibilidad de NO, y altos niveles de estrés oxidativo, probablemente a través de la generación de CO y/o pigmentos biliares.

Junto con la DM, las lesiones producidas por la isquemia-reperfusión (IR) suponen una causa importante en el desarrollo y evolución de enfermedades renales. Tanto la diabetes como la isquemia convergen en la disfunción endotelial asociada al daño oxidativo y la baja biodisponibilidad del NO (*Salom MG et al, 2005*).

Los resultados mostraron que, previamente a la realización de la isquemia, los niveles de SH<sub>2</sub> en la corteza renal permanecían a concentraciones mínimas casi indetectables. Sin embargo, la isquemia provocó un aumento significativo de sus niveles hasta un valor máximo que se hace constante. Posteriormente durante la reperfusión, las concentraciones de SH<sub>2</sub> descendieron a sus valores basales, previos a la isquemia. En el grupo en el que se administró vía intrarrenal los inhibidores de las enzimas CBS y CGL, responsables de la producción de SH<sub>2</sub>, la concentración de éste disminuyó significativamente. En cambio, la inyección por la misma vía de un donante de grupos sulfhidrilo (NaHS) y la L-cisteína provocó el aumento de los niveles corticales de SH<sub>2</sub>.

Pese a que históricamente se ha considerado al SH<sub>2</sub> como un gas tóxico de efecto nocivo (López A *et al*, 1989; Wallace JL *et al*, 2007), una gran cantidad de trabajos han demostrado que a concentraciones fisiológicas ejercen funciones protectoras similares a las de otros transmisores gaseosos (Wang R *et al*, 2002; Szabo C *et al*, 2007). Se ha observado que los efectos de la administración del SH<sub>2</sub> en el riñón afectan principalmente a las funciones vasculares y tubulares (Wang R *et al*, 2002; Xu Z *et al*, 2009; Xia M *et al*, 2009). A nivel de estos últimos, experimentos llevados a cabo en ratas SD anestesiadas mostraron que la infusión intrarrenal de NaHS podría promover un aumento de la TFG y una disminución en la reabsorción de sodio en situaciones de isquemia renal (Xia M *et al*, 2009).

Algunos estudios realizados *in vitro* han demostrado que la incubación de arterias aisladas con L-cisteína además de producir un aumento significativo de la producción endógena de SH<sub>2</sub>, induce una pronunciada vasodilatación muy similar a la que se produce con el NO y el CO (Cheng Y *et al*, 2004; Szabo C *et al*, 2007). Sin embargo, otros trabajos afirman que la cisteína es el sustrato natural para la generación del SH<sub>2</sub>, en una reacción catalizada por las enzimas CBS y CGL, pero durante la IR y en ausencia de precursores para la formación del SH<sub>2</sub>, se inhibe su producción y con ello se reducen sus niveles endógenos (Xu Z *et al*, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la isquemia va acompañada de un aumento *in vivo* de los niveles endógenos de SH<sub>2</sub> y que los inhibidores de las enzimas CBS y CGL (AOAA y PPG respectivamente) contribuyen a que este aumento sea menor. Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de la CGL o la CBS por sus inhibidores farmacológicos agrava severamente el daño renal durante el proceso isquémico (Tripatara P *et al*, 2008; Han SJ *et al*, 2015) lo que indica que la lesión renal producida podría, al menos en parte, ser el resultado de la alteración endógena en la producción del SH<sub>2</sub>.

Existe bibliografía contradictoria en cuanto a la participación relativa de las enzimas para la producción endógena del SH<sub>2</sub>. Por un lado, algunos trabajos

proponen que la CGL es la enzima esencial para la síntesis del SH<sub>2</sub> endógeno en los riñones y que la producción de *novo* en este órgano es independiente de la CBS. Basándose en los hallazgos de que la inhibición irreversible de la CGL impedía la recuperación del riñón tras la isquemia y aceleraba la disfunción renal subsiguiente, mientras que la administración de una fuente exógena de SH<sub>2</sub> protegía al riñón de dicha lesión (*Tripatara P et al. 2008; Bos EM et al, 2013*). No obstante, estos resultados podrían ser la consecuencia del efecto nefrotóxico de la PPG descrito en ciertas situaciones de isquemia a una dosificación determinada (*Konno R et al, 2000; Xia M et al, 2009*).

Por otro lado, algunos trabajos muestran que es la CBS, y no la CGL, la responsable de la producción endógena del SH<sub>2</sub> durante la isquemia, pues la administración del inhibidor de la CGL redujo notablemente la actividad del enzima sin afectar la producción total del SH<sub>2</sub> (*Xu Z et al, 2009*). Otros estudios demuestran que tanto la CBS como la CGL participan activamente en la producción del SH<sub>2</sub> en el tejido renal (*Stipanuk MH et al, 1982; Jhee KH et al, 2000*) y que la inhibición de una de ellas podría ser compensada por el aumento de la actividad de la otra enzima, en situaciones en las que la síntesis de alguna de ellas se viera comprometida (*Xia M et al, 2009*).

