



Papel del estrés oxidativo y nitrosativo en el daño vascular producido por inmunosupresores inhibidores de calcineurina

J. Navarro-Antolín y S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Instituto «Reina Sofía» de Investigaciones Nefrológicas.

El empleo clínico de los inhibidores de calcineurina, Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus, como inmunosupresores, ha supuesto un notable avance terapéutico no sólo en el campo del trasplante de órganos sino también en diversas entidades nosológicas con sustrato autoinmune. Aunque el uso de estos inmunosupresores se acompaña en un porcentaje significativo de casos de efectos secundarios importantes, entre los que se incluyen nefrotoxicidad, hipertensión y daño vascular, la patogenia de los mismos dista de ser bien conocida desde el punto de vista molecular. En nuestro laboratorio nos ha interesado profundizar en el posible papel de las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Intermediates, ROI) y nitrógeno (Reactive Nitrogen Intermediates, RNI) en el daño endotelial. Para ello hemos expuesto células endoteliales de aorta bovina (Bovine Aortic Endothelial Cells, BAEC) a CsA con el fin de identificar ROI y RNI generados específicamente tras el tratamiento con CsA. Para detectar los ROI/RNI se han utilizado ciertos compuestos fluorescentes y permeables, con una capacidad relativamente selectiva de oxidarse en presencia de anión superóxido (O_2^-) (dihidroetidina, DHE), peroxinitrito ($OONO^-$) (dihidro-rodamina, DHR), y óxido nítrico (NO^-) (diaminofluoresceína diacetato, DAF-2DA). La cuantificación de esta fluorescencia se realizó mediante citometría de flujo, utilizando los controles apropiados (donadores e inhibidores de la producción de cada especie). Estos estudios se complementaron con la técnica de resonancia paramagnética de spin electrónico (EPR) para determinar O_2^- , quimioluminiscencia de ozono para cuantificar NO e inmunocitoquímica para detectar nitrotirosina, una modificación postraduccional que puede ser promovida por el $OONO^-$. La CsA (10 μM) oxida la DHE (CsA: $194 \pm 11\%$ respecto del control, $p < 0,05$,

$n = 12$), en un proceso inhibible por un mimético lipofílico de la superóxido dismutasa, MnTMPyP (MnTMPyP + CsA: 79 ± 6 y MnTMPyP: $76 \pm 11\%$ del control, en presencia y ausencia de CsA respectivamente, $p < 0,001$, $n = 3$), y potencia la oxidación de esta sonda por 10 μM dimetilnaftoquinona (DMNQ), un generador intracelular de O_2^- (CsA: 194 ± 11 , DMNQ 249 ± 41 y CsA + DMNQ: $920 \pm 102\%$ respecto al control). Demostramos asimismo que la CsA estimula la producción temprana (no transcripcional) del NO intra y extracelular. En BAEC cargadas con la sonda DAF-2DA, 10 μM de CsA produjeron un aumento de $201 \pm 15\%$ con respecto al control, parcialmente inhibible por L-NAME, un antagonista competitivo de la óxido nítrico sintasa: (L-NAME + CsA vs L-NAME: 160 ± 10 vs $115 \pm 7\%$, $p < 0,05$, $n = 12$). Asimismo, pudimos observar un discreto aumento extracelular de NO^- mediante acumulación durante 2 horas de nitritos (CsA vs vehículo: $2,61 \pm 0,1$ vs $2,22 \pm 0,1 \mu mol/l$, $n = 11$, $p < 0,05$) en el sobrenadante de células endoteliales. La coincidencia en la doble producción, tras tratamiento con CsA, de ROI/RNI se corrobora con la oxidación de la sonda DHR ($221 \pm 12\%$ respecto al control, $p < 0,01$), que es consistente con la formación endotelial de peroxinitrito en la monocapa de células endoteliales tratadas con CsA. En estudios con inmunocitoquímica, en BAEC tratadas con CsA, ésta formación de peroxinitrito se corresponde con un aumento de nitrotirosilación de proteínas, inhibible por antioxidantes. También el Tacrolimus tiene un considerable poder oxidante, detectado por la oxidación de DHR. En conclusión, los inmunosupresores inhibidores de calcineurina tienen capacidad de producir daño endotelial por nitrotirosilación de proteínas, reacción mediada por la generación de especies altamente oxidantes como el peroxinitrito.