

Barrera iónica de la membrana basal glomerular durante la diabetes por estreptozotocina

M. Arévalo Gómez y E. Carrascal Marino

Departamento de Histología.
Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca

RESUMEN

La membrana basal glomerular supone un filtro selectivo que impide que, en condiciones normales, se pierdan proteínas del plasma a la orina. Uno de los factores condicionantes de esta barrera, quizá al que más importancia se ha dado en los últimos años, es la carga eléctrica que, en virtud de sus componentes, posee la membrana basal capilar del glomérulo. La mencionada carga provocaría por repulsión electrostática la exclusión de proteínas en el ultrafiltrado glomerular. En el presente trabajo, realizado con ratas albinas Wistar, hemos inyectado estreptozotocina, un antibiótico con propiedades diabetogénicas que, además, provoca un aumento de la excreción urinaria de albúmina, con objeto de estudiar si se produce pérdida de las cargas iónicas de la membrana basal glomerular, las cuales serían las responsables de la alteración del funcionamiento correcto del filtro.

Para efectuar nuestros propósitos hemos utilizado un trazador aniónico, ácido tánico, y dos trazadores catiónicos, rojo de rutenio y ferritina cationizada. Los animales fueron sacrificados a los siete y quince días de la inyección del tóxico, recogiendo la orina semanalmente. El análisis bioquímico de la misma revela que, efectivamente, se ha producido una alteración funcional en la barrera de filtración; sin embargo, los depósitos de los trazadores sobre la membrana basal glomerular permanecen de forma constante sin disminución apreciable a lo largo de la prueba. Estos resultados demuestran que no se producen alteraciones significativas en la barrera iónica de la membrana basal glomerular durante el curso de la diabetes inducida por estreptozotocina.

Palabras clave: **Membrana basal glomerular. Diabetes. Estreptozotocina.**

IONIC BARRIER OF THE GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE DURING STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

SUMMARY

Under normal conditions the glomerular basement membrane acts as a filter preventing the exit of the macromolecules, mainly proteins with an Einstein-Stokes radius of more than 35Å into the urine; however this basement membrane also has

Correspondencia: Dr. M. Arévalo Gómez.
Departamento de Histología.
Facultad de Medicina.
Fonseca, s/n.
37007 Salamanca

Recibido: 15-VII-85
En forma definitiva: 10-IX-85
Aceptado: 11-IX-85

a network with electrostatic charges distributed at regular intervals which allows, neutral or positively charged macromolecules, to pass through the glomerular filter with no difficulty. By contrast, negatively charged macromolecules of the same size, are prevented from doing so and hence do not enter the urinary space. It is currently thought that anionic sites present in the basement membrane, responsible for this phenomenon must be made of a proteoglycan, heparan sulphate, since its elimination by enzymatic digestion facilitates the passage of macromolecules through the membrane.

An increased urinary albumin excretion occurs early in the course of the streptozotocin-diabetes in rats. The purpose of this study was to find out if this happens through a loss of ionic charge in the glomerular basement membrane. We injected streptozotocin, an antibiotic possessing anti-tumor, oncogenic and diabetogenic properties into Wistar albino rats. Urine was collected weekly for the detection of proteinuria. The rats were given one anionic tracer, tannic acid, and two cationic tracers, ruthenium red and cationized ferritin. Ultrastructural studies showed that deposits of the tracers on the basement membrane remained constant with no appreciable losses through-out the experimental period. These results show that no significant alterations take place in the ionic charge of the filter during the course of streptozotocin-induced diabetes.

Key words: *Glomerular basement membrane. Diabetes. Streptozotocin.*

Introducción

En condiciones normales, la membrana basal glomerular (MBG) actúa como un filtro, el cual detiene la salida de macromoléculas, principalmente proteínas, que posean un radio de Einstein-Stokes mayor de 35 \AA^1 . Pero además esta membrana basal constituye un entramado de cargas electrostáticas que permiten que, para un mismo tamaño, las macromoléculas neutras o cargadas positivamente pasen sin dificultad el filtro glomerular y, sin embargo, las macromoléculas negativas sean detenidas, impidiendo su paso al espacio urinario^{2, 3}. Hoy día se cree que los lugares aniónicos presentes en la MBG⁴, responsables del mencionado fenómeno, estarían formados por el proteoglicano heparán sulfato (HS)^{5, 6}, ya que su destrucción mediante digestión enzimática permite una mayor permeabilidad a macromoléculas por parte de la MBG^{7, 8}.

