



Radicales libres de oxígeno e insuficiencia renal en el anciano

M. C. Iglesias, M. P. Ruiz Torres, F. J. O'Valle**, D. Rodríguez Puyol* y M. Rodríguez Puyol

Departamentos de Fisiología, Universidad de Alcalá y *Sección de Nefrología, Hospital Príncipe de Asturias de Alcalá y **Departamento de Patología, Universidad de Granada.

RESUMEN

El envejecimiento renal se caracteriza por una disminución paulatina del filtrado glomerular, en el contexto de una nefrosclerosis progresiva. Los mecanismos implicados en su génesis y la posibilidad de realizar una prevención farmacológica eficaz no se conocen con precisión en la actualidad. Los presentes experimentos se diseñaron para intentar evaluar el posible papel del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en el desarrollo de la esclerosis renal progresiva característica del envejecimiento. Además, se evaluó la importancia en estos procesos de los llamados metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO), tratando de prevenir los cambios asociados al envejecimiento mediante el tratamiento de animales viejos con un antioxidante, la taurina. Los animales viejos presentaban una proteinuria progresivamente creciente, en relación con los animales jóvenes. La producción de MADO tanto en glomérulos como en células mesangiales procedentes de animales viejos, fue significativamente mayor. El contenido en TGF- β en la corteza renal de estos mismos animales mostró un incremento en relación con los jóvenes. Asimismo, este aumento en el TGF- β dio lugar a un incremento en el colágeno tipo IV que fue progresivo con la edad. El peróxido de hidrógeno indujo un claro aumento en la expresión del TGF- β en células mesangiales en cultivo, que fue estadísticamente significativo respecto a las células cultivadas en condiciones control. Cabe destacar el hecho de que animales viejos tratados con un antioxidante exógeno, la taurina, muestran una clara disminución en la expresión de colágeno tipo IV en su corteza renal, disminuyendo por tanto, el grado de esclerosis en estos animales. En conclusión, los presentes resultados permiten sugerir que los metabolitos activos derivados del oxígeno, posiblemente a través de la activación del TGF- β , juegan un papel patogénico en la nefrosclerosis asociada al envejecimiento, y que por tanto, un tratamiento con un antioxidante puede prevenir la esclerosis renal.

Palabras clave: **Radicales libres. Envejecimiento.**

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND AGE-RELATED RENAL FAILURE

SUMMARY

Aging kidney is characterized by the development of structural and functional changes. Among the structural features we and others found glomerular sclerosis and interstitial fibrosis. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) is known to play a critical role in the genesis of these alterations in pathological conditions. The present studies were performed to examine the hypothesis that TGF- β_1 may be involved in the development of age-related histopathologic changes in rat kidney. We also tested the potential role of reactive oxygen species in these processes, trying to inhibit the expression of collagen type IV with treatment with taurine, an antioxidant aminoacid. We demonstrate that there is an augmented production of reactive oxygen species with age (figure 1), with a parallel increase in TGF- β_1 mRNA expression, measured with reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (figure 2). Northern blot analyses showed an increase in collagen type IV mRNA levels in old animals, being statistically significant at 18 months old, and augmenting at 24- and 30 months old (figure 3). On the other hand, in cultured mesangial cells, the mRNA expression of TGF- β_1 was stimulated by treatment with hydrogen peroxide (figure 4). Interestingly, administration of taurine showed a significant decrease in the expression of collagen type IV (figure 5). This effect of taurine could be the consequence of the interaction of the aminoacid with the TGF- β_1 system. Our results strongly support a crucial role for ROS in the pathogenesis of age-related progressive renal fibrosis, perhaps through interaction with the TGF- β_1 pathway. The inhibitory effects of antioxidants on the expression of extracellular matrix proteins could lead to the delay of the progression of the aging-related renal disfunction.

Key words: **Reactive oxygen species. Aging.**

INTRODUCCION

Desde el punto de vista de la función renal, el envejecimiento se caracteriza por una reducción progresiva de la filtración glomerular a partir de la cuarta o quinta década de la vida, con un déficit funcional significativo que se manifiesta, principalmente, en la aparición de proteinuria^{1,2}.