Conviene destacar que la gran mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha han empleado técnicas *in vitro* para determinar la actividad de cada una de las enzimas que participan en la producción del SH<sub>2</sub> en tejido renal. El presente trabajo de Tesis Doctoral aporta medidas de las concentraciones de SH<sub>2</sub> medido a tiempo real durante la IR. Los resultados muestran que la administración individual y conjunta de PPG y de AOAA reduce significativamente la producción de SH<sub>2</sub> endógeno durante la IR.

De acuerdo con estudios anteriores, cabe la posibilidad de que la regulación enzimática para la producción endógena del SH<sub>2</sub> en este modelo de IR sea a través de un proceso de homeostasis, de manera que al inhibir una de las enzimas, se produzca un aumento en la actividad de la otra como medida de compensación (*Xia M et al, 2009*). Por ello durante la isquemia, los niveles endógenos de SH<sub>2</sub> se mantienen constantes y significativamente superiores en

comparación con el periodo basal. No obstante, se ha descrito una fuente de SH<sub>2</sub> endógena a través de su reducción no enzimática en los eritrocitos (*Wang R et al, 2002*) que pese a no ser la fuente principal de producción del SH<sub>2</sub>, podría contribuir al aumento de sus concentraciones. En este caso, el aumento del estrés oxidativo durante la isquemia podría dar lugar a la oxidación no enzimática del sulfuro obteniéndose tiosulfato, el cual se convertiría en sulfito a través de la tiosulfato reductasa presente en el hígado, en el cerebro y también en el riñón (*Wang R et al, 2012*), generando de esta manera SH<sub>2</sub> a nivel endógeno.

El presente trabajo demuestra que, transcurridas 24 horas desde la IR, la función renal de los animales que recibieron tratamiento vía intravenosa de NaHS o de L-cisteína (antes de ser sometidos a 45 minutos de isquemia), mostró una menor disminución de la TFG con respecto a los grupos de animales que no habían recibido dicho tratamiento, lo que pone de manifiesto que es la administración exógena del SH<sub>2</sub> la que mejora la función renal.

Pese a las diferencias en cuanto a la contribución de las enzimas para la producción endógena del SH<sub>2</sub>, los estudios realizados coinciden en que la menor producción de este transmisor gaseoso puede ser el responsable, en gran parte, del daño renal asociado a una IR. La disminución de la síntesis del SH<sub>2</sub> va asociada a un aumento del daño renal y la mortalidad después de la IR renal, lo que podría deberse a la mayor producción de ROS (*Bos EM et al., 2013*). Estos hallazgos se basan en la idea de que la reducción del metabolismo antes de la isquemia podría ser un factor protector en la lesión producida por una IR. En este contexto, el hipometabolismo inducido por el SH<sub>2</sub> podría estar mediado por su participación sobre la cadena de transporte de electrones, concretamente sobre el complejo IV mitocondrial (citocromo oxidasa) (*Khan AA et al, 1990; Bos EM et al, 2009*), pues se ha observado que la protección que ejerce el SH<sub>2</sub> es mayor cuando se administra antes y durante el periodo de hipoxia (*Bos EM et al, 2009*), lo que coincide con nuestros resultados.

La restauración parcial de la síntesis de SH<sub>2</sub> o la administración de un donante de sulfuro exógeno (NaHS) podría aliviar el estrés oxidativo que se

produce por la IR y reducir la muerte celular en el riñón (Xu Z et al, 2009). La administración de un donante de SH<sub>2</sub> durante la IR renal podría ejercer muchos de sus efectos protectores a través de respuestas antiinflamatorias, antiapoptóticas y antioxidantes (Tripatara P et al, 2008; Bos EM et al, 2009; Xu Z et al, 2009, Simon F et al, 2010; Hunter JP et al, 2012). En un principio se aceptó que el aumento de SH<sub>2</sub> estaba relacionado con un aumento local y/o sistémico de las respuestas inflamatorias (Hui I et al, 2003; Zhang J et al, 2010). Sin embargo, en la actualidad se sabe con relativa certeza que no es así, de hecho numerosos estudios apoyan que a concentraciones fisiológicas, el SH<sub>2</sub> ejerce acciones antiinflamatorias a través de la regulación negativa de ciertos factores proinflamatorios, así como la capacidad de limitar la migración de leucocitos y su participación en la síntesis y liberación de ciertas citoquinas (Zanardo RC et al, 2006; Jha S et al, 2008; Hu LF et al, 2009; Sivarajah A et al, 2009; Lobb I et al, 2014). Además se ha propuesto que el SH<sub>2</sub> puede prevenir la apoptosis celular a través de su interacción con vías de señalización relacionadas con la expresión de la proteína caspasa 3, un grupo de cisteín-proteasas relacionadas con procesos pro-apotóticos (Yang G et al, 2004; Rinaldi L et al, 2006; Tripatara P et al, 2008; Sivarajah A et al, 2009). Pese a que del presente trabajo no se pueden determinar los mecanismos por los cuales el SH<sub>2</sub> ejerce su acciones, la combinación de estos efectos podrían ser los responsables de las funciones protectoras observadas en la función renal 24 horas después de la IR renal, en los grupos a los que se les administró una fuente exógena de SH<sub>2</sub>.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la isquemia renal va acompañada de un aumento en la generación de peroxinitrito, alcanzando su punto máximo tras 30 minutos de isquemia, para posteriormente retornar a valores pre-isquémicos durante la reperfusión (Salom MG et al, 2007). Los resultados de estos trabajos mostraron que el estrés oxidativo y nitrosativo que se genera durante la isquemia (y también durante la reperfusión) podría ser un factor de gran importancia que contribuye de manera significativa al deterioro de la función