En estudios realizados con diferentes modelos experimentales se ha sugerido que el aumento de la permeabilidad de la MBG sería debido a una pérdida de las cargas negativas de dicha membrana por una disminución en la síntesis de HS o un aumento de su degradación⁹⁻¹². Por el contrario, otros investigadores no encuentran que exista pérdida de tales lugares aniónicos en los mismos modelos experimentales¹³⁻¹⁵.

Esta aparente contradicción de resultados es lo que nos ha llevado a incidir en el estudio de la barrera iónica de la MBG durante el curso de la diabetes química provocada por estreptozotocina, para lo cual hemos utilizado un marcador aniónico, ácido tánico, y dos marcadores catiónicos, rojo de rutenio y ferritina cationizada.

La estreptozotocina es un antibiótico de amplio espectro con propiedades antitumorales, oncogénicas y diabetogénicas¹⁶⁻¹⁸. Esta última acción está mediada por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas^{19, 20}, por lo que este antibiótico se ha utilizado para inducir diabetes mellitus en animales experimentales. Al mismo tiempo se ha observado que en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina se produce, ya desde estadios iniciales, un aumento de la excreción urinaria de albúmina²¹. Este hecho, unido a que, según está descrito, prácticamente no se observan alteraciones en la estructura de la barrera glomerular, es lo que nos ha llevado a elegir el modelo experimental mencionado.

Material y métodos

Se han utilizado 20 ratas albinas Wistar, machos y hembras indistintamente, con un peso entre 150 y 175 g. Catorce animales recibieron una inyección intraperitoneal única de estreptozotocina (SIGMA Chemical Company) a una dosis de 6,5 mg/100 g de peso corporal disueltos en una solución de cloruro sódico isotónico al 0,9 %. Los restantes animales se utilizaron como controles y fueron inyectados con el suero salino solamente. Todas las ratas fueron alojadas en jaulas metabólicas individuales, recogiendo la orina semanalmente, la cual fue analizada en un aparato Clino-Tek AMES por medio de tiras reactivas.

Los animales fueron sacrificados a los siete y quince días de la inyección de la estreptozotocina (siete cada vez, de los cuales se utilizaron dos para cada una de las técnicas con los marcadores y uno para

realizar la técnica habitualmente empleada en microscopia electrónica). Los controles se sacrificaron en los mismos períodos (tres cada vez). Todos fueron anestesiados previamente con hidrato de cloral al 30%, a una dosis de 0,1 ml/100 g. de peso corporal.

Técnica del ácido tánico

Tras extirpar los riñones se tallaron microbloques de 1 mm³ de corteza renal, que se fijaron en una solución compuesta por ácido tánico (Merck) al 8% en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 y glutaraldehído al 2,5% en el mismo buffer a temperatura ambiente durante noventa minutos; transcurrido este tiempo, los bloques se lavaron con buffer y se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% durante una hora a 4° C; posteriormente se deshidrataron en series crecientes de acetona y se incluyeron en resina durcupan.

Técnica del rojo de rutenio

Los animales se perfundieron por vía cardíaca a través del ventrículo izquierdo, primero con suero fisiológico heparinizado durante un minuto, para efectuar el lavado sanguíneo total, seguido inmediatamente por una solución compuesta por glutaraldehído al 3,6% en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 y rojo de rutenio (Sigma Chemical Company) purificado según la descripción de Luft²² durante sesenta minutos. A continuación se extirparon los riñones y se tallaron microbloques que se lavaron en buffer cacodilato (tres pases de diez minutos), tras lo cual los tejidos se postfijaron durante tres horas a temperatura ambiente en una mezcla de rojo de rutenio al 1% y tetróxido de osmio al 1%. Se deshidrataron e incluyeron según describimos más arriba.

Técnica de la ferritina cationizada

Las ratas utilizadas para esta técnica fueron inyectadas intravenosamente con una dosis de 0,5 ml/100 g de peso corporal de ferritina cationizada (ferritina de bazo de caballo copulada con N,N-dimetil-1-3-propanodiamina en suero fisiológico 0,15 M a una concentración de 10 mg/ml Sigma Chemical Company). Transcurridos quince minutos desde la inyección se extirparon los riñones y, tras tallar pequeños bloques de corteza renal, éstos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 durante noventa minutos, lavando a continuación las piezas en buffer y postfijándolas en tetróxido de osmio al 1% durante una hora, deshidratando e incluyendo en resina finalmente.