El sustrato anatomopatológico de este deterioro funcional es complejo, pero podría encuadrarse en una fibrosis progresiva de las estructuras renales^{3,4}. Junto a los glomérulos se observa en los riñones de las personas ancianas una cicatrización intersticial progresiva con atrofia tubular, así como una afectación vascular característica, con engrosamiento de las paredes vasculares y obliteración de las luces capilares⁵.

Los mecanismos implicados en este proceso no han sido estudiados exhaustivamente por el momento. En líneas generales se piensa que la aparición de estas clases de lesiones es el resultado de dos tipos de fenómenos que, en grado variable se superponen: la proliferación de las células residen-

tes en el glomérulo, y la acumulación de matriz extracelular.

En un proceso de glomerulosclerosis, parece existir una total sobreexpresión de las proteínas de matriz. Este fenómeno puede ser la manifestación de una síntesis proteica incrementada, pero también un déficit en los sistemas de degradación.

Entre los mediadores biológicos que desencadenan los acontecimientos que afectan a la matriz destaca el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)⁶. Se ha podido comprobar que el TGF- β produce un aumento en la transcripción de los genes que codifican para algunos componentes de matriz como el colágeno IV y I, fibronectina y laminina⁷ y por otro lado produce la inhibición de la transcripción de varias proteinasas.

En los últimos años ha cobrado gran fuerza la hipótesis de que parte de estos procesos pueden estar mediados por los llamados metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO). Los MADO han sido implicados en diversos modelos de patologías renales, existiendo una producción incrementada de éstos en estructuras glomerulares procedentes de animales en-

fermos. La hipótesis de que los MADO juegan un papel importante en estos procesos, se ha visto corroborada por el hecho de que la administración de determinados antioxidantes exógenos a animales, en modelos de nefropatía experimental, mejora sensiblemente su función renal⁸. Por otro lado, los MADO han sido implicados de forma importante en procesos de envejecimiento^{9,10}.

El objetivo del presente trabajo es analizar el papel que juegan los MADO en el deterioro progresivo de la función renal, que tiene lugar como consecuencia del envejecimiento, evaluando su influencia en los fenómenos matricénicos en estos procesos.

MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación

Todos los estudios se realizaron en ratas Fisher-334 macho, en las que se controló cuidadosamente la edad desde el nacimiento. Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad de Alcalá de Henares, en un medio libre de patógenos, alimentados con una dieta estándar y con libre acceso al agua.

Diseño experimental y determinaciones en sangre y orina

Los animales fueron estudiados a los 3, 18, 24 y 30 meses de edad. Cada grupo experimental estaba formado por 10 individuos. Los animales de 24 y 30 meses se distribuyeron en controles ($n = 5$) y tratados ($n = 5$). El tratamiento administrado a estas ratas fue la taurina al 2%, utilizándose para su vehiculización el agua de bebida durante los tres meses previos a alcanzar la edad de estudio. Una semana antes de cumplir esta edad, las ratas fueron introducidas en cajas metabólicas individuales, procediéndose a la recogida de dos períodos de orina de 24 horas, sacrificándose posteriormente los animales. Una vez obtenida la orina y tras medir el volumen, se centrifugó para retirar los posibles contaminantes. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su análisis.

Obtención de glomérulos y de células mesangiales en cultivo

Tras el sacrificio, se perfunden y extraen los riñones y una muestra de corteza se utiliza para obtener glomérulos aislados mediante tamizado diferencial¹¹. Las

preparaciones fueron observadas al microscopio antes de su utilización asegurándose que contenían glomérulos decapsulados y con una contaminación tubular menor del 5. Los glomérulos destinados al análisis de la producción de MADO fueron procesados inmediatamente. El cultivo de células mesangiales se realizó mediante técnicas previamente descritas¹².