renal. En este sentido, el efecto citoprotector del SH<sub>2</sub> estaría relacionado con su capacidad para neutralizar una gran variedad de moléculas reactivas, incluyendo: radical superóxido (*Mitsuhashi H et al, 2005*), peróxido de hidrógeno, peroxinitrito (*Whiteman M et al, 2004*) e hipoclorito (*Whiteman M et al, 2005*).

Recientemente se ha demostrado que la administración exógena de donantes de SH<sub>2</sub> tiene un efecto protector en las lesiones provocadas por una IR cardíaca (*Johansen D et al, 2006; Sivarajah A et al, 2006*). Es por ello que se le han atribuido funciones importantes a nivel vascular, similares a las de los otros mediadores gaseosos. Se le atribuyen, entre otras, propiedades vasodilatadoras (*Xu Z et al, 2009; Szabo C et al, 2009*), pues se ha observado que in vitro, producen relajación aórtica y disminución de la presión arterial en ratas (*Zhao W et al, 2002; Cheng Y et al, 2004; Ali MY et al, 2006; Xu Z et al, 2009*). Dado que el SH<sub>2</sub> desempeña un papel importante en la regulación de la función vascular (*Hosoki R et al., 1997, Zhao W et al, 2003, Cheng et al., 2004*) y que el control de la función renal está en gran medida asociado con la regulación de las funciones vasculares renales (*Xia M et al, 2009*), el sustrato para la formación del SH<sub>2</sub> y el propio NaHS administrados exógenamente, a través de sus propiedades vasodilatadoras podrían contribuir a mitigar el daño renal que supone este modelo de isquemia.

El aumento en las concentraciones de SH<sub>2</sub> producidos durante la IR podría ser el responsable de la vasorrelajación observada, a través de la apertura directa de los canales de K-ATP en las células del músculo liso vascular (*Zhao W et al, 2001; Leffler CW et al, 2006; Yamamoto J et al, 2013*). Los canales de K-ATP están presentes en la superficie de los vasos renales y desde allí, podrían promover la perfusión durante los estados de hipoxias prolongadas, preservando así la filtración glomerular (*Zhao W. Et al, 2001; Zhu ZXG et al, 2012*). Además, a nivel mitocondrial, la apertura de los canales de K-ATP contribuiría al mantenimiento del potencial de membrana, manteniendo el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. Estos cambios a su vez afectarían a la funcionalidad de la cadena de transporte de

electrones, la permeabilidad de la membrana y la activación de las caspasas (Wang R et al, 2012).

En resumen, pese a que los mecanismos específicos por los que el SH<sub>2</sub> ejerce sus acciones biológicas todavía están por determinar, el presente trabajo de Tesis Doctoral muestra evidencias claras de su participación en la regulación de la función renal en condiciones fisiológicas y sobre todo fisiopatológicas. La combinación de sus efectos vasodilatadores, junto con sus propiedades antioxidantes, antiapoptóticas o antiinflamatorias podrían ser las responsables del menor deterioro de la función renal observado en este modelo de IR. Debido a la importancia del SH<sub>2</sub> en la fisiología renal, la alteración de su producción contribuiría significativamente en la patogénesis de ciertas enfermedades renales. La administración de NaHS y L-cis previo a la isquemia, ha demostrado ejercer efectos protectores en la funcionalidad del riñón 24 horas después. La aplicación de terapias basadas en el sistema del SH<sub>2</sub> podrían suponer una importante diana fármaco-terapéutica para el tratamiento de diversas patologías que cursen con enfermedades renales crónicas. La realización de estudios específicos del SH<sub>2</sub> a nivel molecular, podría ser de gran utilidad para completar nuestra comprensión acerca del papel que desempeña el SH<sub>2</sub> tanto en la fisiología como en la fisiopatología renal.