De todos los bloques preparados se efectuaron cortes ultrafinos con cuchillas de cristal en un ultramicrotomo LKB Ultratome III; dichos cortes fueron examinados en un microscopio electrónico Philips EM 201 con un potencial de aceleración de 40 Kv.

Solamente se contrastaron con plomo y uranilo las rejillas preparadas a partir de las piezas procesadas con ácido tánico.

Resultados

Los animales inyectados con estreptozotocina no presentaron proteínas ni glucosa en orina en el momento de la inyección del tóxico. A los siete días se detectó en todos ellos una proteinuria moderada, con cifras que oscilaban alrededor de los 30 mg/dl, y al mismo tiempo una glucosuria entre los 10 y los 16 g/l. A los quince días se mantiene la proteinuria, llegando en algunos casos hasta 100 mg/dl, incrementándose la glucosuria en todos los animales.

La glucemia, normal al inicio de las pruebas, se incrementó hasta detectar niveles de glucosa en sangre superiores a los 150 mg/ml a los siete días y superiores a 300 mg/ml a los quince días.

Los animales control no presentaron ni proteinuria, ni glucosuria, ni niveles de glucemia altos en ningún momento a lo largo de la prueba.

Cuando se observan con el microscopio electrónico los glomérulos de los animales inyectados con el tóxico no se evidencian cambios ultraestructurales, permaneciendo intactos los podocitos, MBG y endotelio capilar a lo largo de la prueba.

En los cortes de las piezas tratadas con ácido tánico se observa que el trazador ha reaccionado de forma intensa con la MBG, sobre todo con la lámina densa (LD), poniendo en evidencia la estructura trilaminar de esta membrana. Llamamos la atención las formaciones filamentosas densas que aparecen en las láminas claras, de forma más evidente en la lámina clara externa (LCE). Dichas formaciones están dispuestas perpendicularmente a la LD, cuando se observan cortes transversales, y adoptan una disposición periódica, dejando espacios claros entre ellas. Las mencionadas estructuras no aparecen a nivel de las ranuras interpedicelares (fig. 1). A lo largo de la prueba se registró esta misma disposición del marcador sin variaciones apreciables (fig. 2).

El rojo de rutenio se ha depositado en la MBG en forma de partículas densas de aproximadamente 20 nm, espaciadas a intervalos de 55-65 nm y que están localizadas en las láminas claras, pero de forma más regular sobre la LCE (fig. 3). Esta disposición del trazador se mantiene inalterable a los quince días (fig. 4) y es la misma que se puede observar en animales control.

La ferritina cationizada, a los siete días de la inyección del tóxico, se ha depositado en la MBG en forma de partículas densas redondeadas de aproximadamente 6 nm, dispuestas en acúmulos sobre la lámina clara interna (LCI), siendo escasas las que se observan en la LCE y LD (fig. 5). A los quince días siguen apareciendo de forma casi exclusiva en la LCI,

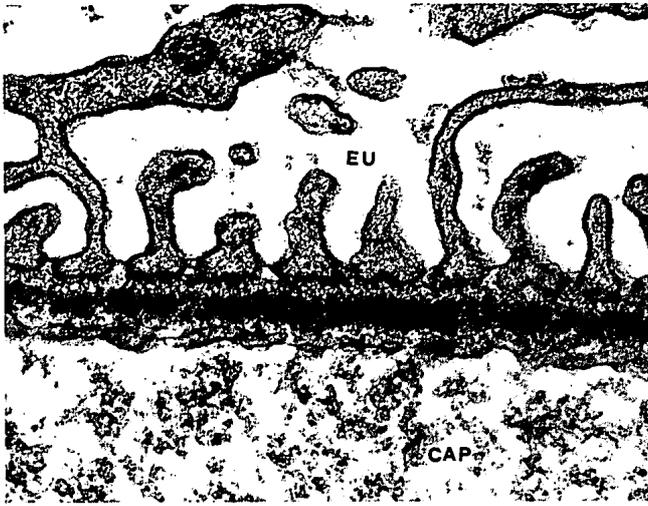


Fig. 2.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica del ácido tánico. Cabeza de flecha: diafragma de la hendidura interpedicelar; CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. (126.000 X.)