Medida de la producción de metabolitos activos derivados del oxígeno

Las medidas se realizaron en glomérulos aislados y en cultivo primario de rata. La cuantificación se realizó de acuerdo con el método de Baud y cols.¹³. Los glomérulos aislados se incubaron durante 30 minutos a 37°C con rojo fenol (Sigma) y peroxidasa de rábano tipo II (Sigma) en tampón fosfato (KH_2PO_4 10 Mm de dextrosa y NaCl 140 mM, pH 7.0). Tras centrifugar se recogieron los sobrenadantes y se les añadió NaOH 3M para ajustar su pH a 12.5. Las absorbancias se leyeron a 610 nm frente a un blanco que contenía los mismos reactivos excepto la muestra. Los resultados se interpolaron en una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno y se corrigieron por número de glomérulos. Las células se tripsinizaron y esta suspensión se usó para la valoración de igual forma que en el caso de los glomérulos.

Extracción del RNA total y Northern blot

Uno de los trozos obtenidos de la corteza renal se introdujo en solución desnaturante (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, N-Laurylsarcosina 0,5% y β -mercaptoetanol 0,1 M). La extracción se realizó según el método de Chonczynski¹⁴. El producto final se resuspendió en agua con DEPC, y se calculó su concentración a 260 nm en un espectrofotómetro. Los ARN se separaron en un gel desnaturante de agarosa al 1%, conteniendo formaldehído. Posteriormente se transfirió el ARN a una membrana de nylon *Hybond D* (Amersham Ibérica, UK). La sonda utilizada fue la cadena α_1 del colágeno IV de ratón. Dicha sonda se marcó con [^{32}P]-deoxi-CTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) utilizando un kit *Rediprime* (Amersham Ibérica, UK). Las membranas se hibridaron con dicha sonda y finalmente se lavaron para evitar las posibles uniones inespecíficas. Posteriormente se pusieron en contacto con películas de autorradiografía (X. OMAT S de Kodak). Los análisis densitométricos se efectuaron en un escáner Apple combinado con un programa de

análisis de imagen. Los resultados fueron expresados como porcentajes respecto al control, después de calcular el cociente entre COL IV/28 S.

Valoración de la expresión de TGF- β_1 por la reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (RT-PCR cuantitativa)

Una vez obtenido el ARN total, se obtuvo el ADNc mediante una transcriptasa inversa (RT). Este ADNc fue amplificado utilizando la técnica de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). Se emplearon las secuencias de oligonucleótidos amplificadores (primers) específicos para el TGF- β de rata¹⁵. El competidor utilizado (588 pares de bases) se construyó con un kit (PCR MIMIC, Clontech, USA), y su secuencia contenía la secuencia de homología de los primers de TGF- β . Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del competidor, con el fin de obtener un rango de concentraciones desde 0,5 a 0,0005 attomoles. Se realizaron 7 RT para cada muestra y finalmente, se realizó la PCR con las condiciones de amplificación adecuadas¹⁶. En cada uno de los siete tubos se añadió una concentración conocida de competidor.

Métodos estadísticos

Todas las determinaciones se expresan como media \pm eem. Las comparaciones estadísticas de todas aquellas distribuciones de valores cuantitativos se realizaron mediante análisis de varianza seguido de prueba de comparación múltiple de medias de Neumann-Keuls, una vez comprobada la normalidad de dichas distribuciones. Cuando los valores fueron cualitativos se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

RESULTADOS

El análisis de la función renal de las ratas estudiadas reveló un aumento de la excreción diaria de proteínas en orina, de forma significativa ya en el grupo de 18 meses (3 meses: $23,7 \pm 5,3$; 18 meses: $162 \pm 18^*$; 24 meses: $310 \pm 23^*$; 30 meses: $460 \pm 15^*$ mg/ml. $*p < 0,05$ vs 3 meses). Este hecho es indicativo de una disfunción en las barreras de ultrafiltración glomerular. En cuanto al aclaramiento de creatinina no se modificó significativamente en ninguno de los grupos estudiados.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los valores de presión arterial sistémica

de las ratas estudiadas, tampoco hubo variación de estos valores en las ratas tratadas con taurina (datos no mostrados).