# CONCLUSIONES



## 9. CONCLUSIONES.

- En el modelo experimental de diabetes mellitus tipo-1 (DM-1) por administración de estreptozotocina, los altos niveles de estrés oxidativo renal provocan la inducción de la isoforma 1 de la Hemo-oxigenasa (HO-1), sin alterar la expresión de la HO-2.
- La activación del sistema HO por los altos niveles de estrés oxidativo, principalmente a través de la inducción de la isoforma HO-1, ejerce influencias vasodilatadoras en la hemodinámica renal de ratas con DM-1, que presentan una reducida disponibilidad de NO en el tejido renal.
- La administración del análogo de la superóxido dismutasa, Tempol, para reducir el estrés oxidativo, evita los aumentos de expresión renal de la proteína HO-1, y atenúa la respuesta vasoconstrictora renal inducida por un inhibidor de la actividad HO en animales con DM-1.
- La isquemia renal incrementa los niveles corticales de SH<sub>2</sub>, que retornan a los valores pre-isquémicos inmediatamente después de la reperfusión. Este incremento de SH<sub>2</sub> observado durante la isquemia disminuye significativamente en presencia de los inhibidores enzimáticos AOAA y/o PPG.
- 24 horas después del evento isquémico, la TFG disminuye tanto en los riñones isquémicos control como en los riñones pretratados con los inhibidores enzimáticos ácido aminooxiacético y propargilglicina. Sin embargo, la caída de la TFG observada un día después de la isquemia, mejoró significativamente en los riñones isquémicos de las ratas pretratadas con un donante de SH<sub>2</sub> o L-Cisteína.
- Aunque la isquemia renal produce un incremento en los niveles corticales endógenos de SH<sub>2</sub>, solo un pretratamiento con una fuente de SH<sub>2</sub> exógena parece contribuir a la mejora significativa del fallo renal agudo observado 24 horas después de la reperfusión.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- **Abe K, Kimura H.** The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*; 16(3):1066-71, 1996.
- **Abraham, NG, Drummond GS, Lutton JD, and Kappas A.** The biological significance and physiological role of heme oxygenase. *Cell Physiol Biochem* 247: 725-732, 1997.
- **Abraham NG, Botros FT, Rezzani R, Rodella L, Bianchi R, Goodman AI.** Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR. *Cell Mol Biol*; 48: 895–902, 2002.
- **Abraham NG, Cao J, Sacerdoti D, Li X, Drummond G.** Heme oxygenase: the key to renal function regulation. *Am J Physiol Renal Physiol*; 297(5): F1137-52; 2009.
- **Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, Nagai R, Mori I, Tang SS, Ingelfinger JR, Ohno M.** Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats: possible role in renoprotection. *Hypertension* 35: 800–806, 2000.
- **Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C.** Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Diabetes Res. Volume 2016, Article ID 9051426* , 2016.
- **Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK.** Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 149: 625–634, 2006.
- **Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA.** Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*; 105(2):248-58. PMID: 12125704, 2002.
- **Arregui B, López B, García Salom M, Valero F, Navarro C, Fenoy FJ.** Acute renal hemodynamic effects of dimanganese decacarbonyl and cobalt protoporphyrin. *Kidney International* 65(2): 564-574, 2004.
- **Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS.** Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated

by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest*; 64(5):648-55, 1991.

- **Baylis C, Vallance P.** Nitric oxide and blood pressure: effects of nitric oxide deficiency. *Curr Opin Nephrol Hypertens*;5(1):80-8, 1996.
- **Bell TD, Di Bona GF, Biemiller R, Brands MW.** Continuously measured renal blood flow does not increase in diabetes if nitric oxide synthesis is blocked. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1449–F1456, 2008.
- **Beltowski J.** Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 358 –363, 2010.
- **Bewick HA & Budd, M.S.** Photometric determination of hydrogen sulfide and reducible sulfur in alkalines . *Analytical Chemistry* 24: 1536-1540 , 1952.
- **Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, and Moore PK.** Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*; 19:623– 625, 2005.
- **Bode BW, et al.** Advances in hemoglobin A1c point of care technology. *J. Diabetes Sci Technol*; 1(3): 405-411, 2007.
- **Bonventre JV.** Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* :43(5):1160-78, 1993.
- **Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH Paul LC.** Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int.* 58(2): 859-866, 2000.
- **Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM, Kloosterhuis NJ, Hillebrands JL, Leemans JC, Florquin S, van Goor H.** Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*; 20(9):1901-5, 2009.
- **Bos Eelke M., Rui Wang, Pauline M. Snijder, Miriam Boersema, Jeffrey Damman, Ming Fu, Jill Moser, Jan-Luuk Hillebrands, Rutger J. Ploeg, | Guangdong Yang, Henri G.D. Leuvenink and Harry van Goor.** Cystathionine g-Lyase Protects against Renal Ischemia/Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol*

24: 759–770, 2013.

- **Botros FT, Schwartzman ML, Stier CT, Jr., Goodman AI, Abraham NG.** Increase in heme oxygenase-1 levels ameliorates renovascular hypertension. *Kidney Int*; 68(6): 2745-55; 2005.
- **Botros F and Navar LG.** Interaction between endogenously produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2772–H2778, 2006.
- **Botros FT, Prieto-Carrasquero MC, Martin VL, Navar LG.** Heme oxygenase induction attenuates afferent arteriolar autoregulatory responses. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F904–F911, 2008.
- **Brands MW, Bell DB, Gibson B.** Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide. *Hypertension* 43: 57–63, 2004.
- **Carbonell LF, Salom MG, Garcia-Estañ J, Salazar FJ, Ubeda M, Quesada T.** Hemodynamic alterations in chronically conscious unrestrained diabetic rats. *Am J Physiol*; 252(5 Pt 2):H900-5, 1987.
- **Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS, et al.** 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol*; 13:294–300, 2000.
- **Castillo R, Huerta P, CarrascoR, Rodrigo R.** Estrés oxidativo y daño renal: *CIMEL*; 8(1), 43 – 52, 2003.
- **Cavallini, D., De Marco, C., Mondovi, B. and Mori, B.** The cleavage of cystine by cystathionase and the transulfuration of hypotaurine. *Enzymologia* 22, 161–173; 1960.
- **Chang EF, Wong RJ, Vreman HJ, Igarashi T, Galo E, Sharp FR, Stevenson DK, Noble-Haeusslein LJ.** Heme oxygenase-2 protects against lipid peroxidation-mediated cell loss and impaired motor recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci* 23: 3689–3696, 2003.
- **Chen H, Brahmhatt S, Gupta A, Sharma AC.** Duration of streptozotocin-induced diabetes differentially affects p38-mitogen-activated