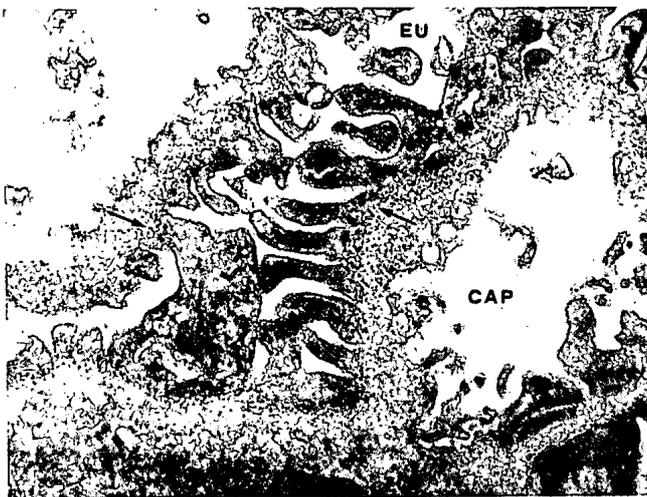


Fig. 1.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica del ácido tánico. CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. (142.000 X.)

sin atravesar la barrera glomerular, ya que no se han observado partículas en el espacio urinario (fig. 6). Esta misma disposición del trazador es la que se observa en cortes de animales control.

Discusión

La restricción del paso de macromoléculas por el filtro glomerular se debe a un sistema complejo de factores, unos inherentes a la propia barrera, como son el obstáculo mecánico y las cargas electrostáticas^{1, 23}, y otros dependientes de las propias macromoléculas endógenas, tales como el tamaño y configuración moleculares o su carga eléctrica²⁴⁻²⁶. Hay que tener en cuenta, además, la influencia hemodinámica del flujo y la presión plasmática, que actúan como una fuerza que acelera o restringe la filtración glomerular²⁴.

En los últimos años se ha prestado una especial atención al componente electrostático de la MBG, ya que se ha descrito que un defecto en sus cargas puede conducir a la proteinuria observada en distintos procesos patológicos renales^{10, 11, 27}.

No se ha hecho mucho hincapié en las cargas positivas de la MBG, ya que parecen tener menor importancia en la restricción a proteínas. En el presente trabajo hemos estudiado la situación de estos lugares catiónicos con ácido tánico, ya que este compuesto se comporta como un anión a pH neutro^{28, 29}. Los resultados obtenidos indican que es la LD la que poseería mayor número de cargas positivas, repartidas por toda ella de forma homogénea, estando estas cargas distribuidas periódicamente de forma filamentosas en las láminas claras, con más intensidad en la LCE. Tras provocar una diabetes química con estreptozotocina y estudiar lo que ocurre en el riñón a lo largo del curso del proceso, hemos observado que los mencionados lugares catiónicos no sufren alteración en ningún momento, por lo que, en efecto, parece que estas cargas no estarían involucradas en la restricción proteica por parte de la MBG, a pesar de existir proteinuria, como demuestra el análisis bioquímico de la orina de los animales utilizados en el experimento.

Por otra parte, parece que los lugares aniónicos tendrían un mayor protagonismo en la restricción proteica, y se ha sugerido que existiría una pérdida de los mismos en modelos experimentales como la

Fig. 3.—Sección sagital de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica del rojo de rutenio. CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. Flechas: lugares aniónicos marcados con el trazador. (84.000 X.)

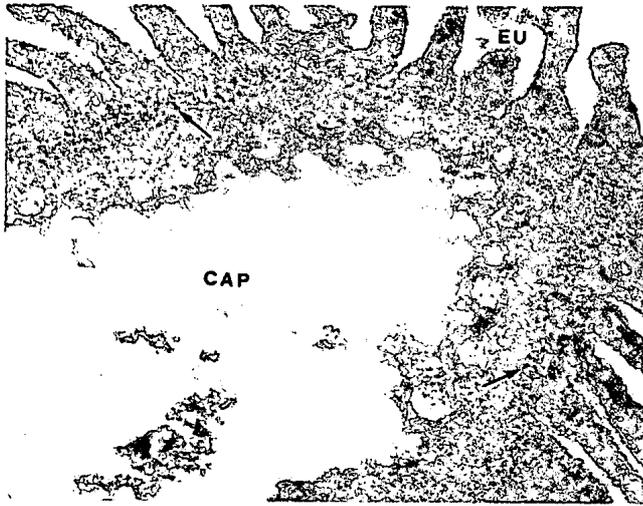


Fig. 4.—Sección sagital de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica del rojo de rutenio. CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. Flechas: lugares aniónicos. (126.000 X.)