La figura 1 refleja un importante aumento en la síntesis de peróxido de hidrógeno en glomérulos aislados y células mesangiales en cultivo de los animales de 18 meses respecto al grupo de ratas jóvenes. Esta mayor producción de MADO en los animales viejos correlaciona con los resultados obtenidos al analizar los fenómenos relacionados con la acumulación de componentes de matriz extracelular estudiados en los mismos animales. Así, en la figura 2 puede observarse cómo la expresión génica de TGF- β es tanto mayor cuanto más viejo es el animal, siendo la diferencia significativa a partir de los 18 meses. De igual forma evoluciona la expresión de ARNm de colágeno IV (fig. 3), llegando a ser tres veces superior en los animales de

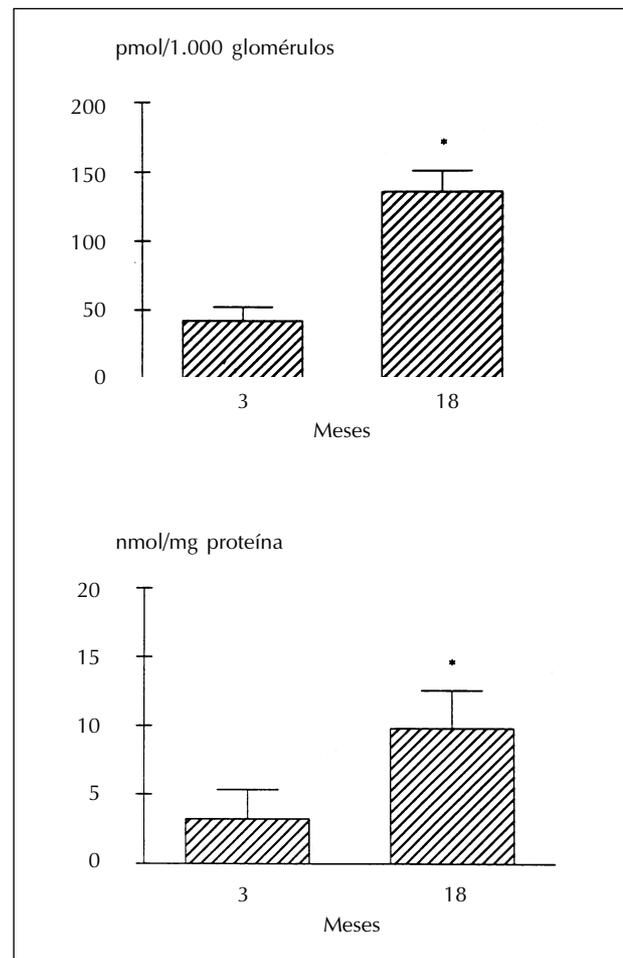


Fig. 1.—Producción de peróxido de hidrógeno en glomérulos aislados de rata y células mesangiales en cultivo. Datos expresados como media \pm error estándar de la media de 10 animales por grupo. $*p < 0,01$ vs 3 meses.