protein kinase (MAPK) phosphorylation in renal and vascular dysfunction. *Cardiovasc Diabetol* 4: 3, 2005.

- **Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, and Wang R.** Hydrogen sulfide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2316–H2323, 2004.
- **Chen YJ, Li J, Quilley J.** Deficient renal 20-HETE release in the diabetic rat is not the result of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2305–H2312, 2008.
- **Cline JD.** *Limnol and Oceanogr* . 14: 454-458. 1969.
- **Da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE, Lianos E, Abraham NG.** Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int*; 59(4): 1448-57; 2001.
- **Datla SR, Dusting GJ, Mori TA, Taylor CJ, Croft KD, Jiang F.** Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension* 50: 636–642, 2007.
- **Datta PK, Lianos EA.** Nitric Oxide induces heme oxygenase-1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 55(5): 1734-9, 1999.
- **Della Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P.** Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Suppl*; 4: 8–14, 2000.
- **Ding Y, McCoubrey WK Jr, and Maines MD.** Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO? *Eur J Biochem* 264: 854 – 861, 1999.
- **Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK.** Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem*; 205:1–11, 2000.
- **Drummond GS.** Control of heme metabolism by synthetic metalloporphyrins. *Ann N Y Acad Sci*, 514:87-95, 1987.
- **Elmarakby AA, Faulkner J, Baban B, Saleh MA, Sullivan JC.** Induction of hemeoxygenase-1 reduces glomerular injury and apoptosis

in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*; 302(7): F791-800; 2012.

- **Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ.** Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15560– 15565, 2007.
- **Ewing JF, Maines MD.** In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: differential distribution of isozyme 1 and 2. *Mol Cell Neurosci* 3: 559 – 570, 1992.
- **Finkelstein JD.** Methionine metabolism in liver diseases. *Am J Clin Nutr*; 77(5):1094-5; 2003.
- **Forbes JM and Cooper ME.** Mechanism of diabetic complications. *Physiol Rev* 93: 137–188, 2001.
- **Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R.** Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 339: 729–736, 1999.
- **Giller Y.** A history of HbA1c through clinical chemistry and laboratory medicine. Review. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51(1):65-74, 2013.
- **Goodman AI, Chander PN, Rezzani R, et al.** Heme oxygenase-2 deficiency contributes to diabetes-mediated increase in superoxide anion and renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*; 17(4): 1073- 81; 2006.
- **Guo W, Ze-yu Cheng and Yi-zhun Zhu.** Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacol Sin*; 34(10): 1284–1291, 2013.
- **Han SJ, Kim JI, Park JW, Park KM.** Hydrogen sulfide accelerates the recovery of kidney tubules after renal ischemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*; 30(9):1497-506, 2015.
- **Hayashi K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Isshiki K, Kikkawa R.** Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*; 52(2): 85-96; 2001.

- **Hill-Kapturczak N, Chang SH and Agarwal A.** Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 21: 307-321, 2002.
- **Hosgood SA, Nicholson ML.** Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia-reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation. *Br J Surg*; 202-9, 2010.
- **Hosoki R, Matsuki N, Kimura H.** The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm* 237: 527–531, 1997.
- **Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM.** Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 19: 410–415, 1981.
- **House JD, Brosnan ME, and Brosnan JT.** Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J* 328:287–292; 1997.
- **Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AH, Wang DL.** Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci.* doi: 10.1186/1423-0127-21-3, 2014.
- **Hu LF, Lu M, Wu ZY, et al.** Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Mol Pharmacol*; 75:27–34, 2009.
- **Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H.** Changes in arterial hydrogen sulfide content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect*; 47: 155–60, 2003.
- **Hunter JP, Hosgood SA, Patel M, Rose R, Read K, Nicholson ML.** Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*; 99(12):1665-71, 2012.
- **Hyspler R, Ticha A, Indrova M, Zakak ZK, Hysplerova L, Gasparic J, Churacek J.** A simple, optimized method for the determination of sulphide in whole blood by GC-MS as a marker of bowel fermentation processes. *J Chromatog B: Anal Tech Biomed Life Sci* 770: 255–259, 2002.