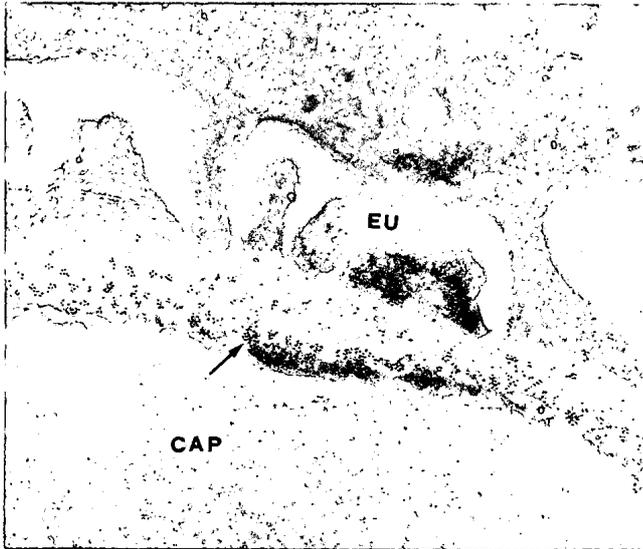
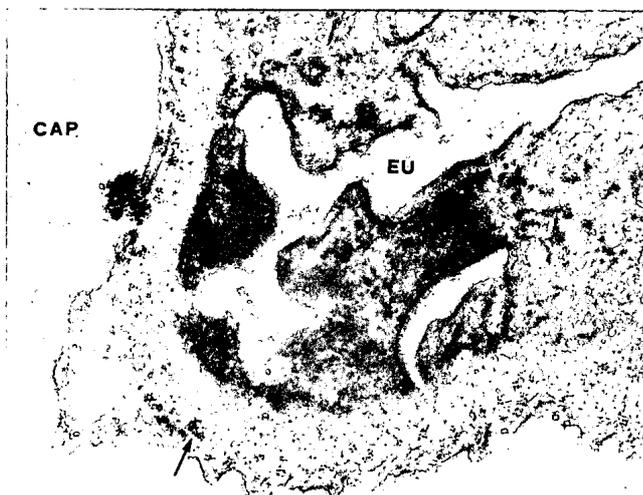


Fig. 5.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los siete días. Técnica de la ferritina cationizada. CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. Flecha: acúmulo de partículas de ferritina cationizada en la LCI. (142.000 X.)



nefrosis por aminonucleósido de puromicina⁹⁻¹², sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo indican que en los animales diabéticos, a pesar de existir una alteración funcional renal, persisten las mencionadas cargas negativas, puestas en evidencia con los trazadores rojo de rutenio y ferritina cationizada; todo lo cual indica que los lugares aniónicos no serían los responsables del mantenimiento de la barrera a macromoléculas. Sin embargo, su destrucción con heparinas, ya que se han identificado con radicales del proteoglicano heparán sulfato, produce un aumento de la permeabilidad a proteínas en la MBG^{7, 8}. Este contrasentido podría aclararse si se tienen en cuenta que los mecanismos de filtración glomerular son multifactoriales y deben ser considerados en conjunto y no individualmente. En este sentido se explicaría la diferente disposición que adoptan el rojo de rutenio y la ferritina cationizada en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que uno (rojo de rutenio) lo hace preferentemente en la LCE y otro (ferritina cationizada) en la LCI. Al ser de mayor tamaño la molécula de ferritina, quedaría retenida, en su mayor parte, en un primer filtro mecánico existente en la LD, que no dejaría que las moléculas de ferritina cationizada llegasen más allá de la LCI. La existencia de este filtro ha sido sugerida anteriormente²³.

Probablemente la proteinuria observada en la diabetes química por estreptozotocina se deba a cambios conformacionales de la estructura molecular de la MBG que no afectan a la distribución de sus cargas eléctricas.

Bibliografía

1. Karnovsky M: *Kidney disease: present status* 1-41. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore, 1979.
2. Kanwar Y y Farqhar M: Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the lamina rara by cationic probes. *J Cell Biol* 81:137-153, 1979.
3. Latta H, Johnson W y Stanley T: Sialoglycoproteins and filtration barriers in the glomerular capillary wall. *J Ultr Res* 51:354-376 1975.
4. Rennke H, Cotran R y Venkatachalam M: Role of molecular charge in glomerular permeability. *J Cell Biol* 67:638-646, 1975.
5. Kanwar Y y Farqhar M: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1303-1307, 1979.