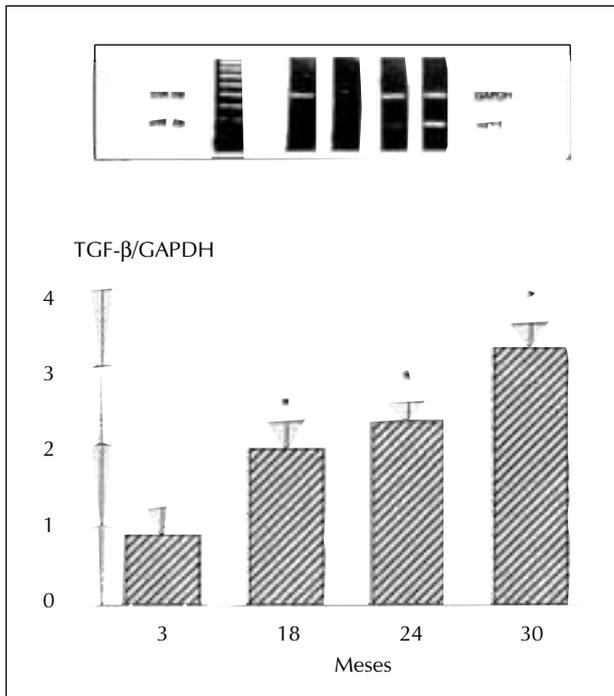


Fig. 2.—Valoración de los niveles de ARNm de TGF-β en corteza renal, mediante RT-PCR semicuantitativa. Datos expresados como media ± error estándar de 10 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs 3 meses.

30 meses respecto a los de 3 meses y de nuevo siendo la diferencia significativa desde los 18 meses. El resultado más interesante es el mostrado en la figura 4, en ella se pone en evidencia el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de TGF-β en células mesangiales de rata en cultivo, de forma que, tras el tratamiento de las células con este MADO el contenido de ARN mensajero de TGF-β fue 2,5 veces superior respecto a las células mantenidas en condiciones control. Se encuentra, por tanto, una relación directa entre la producción incrementada de MADO en glomérulos y células de animales viejos y el aumento en la expresión de TGF-β en corteza renal de las mismas ratas.

Este resultado se ve confirmado, de alguna manera, al analizar los resultados obtenidos en los animales que fueron tratados durante 3 meses con taurina, un antioxidante exógeno. Los niveles de expresión de colágeno IV (fig. 5) de las ratas tratadas disminuyeron significativamente, tanto en el grupo de 24 meses como en el de 30, respecto a sus controles.

DISCUSION

Los estudios en ratas viejas ofrecen un buen modelo para analizar los problemas inherentes al envejecimiento renal, ya que el espectro de alteraciones

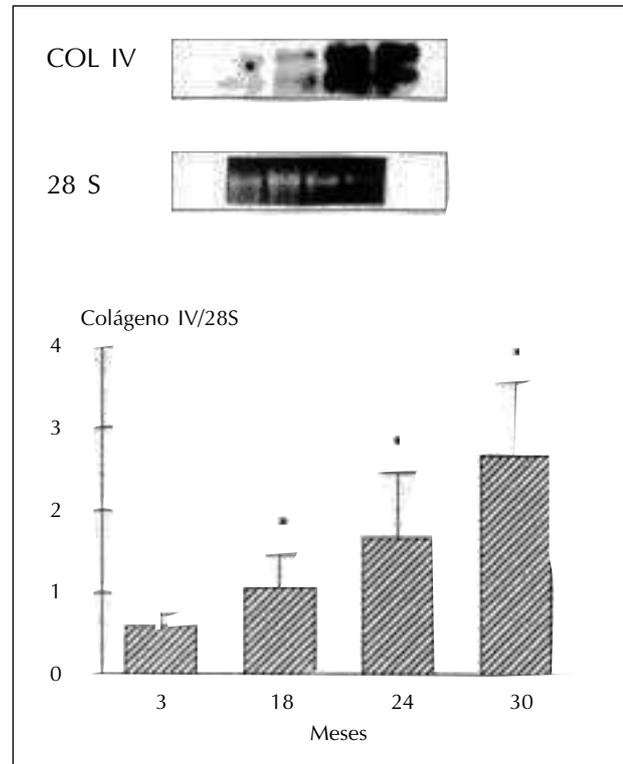


Fig. 3.—Expresión de colágeno IV en corteza renal de ratas de 3, 18, 24 y 30 meses, por técnicas de Northern blot. Datos expresados como media ± error estándar de 10 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs 3 meses.

funcionales y estructurales que presentan, a partir de los 18 meses, remeda notablemente a los cambios observados en la especie humana.

La analítica plasmática y urinaria de las ratas viejas fue superponible prácticamente, a la de los jóvenes (datos no mostrados), no hallándose, por otra parte, signos externos de enfermedad. Este hecho tiene gran importancia, puesto que el interés del presente trabajo reside principalmente en dilucidar los mecanismos que disparan la aparición de esclerosis glomerular en el envejecimiento, independientemente de otras patologías.