- **Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H.** A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants Redox Signaling*; 11:205–14, 2009.
- **Ishii N, Patel KP, Lane PH, Taylor T, Bian K, Murad F, Pollock JS, Carmines PK.** Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 12: 1630–1639, 2001.
- **Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H.** Murine cystathionine  $\gamma$ -lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 381: 113–123, 2004.
- **Jeroschewski P, steuckart C and Kühl M.** *Anal . Chem .* 68:4351-4357; 1996.
- **Jha S, Calvert JW, Duranski MR, et al.** Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: Role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 295:H801–6, 2008.
- **Jhee KH, McPhie P, Miles EW.** Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine  $\beta$ -synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry* 39: 10548 –10556, 2000.
- **Jhonson KF, Teran FJ, Proeto-Carrasquero M, Jonson RA.** Vascular effects of a heme oxygenase inhibitor are enhanced in the absence of nitric oxide. *Am J Hypert Dec* 15: 1074-80,2002.
- **Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF.** Exogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—evidence for a role of K ATP channels. *Basic Res Cardiol* 101: 53–60, 2006.
- **Kaide JI, Zhang F, Wei Y, Jiang H, Yu C, Wang WH, Balazy M, Abraham NG, Nasjletti A.** Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest* 107: 1163–1171, 2001.

- **Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I.** L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*; 55(5):1391-7; 2006.
- **Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK and Kanwar YS.** Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem.* 2010; 17(34): 4256–4269, 2010.
- **Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE.** Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103: 482–490, 1990.
- **Kim JI, Choi SH, Jung KJ, Lee E, Kim HY, Park KM.** Protective role of methionine sulfoxide reductase A against ischemia/reperfusion injury in mouse kidney and its involvement in the regulation of trans-sulfuration pathway. *Antioxid Redox Signal*; 18(17):2241-50, 2013.
- **Kimura Y, Kimura H.** Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18: 1165–1167, 2004.
- **Kimura H.** Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Feb 10;20(5):783-93. doi: 10.1089/ars.2013.5309; 2014.
- **Komers R, Anderson S.** Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1121–F1137, 2003.
- **Konno R, Ikeda M, Yamaguchi K, Ueda Y, and Niwa A.** Nephrotoxicity of D-propargylglycine in mice. *Arch Toxicol* 74:473–479, 2000.
- **Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL.** Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with D- $\alpha$ -tocopherol. *J Am Soc Nephrol* 8: 426 –435, 1997.
- **Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M.** Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 14: S250–S253, 2003.

- **Kristin A. Kirkby, Christopher A. Adin.** Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *American Journal of Physiology*; Vol. 290 n. 3: F563-F571, 2005.
- **Lamon BD, Zhang FF, Puri N, Brodsky SV, Goligorsky MS, Nasjletti A.** Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms. *Circ Res* 105: 775–783, 2009.
- **Lee SC, Han SH, Li JJ, et al.** Induction of heme oxygenase-1 protects against podocyte apoptosis under diabetic conditions. *Kidney Int*; 76(8): 838-48; 2009.
- **Leffler CW, Balabanova L, Fedinec AL, Waters CM, Parfenova H.** Mechanism of glutamate stimulation of CO production in cerebral microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H74–H80, 2003.
- **Leffler Charles W., Helena Parfenova, Jonathan H. Jaggar and Rui Wang.** Regulation of the Cerebral Circulation Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol* 100: 1065–1076, 2006.
- **Leffler Charles W., Helena Parfenova and Jonathan H. Jaggar.** Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1–H11, 2011.
- **Lhuillier F, Parmentier P, Goudable J, Crova P, Delafosse B, Annat G, Cespuglio R, and Viale JP.** Hepatic ischemia is associated with an increase in liver parenchyma nitric oxide that is in part enzyme-independent. *Anaesthesiology* 98: 373–378, 2003.
- **Li P, Jiang H, Yang LM, Quan S, Dinocca S, Rodriguez F, Abraham NG, Nasjletti A.** Angiotensin II induces carbon monoxide production in the perfused kidney: relationship to protein kinase C activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F914–F920, 2004.
- **Li L, Bhatia M, Moore PK.** Hydrogen sulfide: a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol* 6: 125–129, 2006.
- **Li N, Yi F, dos Santos EA, Donley DK, Li PL.** Role of renal medullary heme oxygenase in the regulation of pressure natriuresis and arterial

blood pressure. *Hypertension* 49: 148–154, 2007.