Fig. 6.—Sección transversal de la MBG de una rata sacrificada a los quince días. Técnica de la ferritina cationizada. CAP: luz del capilar; EU: espacio urinario. Flecha: acúmulo de partículas en la LCI. (142.000 X.)

6. Kanwar Y, Hascall V y Farqhar M: Partial characterization of newly synthesized proteoglycans isolated from the glomerular basement membrane. *J Cell Biol* 90:527-532, 1981.
7. Rosenzweig L y Kanwar Y: Removal of sulfated (Heparan Sulfate) and non-sulfated (Hyaluronic acid) Glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to ¹²⁵I-Bovine serum albumin. *Lab Invest* 47:177-184, 1982.
8. Kanwar Y, Lynker A y Faqhar M: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of GAG (Heparan Sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol* 86:688-693, 1980.
9. Cauldfield J: Alterations in the distribution of Alcian Blue staining fibrillar anionic sites in the glomerular basement membrane normal and aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 40:503-511, 1979.
10. Cauldfield J y Farqhar M: Loss of an ionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 39:505-512, 1978.
11. Michael A, Blau, E y Vernier R: Glomerular polyanion: alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 23:649-657, 1970.
12. Mynderse L, Hassell J, Kleiman H, Martin G y Martínez-Hernández A: Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrosis rats. *Lab Invest* 48:292-302, 1983.
13. Kanwar Y, Rosenzweig L y Kejachki D: Glycosaminoglycans of the glomerular basement membrane in normal and nephrotic states. *Renal Physiol* 4:121-130, 1981.
14. Kanwar Y y Jakubowsky M: Unaltered anionic sites of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 25:613-618, 1983.
15. Seiler M, Hoyer J y Krueger T: Altered localization of protamine-Heparin complexes in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 43:9-17, 1980.
16. Gamble D, Kinsley M, Fitzgerald M, Bolton R y Taylor K: Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J* 3:627-634, 1969.
17. Rakietyen N, Gordon B, Cooney D, Davis R y Schein P: Renal tumorigenic action of Streptozotocin in rats. *Cancer Chemother Rep* 52:563-572, 1968.
18. Rakietyen N, Rakietyen M y Nadkarini M: Studies on the diabetogenic actions of Streptozotocin. *Cancer Chemoter Rep* 29:91-101, 1963.
19. Junod A, Lambert A, Orci L, Pictet R, Gonet A y Renold A: Studies of the diabetogenic action of Streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:201-205, 1967.
20. Stearns S y Benzo C: Glucagon and insulin relationship in genetically diabetic and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hormone Metabol Res* 10:20-23, 1978.
21. Mauer S, Brown D, Matas A y Steffes M: Effects of pancreatic islet transplantation on the increased urinary albumin excretion rates in intact and uninephrectomized rats with diabetes mellitus. *Diabetes* 27:959-971, 1978.
22. Luft J: Ruthenium Red and Violet: Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat Record* 171:347-368, 1972.
23. Schurer W, Fleuren G, Hoedemaker P y Molenaar I: A model for the glomerular filter. *Renal Physiol* 3:237-243, 1980.
24. Renkin E y Gilmore J: Glomerular filtration. In *Handbook of Physiology* 185-248. Ed Orloff J and Berliner R. Washington DC, 1973.
25. Chang R, Deen W, Robertson C y Brenner B: Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* 8:212-218, 1975.
26. Rennke H, Patel Y y Venkatachalam M: Effect of molecular charge on the glomerular permeability to the proteins in the rat: clearance studies using neutral, anionic and cationic horseradish peroxidase. *Kidney Int* 13:278-288, 1978.
27. Brenner B, Hostetter T y Humes H: Molecular basis of proteinuria origin. *N Engl J Med* 298:826, 1978.
28. Carrascal E, Martín J y Merchán J: Estudio con ácido tánico del sarcolema de fibras musculares cardiacas. *Morf Norm y Patol* 4:205-212, 1980.
29. Bonilla E: Staining of transverse tubule system of skeletal muscle by Tannic Acid Glutaraldehyde fixation. *J Ultr Res* 58:162-165, 1977.