La alteración más evidente que produce el envejecimiento glomerular tanto en el hombre², como en la rata³ y que confirma nuestro resultado, es un aumento en la excreción urinaria de proteínas, lo que puede ser indicativo de una disfunción en las barreras de filtración, preferentemente debida a cambios en la carga iónica y en la composición de la membrana basal glomerular.

Como primer punto para demostrar nuestra hipótesis se pretendió evaluar la síntesis de MADO, encontrándose un incremento significativo en los glomérulos de

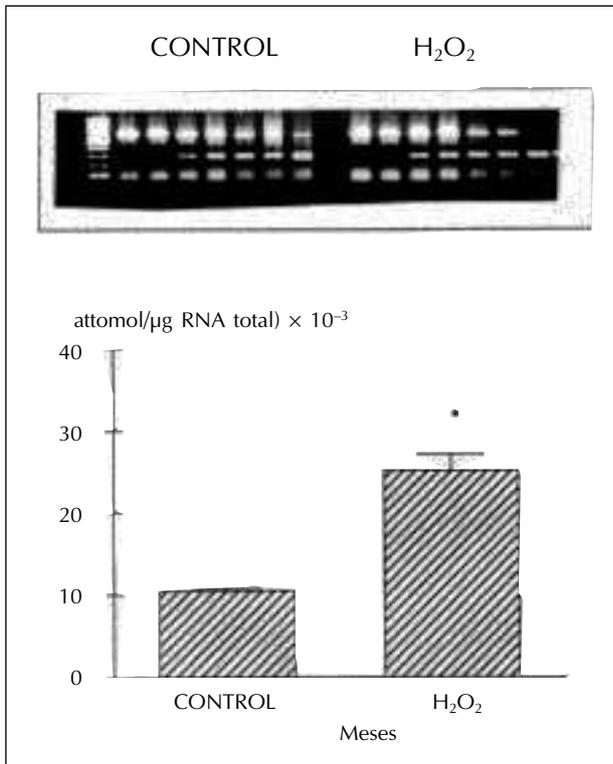


Fig. 4.—Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión del ARNm de TGF-β, mediante técnicas de RT-PCR cuantitativa. Datos expresados como media ± error estándar de 5 experimentos. **p* < 0,05 vs control.

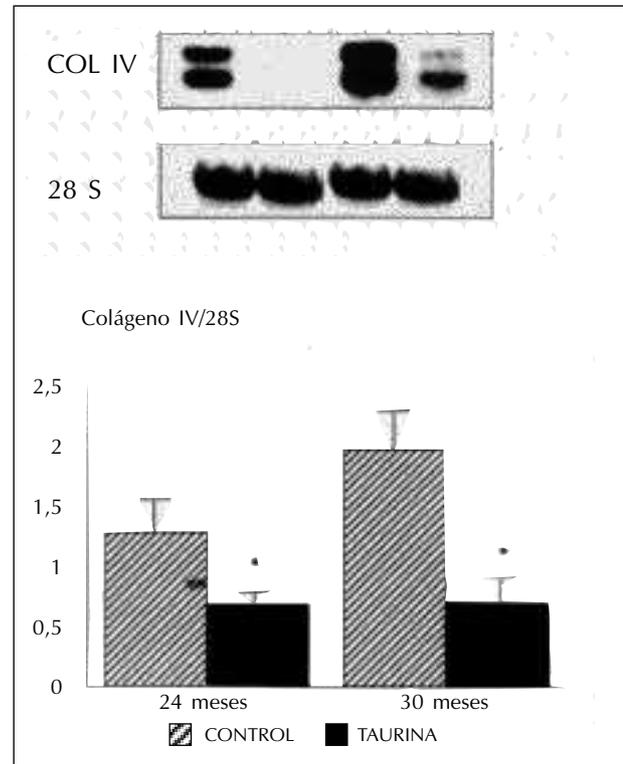


Fig. 5.—Efecto del tratamiento con taurina sobre la expresión de colágeno IV en ratas de 24 y 30 meses. Datos expresados como media ± error estándar de 5 animales por grupo. **p* < 0,05 vs su respectivo control.