- **Li YF, Xiao CS, Hui RT.** Calcium sulfide (CaS), a donor of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): A new antihypertensive drug. *Med Hypothesis*; 73:445–47, 2009.
- **Liu YY, Sparatore A, Del Soldato P, Bian JS.** ACS84, a novel hydrogen sulfide-releasing compound, protects against amyloid  $\beta$ -induced cell cytotoxicity. *Neurochem Int*; 58:591–8, 2011.
- **Lobb Ian, Justin Zhu, Weihua Liu, Aaron Haig, Zhu Lan and Alp Sener.** Hydrogen sulfide treatment ameliorates long-term renal dysfunction resulting from prolonged warm renal ischemia-reperfusion injury. *Can Urol Assoc J*, 8(5-6): E413–E418, 2014.
- **Lopez A, Prior M, Reiffenstein R, Goodwin LR.** Peracute toxic effects of inhaled hydrogen sulfide and injected sodium hydrosulfide on the lungs of rats. *Fundam Appl Toxicol* 12: 367–373, 1989.
- **López B, Moreno C, Salom MG, Roman RJ, Fenoy FJ.** Role of guanylyl cyclase and cytochrome P-450 on renal response to nitric oxid. *Am J Physiol Renal Physiol*: 281(3):F420-7, 2001.
- **López B, Salom MG, Arregui B, Valero F, Fenoy FJ.** Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension* 42(6):1150-6, 2003.
- **López Conesa E, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, López B, Arregui B, and García Salom M.** N-acetyl-l-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R730–R737, 2001.
- **Maines MD.** Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557–2268, 1988.
- **Maines, MD.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol* 37: 517-554, 1997
- **Maines MD.** The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol* 46: 573–585, 2000.

- **Małgorzata Iciek, Danuta Kowalczyk-Pachel, Anna Bilska-Wilkosz, Inga Kwiecien, Magdalena Gorny and Lidia Włodek.** S-sulphydration as a cellular redox regulation. *Biosci. Rep.* 36; art: e00304, 2016.
- **Marwaha A, Lokhandwala MF.** Tempol reduces oxidative stress and restores renal dopamine D1-like receptor-G protein coupling and function in hyperglycemic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F58–F66, 2006.
- **Mitsubishi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, Hiro-mura K, Ueki K, Nojima Y.** Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* 24: 529 –534, 2005.
- **Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M.E., and Kourembanas, S.** Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1475-1479, 1995.
- **Mustafa, AK, Gadalla MM, Sen, N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R. and Snyder SH.** H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulphydration. *Sci. Signal.* 2 (96) ra-72, 2009.
- **Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Stepan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH.** Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 109(11):1259-68, 2011.
- **O'Bryan GT, Hostetter TH.** The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 17: 93–100, 1997.
- **O'Donoghue TL, Walker BR.** Renal vasodilatory influence of endogenous carbon monoxide in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2908–H2915, 2000.
- **Ohishi K, Carmines PK.** Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 5: 1559–1566, 1995.
- **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* 61: 186–194, 2002.

- **Ozbilgin S, Ozkardesler S, Akan M, Boztas N, Ozbilgin M, Ugur B, Derici S, Ensari MG, and Meseri R.** Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats: The Role of Local Ischemic Preconditioning. *BioMed Research International*; Article ID 8580475, 2016.
- **Palm F, Buerk DG, Carlsson PO, Hansell P, Liss P.** Reduced nitric oxide concentration in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on renal oxygenation and microcirculation. *Diabetes* 54: 3282–3287, 2005.
- **Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabó C.** Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21972–21977, 2009.
- **Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW.** Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 190–197, 2003.
- **Perna AF, Luciano MG, Ingrosso D, Raiola I, Pulzella P, Sepe I, et al.** Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients. *J Renal Nutr*; 20:S11–S14, 2010.
- **Pieper GM.** Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia*; 42:204–213, 1999.
- **Pontié M, Gobin C, Pauporté Th Bedioui F, and Devynck J.** Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivity characterisation. *Anal Chim Acta* 411: 175–185, 2000.
- **Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M.** Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Lab Invest*; 86: 391–7, 2006.
- **Rodriguez F, Kemp R, Balazy M, Nasjletti A.** Effects of exogenous heme on renal function: role of heme oxygenase and cyclooxygenase. *Hypertension* 42: 680–684, 2003.

- **Rodríguez F, Lamon BD, Gong W, Kemp R, Nasjletti A.** Nitric oxide synthesis inhibition promotes renal production of carbon monoxide. *Hypertension* 43: 347–351, 2004.
- **Rodríguez F, Nieto-Ceron S, Fenoy FJ, et al.** Sex differences in nitrosative stress during renal ischemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 299(5): R1387-95; 2010.
- **Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt KU, Rosen S, Heyman SN.** Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 73: 34 –42, 2008.
- **Ryter SW and Otterbein LE.** Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 26: 270–280, 2004.
- **Ryter SW, Alam J, Choi AM.** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*; 86: 583-650, 2006.
- **Sacerdoti D, Colombrita C, Ghattas MH, Ismaeil EF, Scapagnini G, Bolognesi M, Li Volti G, Abraham NG.** Heme oxygenase-1 transduction in endothelial cells causes downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and of genes involved in inflammation and growth. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*; 51(4):363-70, 2005.
- **Salom MG, Arregui B, Carbonell LF, Ruiz F, González-Mora JL, Fenoy FJ.** Renal ischemia induces an increase in nitric oxide levels from tissue stores. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1459–R1466, 2005.
- **Salom MG, Ceron SN, Rodríguez F, et al.** Heme oxygenase-1 induction improves ischemic renal failure: role of nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293(6); 2007.
- **Salom MG, Nieto-Cerón S, Rodríguez F, López B, Hernández I, Gil J, Martínez-Losa A, Fenoy FJ.** Heme-oxygenase-1 induction improves ischemic renal failure. Role of nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3542–H3549, 2007.