las ratas de 18 meses. Este resultado refleja un mayor potencial oxidativo en los animales viejos. Este hecho sugiere que la producción de MADO en el glomérulo no es debida a células inflamatorias infiltradas, sino a las propias células mesangiales residentes y, lo que es más importante, cuando las modificaciones en la estructura y función glomerulares son secundarias a las influencias del medio interno, las diferencias detectadas en glomérulos desaparecen en los cultivos celulares y sólo se detectarían en el caso de que estas diferencias atendieran a determinantes genéticos relevantes.

El aumento en la producción de H₂O₂ se corresponde con un aumento en la expresión del gen de TGF-β, analizado en la corteza renal, mediante técnicas de RT-PCR, de los animales estudiados que es patente a partir de los 18 meses de edad. El TGF-β es, probablemente, el mediador que más influencia tiene en los procesos de síntesis y degradación de matriz extracelular. El TGF-β además de las funciones sintéticas de diversos componentes de matriz, inhibe los sistemas de degradación, a nivel de proteasas y sus inhibidores. Así, se sabe que aumenta la expresión del inhibidor de metaloproteinasas (TIMP)

a nivel transcripcional y disminuye la expresión y secreción de colagenasas y metaloproteinasas¹⁷.

El siguiente paso del trabajo fue analizar, en nuestros animales, si existía realmente una sobreexpresión de componentes de matriz extracelular asociada a la edad, para ello se realizó la determinación de la expresión del gen que codifica para el colágeno IV, el componente mayoritario de la matriz extracelular glomerular, observándose un aumento con significación estadística a partir de los 18 meses de edad, que llegó a ser de un 300% a los 30 meses respecto al grupo control, de 3 meses. Este hecho unido al aumento de otros componentes de matriz, no analizados aquí, es el causante principal, aunque quizá no el único, de los acontecimientos histológicos que suelen acompañar a los procesos escleróticos, tales como engrosamiento de la membrana basal glomerular, arterioesclerosis, fibrosis intersticial, etc.

Con lo anteriormente expuesto, parece claro que existe cierta asociación espacio-temporal entre dos fenómenos, en apariencia distintos: por un lado un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno en glomérulos y células mesangiales en cultivo

de los animales viejos respecto a los jóvenes y por otro el aumento, tanto en la expresión de TGF- β como en los componentes de matriz extracelular analizados en esos mismos animales. Con el fin de comprobar si existía una relación causa-efecto entre ambos eventos, se analizó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión génica de TGF- β en células mesangiales en cultivo, procedentes de ratas control de 3 meses. El resultado obtenido con estos experimentos fue realmente sorprendente, ya que, tras 24 horas de tratamiento, la expresión de TGF- β fue 2,5 veces superior a la encontrada en las células mantenidas en condiciones control. Este resultado sugiere que los MADO serían capaces de desencadenar por sí mismos situaciones que darían lugar a la aparición de esclerosis glomerular en ausencia de otros factores implicados tradicionalmente en esta alteración. La discusión de este resultado es complicada, dada la poca bibliografía existente al respecto. No existen prácticamente estudios que analicen directamente la capacidad de los MADO para modular la síntesis o degradación de proteínas de matriz, si bien sí se han realizado algunas aproximaciones que evalúan su capacidad para alterar la integridad de la estructura glomerular. De hecho, se ha demostrado que un aumento en la producción de MADO induce alteraciones funcionales en la membrana de filtración, aumentando la proteinuria¹⁸.

Finalmente, la última parte del estudio, aunque no por ello menos relevante, se encaminó a reforzar la hipótesis de trabajo, pues si ésta resultaba cierta, el tratamiento con un antioxidante exógeno debería mejorar los niveles de esclerosis glomerular asociada al envejecimiento, sin olvidar el beneficio terapéutico que pudiera derivarse de estos resultados. El antioxidante de elección fue la taurina, un β -aminoácido esencial que es un potente secuestrador de MADO. De igual forma, en un modelo de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina la administración de taurina mejoró sensiblemente la función renal de las ratas tratadas⁸. Nuestras ratas se trataron durante los tres meses previos al sacrificio con taurina al 2% en el agua de bebida. Al final del tratamiento se analizaron los valores de función renal y la expresión de los genes que codifican para el colágeno IV. Los resultados obtenidos demuestran una mejora de la función renal en las ratas tratadas, con una disminución significativa de la proteinuria tanto en las ratas de 24 como 30 meses, así como una marcada disminución del colágeno tipo IV, con relación a sus respectivos controles. La importancia de estos resultados es doble: por una parte, confirman la hipótesis inicial de que los MADO juegan un papel crucial en el desarrollo de las alteraciones que conducen a la esclerosis glomerular asociada al envejecimiento y, por otra supo-

ne un importante hallazgo terapéutico ya que su administración en personas ancianas podría mejorar y enlentecer el desarrollo de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con los proyectos SAF 98-0054 y FISS 95/0027. Iglesias de la Cruz MC es becaria predoctoral del Ministerio de Educación y Cultura.

BIBLIOGRAFIA

1. Goyal VK: Changes with age in the human kidney. *Exp Gerontol* 17: 321-31, 1982.
2. Lindeman R: Renal physiology and pathophysiology of aging. *Am J Kidney Dis* 16: 275-282, 1990.
3. Baylis C, Fredericks M, Leyboldt J. The mechanism of proteinuria in aging rats. *Med Aging Dev* 45: 111-126, 1985.
4. Pesce CM, Striker LJ, Peten EP, Elliot S, Striker GE: Glomerulosclerosis at both early and late stages in associated with increased cell turnover in the mice transgenic for growth hormone. *Lab Invest* 65: 601-605, 1991.
5. Anderson S, Brenner BM: Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 80: 435-442, 1986.
6. Border WA, Roushlati E: Transforming growth factor beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1-7, 1992.
7. Border WA, Noble NA, Yamamoto T: Natural inhibitor of transforming growth factor beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360: 361-364, 1992.
8. Trachman H, Futterwait S, Maesaka J, Baynes J: Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Am J Physiol* 269: F429-F438, 1995.
9. Boyce NW, Tipping PG, Holdsworth SR: Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerular glomerulonephritis. *Kidney Int* 35: 778-782, 1989.
10. Radeke HH, Meier B, Topley N, Floege J, Habermehl GG, Resch K: Interleukin I alpha and tumor necrosis factor alpha induced oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int* 37: 767-775, 1990.
11. Mitarai T: Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. *Am J Clin Pathol* 58: 135-139, 1972.
12. Díez Marqués ML, García Escribano C, Medina J, Boyano MC, Arilla E, Torrecilla G, Rodríguez Puyol D, Rodríguez Puyol M: Effects of somatostatin on cultured human mesangial cells. *Endocrinology* 135: 3444-3451, 1995.
13. Baud L, Pérez J, Ardaillou R: Dexamethasone and hydrogen peroxide production by mesangial cells during phagocytosis. *Am J Physiol* 250: F596-F604, 1986.
14. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
15. Qian S, Kondaieh P, Roberts AB, Sporn MB: cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor- β . *Nucleic Acid Res* 18: 3059, 1990.
16. Ruiz-Torres MP, Bosch RJ, O'Valle F y cols.: Aged related increased expression of TGF-beta1 in the rat kidney: relationship to morphologic changes. *J Am Soc Nephrol* 9: 782-791, 1998.
17. Tomooka B, Border WA, Marshall BC, Noble NA: Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 42: 1462-1469, 1992.
18. Dileepan KN, Sharma R, Stechschulte DJ, Savin V: Effect of superoxide exposure on albumin permeability of isolated rat glomeruli. *J Lab Clin Med* 121: 797-804, 1993.