- **Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N.** NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1144–F1152, 2005.
- **Schnackenberg CG, Wilcox CS.** The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int* 59: 1859–1864, 2001.
- **Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, Shah KS, Passmore JC, Tyagi SC.** Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F410 –F419, 2009.
- **Shibuya, N. and Kimura, H.** Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. *Front. Endocrinol*: 4:87, 2013.
- **Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Stahl B, Wachter U, Vogt J, Speit G, Hauser B, Möller P, Calzia E, Szabó C, Schelzig H, Georgieff M, Radermacher P, Wagner F.** Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *Shock* 35: 156 –163, 2010.
- **Siriussawakul A, Chen LI, Lang JD.** Medical gases: a novel strategy for attenuating ischemia-reperfusion injury in organ transplantation? *J Transplant* .doi: 10.1155/2012/819382. 2012.
- **Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C.** The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 26: 154–161, 2006.
- **Sivarajah A, Collino M, Yasin M et al.** Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*; 31: 267–74, 2009.
- **Sparatore A, Perrino E, Tazzari V, Giustarini D, Rossi R, Rossoni G, Erdman K, Schroder H, Soldato PD.** Pharmacological profile of a novel H<sub>2</sub>S-releasing aspirin. *Free Radic Biol Med* 46: 586 –592, 2009.

- **Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M.** Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*; 2:135-145, 2010.
- **Stipanuk MH and Beck PW.** Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206:267-277, 1982.
- **Stone JR, Marletta MA.** Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*; 10;33(18):5636-40, 1994.
- **Szabo C.** Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6: 917–935, 2007.
- **Thorup, C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, and Goligorsky MS.** Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F882-F889, 1999.
- **Toohey JI.** Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem J*; 264(3):625-32, 1989.
- **Tripatara P, Patel NS, Collino M, et al.** Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest*; 88:1038–48, 2008.
- **Tsilibary Effie C.** Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *JPathol* 2003; 200: 537–546, 2003.
- **Turkseven S, Kruger A, Mingone CJ, et al.** Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 289(2): H701-7; 2005.
- **Wallace JL.** Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci* 28: 501–505, 2007.
- **Wang R, Wang Z, Wu L, Hanna ST, Peterson-Wakeman R.**

Reduced vasorelaxant effect of carbon monoxide in diabetes and the underlying mechanisms. *Diabetes* 50: 166–174, 2001.

- **Wang Rui.** Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16:1792–1798, 2002.
- **Wang Rui.** The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal* 5: 493–501, 2003.
- **Wang Rui.** Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.*791-896; 2012.
- **Wang T, Sterling H, Shao WA, Shang QS, Bailey M, Giebisch G, Wang WH.** Inhibition of heme oxygenase decreases sodium and fluid absorption in the loop of Henle. *Am J. Physiol. Renal Physiol* 285:F484-F490, 2003.
- **Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W.** Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glyco-hemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem*; 39:138–42, 1993.
- **Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK.** The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite "scavenger"? *J Neurochem* 90: 765–768, 2004.
- **Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK.** Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 326: 794–798, 2005.
- **Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR.** Reappraisal of H<sub>2</sub>S/ sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1930–R1937, 2008.
- **Wilcox CS, M.D., Ph.D.** Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*; 126 (2): 119-145, 2010.

- **Xia M, Chen L, Rachel W. Muh, Pin-Lan Li and Ningjun Li.** Production and Actions of Hydrogen Sulfide, a Novel Gaseous Bioactive Substance, in the Kidneys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329 (3) 1056-1062; 2009.
- **Xu Z, Prathapasinghe G, Wu N, Hwang SY, Siow YL, O K.** Ischemia-reperfusion reduces cystathionine-beta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297(1): F27-35, 2009.
- **Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y and Niki I.** Distribution of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-producing enzymes and the roles of the H<sub>2</sub>S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 17(1): 32–40; 2013.
- **Yang G, Sun X, Wang R.** Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogenactivated protein kinases and caspase-3. *FASEB J* 18: 1782–1784, 2004.
- **Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R.** H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322: 587–590, 2008.
- **Yong R, Searcy DG.** Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 129–137, 2001.
- **Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK.** Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*; 333:1146–52; 2005.
- **Zabel U, Häusler C, Weeger M, Schmidt HH.** Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem*; 274(26):18149-52, 1999.
- **Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL.** Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-

mediated inflammation. *FASEB J*; 20: 2118–20, 2006.

- **Zhang J, Sio SW, Moochhala S, Bhatia M.** Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med*; 16: 417–24, 2010.
- **Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R.** The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20:6008–6016; 2001.
- **Zhao W, Wang R.** H<sub>2</sub>S induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H474 – H480, 2002.
- **Zhao W, Ndisang JF, Wang R.** The modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 848–853, 2003.
- **Zhu JXG, Kalbfleisch M, Yang YX, Bihari R, Lobb I, Davison M, Mok A, Cepinskas G, Lawendy A-R, and Sener A.** Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *Br J Urol Int* 110: E1218– E1227, 2012.
- **Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW Jr.** Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. *Hypertension* 35:342–347, 2000.