

Radicales libres y daño glomerular

D. Rodríguez Puyol*, J. Lucio, P. Ruiz, S. López Ongil, M. C. Iglesias, J. A. Ruiz Ginés, G. Torrecilla y M. Rodríguez Puyol

Departamento de Medicina y Fisiología y *Sección de Nefrología. Hospital Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá de Henares.

PRESENTACION

Hace aproximadamente un año, en esta misma revista, se publicaba un artículo con un título similar al presente¹. Se trataba de la actualización de un problema, el papel de los radicales libres en la fisiopatología renal, desde el punto de vista de un grupo que trabaja activamente en este campo. Al plantearse, doce meses después, reescribir una continuación del artículo anterior, se ha pretendido mantener, en líneas generales, las líneas maestras del primero, considerando además que gran parte de la revisión bibliográfica sobre el tema estaba incluida en aquél. Por este motivo no se va a intentar revisar exhaustivamente de nuevo las relaciones entre radicales libres y riñón, sino que se van a plasmar, debidamente sustentadas, las conclusiones más importantes de nuestro grupo de trabajo, incluyendo además, y fundamentalmente, resultados y planteamientos adquiridos experimentalmente en un pasado muy próximo.

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA FISIOPATOLOGIA RENAL

Una revisión exhaustiva del concepto de radicales libres está fuera de los objetivos del presente artículo, máxime cuando ya se analizó el problema previamente¹. No obstante, la tabla I incluye una breve relación de los metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO) más importantes, así como de los sistemas antioxidantes de mayor relevancia. En la reducción incompleta del oxígeno molecular a agua se producen una serie de MADO, algunos de los cuales como el anión superóxido y el ión hidroxilo son verdaderos radicales libres, es decir moléculas con electrones desapareados en alguno de sus orbitales, mientras que otros, incluyendo el peróxido de hidró-

geno, no tiene esta propiedad; todos ellos, no obstante, son altamente reactivos. Una serie de antioxidantes, endógenos o exógenos, mantienen el sistema bajo control, pero cualquier desequilibrio en el mismo puede condicionar alteraciones funcionales y estructurales a distintos niveles.

En el campo concreto de la fisiopatología renal se ha propuesto que los MADO pueden jugar un papel relevante en determinadas patologías. Entre éstas destacan el fracaso renal agudo, postisquémico o inducido por fármacos, determinadas formas de glomerulonefritis, las alteraciones asociadas al trasplante e incluso el deterioro funcional secundario a la ablación de masa renal²⁻⁷. La mayor parte de los estudios realizados en este sentido se han basado en la medición, directa o indirecta, de la producción de MADO en estos contextos patológicos, así como en la protección de la función renal en modelos experimentales mediante el uso de antioxidantes.

Con el fin de analizar la importancia de los MADO en las alteraciones del filtrado glomerular asociadas al fracaso renal agudo, nuestro grupo se planteó, hace algunos años, analizar el efecto directo de los MADO en el grado de contracción-relajación de las células mesangiales en cultivo. En el momento actual se considera que las células mesangiales, probablemente en conjunción con otras células residentes glomerulares, son fundamentales en la regulación

Tabla I. Metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO) y sistemas antioxidantes (AO) más importantes

MADO	AO endógenos	AO exógenos
Anión superóxido ¹	Superóxido dismutasa	Tocoferoles
Peróxido hidrógeno ²	Catalasa	Carotenos
Radical hidroxilo ³	Glutación ⁶	Vitamina C
Oxígeno singlete ⁴	Glutación peroxidasa	Selenio ⁷
Acido hipocloroso ⁵		

¹ O₂⁻. ² H₂O₂. ³ OH⁻. ⁴ ¹O₂. ⁵ HOCl, en suspensión, hipoclorito. ⁶ El sistema del glutación, como antioxidante, está constituido por el glutación reducido y por la actividad de la enzima glutación reductasa, encargada de reducir sistemáticamente el glutación oxidado. ⁷ El selenio se considera un antioxidante exógeno, actuando como cofactor de la enzima glutación peroxidasa.

Correspondencia: D. Rodríguez Puyol.
Sección de Nefrología.
Hospital Príncipe de Asturias.
Campus Universitario.
Alcalá de Henares.
28805 Madrid.

del coeficiente de ultrafiltración, uno de los principales determinantes del filtrado glomerular⁸⁻¹⁰. Los metabolitos bioactivos capaces de contraer estas células parecen reducir la filtración glomerular, mientras que los que las relajan ejercen un efecto opuesto sobre este aspecto de la función renal. Pues bien, el peróxido de hidrógeno, de forma directa, contrae las células mesangiales en cultivo de rata por un mecanismo que parece depender de la liberación secundaria del factor activador de las plaquetas (PAF), con un aumento subsiguiente del calcio intracelular¹¹. En consecuencia, se puede afirmar que, en aquellas situaciones patológicas caracterizadas por un deterioro brusco de la filtración glomerular y una producción excesiva de MADO, estos metabolitos pueden condicionar, al menos parcialmente, los cambios funcionales observados.

Existen amplias evidencias experimentales que sustentan la importancia de los MADO en la fisiopatología de las glomerulonefritis⁴⁻⁶. Con el fin de analizar directamente la capacidad de estos metabolitos para modular la tasa de proliferación de las células residentes glomerulares se estudió la respuesta de las células mesangiales de rata en cultivo al estímulo directo con peróxido de hidrógeno. Se observó una mayor incorporación de timidina tritiada, así como un mayor número de células tras el estímulo oxidante, efecto que parecía depender de la translocación de calcio desde el espacio extracelular al interior de las células, ya que era bloqueado por verapamilo¹². Igualmente, se observó que las células mesangiales incubadas con peróxido de hidrógeno mostraban un aumento de fosforilación en los residuos tirosina de determinadas proteínas¹³, mecanismo celular que parece fundamental en la transmisión citoplasmática de señales mitóticas¹⁴. Junto a estos efectos promitóticos, los MADO son capaces de estimular la síntesis, en las células residentes glomerulares, de múltiples metabolitos bioactivos, como ciertos derivados de los ácidos grasos de membrana. Son ya clásicos los estudios que demostraron la capacidad de los radicales libres para modular la producción de derivados del ácido araquidónico¹⁵, y estudios de nuestro grupo han puesto también en evidencia que esto también ocurre con el factor activador de las plaquetas¹⁶. Estos lípidos bioactivos, aparte de modificar el grado de contracción-relajación de las propias células que los sintetizan^{8, 17}, pueden actuar en estructuras vecinas, como las arteriolas aferente y eferente o incluso los túbulos renales, modificando así determinantes fundamentales de la filtración glomerular o de la propia función tubular, lo que condicionaría finalmente la aparición de las alteraciones funcionales que caracterizan estos procesos.

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA GLOMERULOSCLEROSIS ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO

En los tres últimos años, nuestro grupo ha intentado analizar otras campos de la fisiopatología renal, en concreto la glomerulosclerosis asociada al envejecimiento. Es un hecho bien conocido que, a partir aproximadamente de la quinta década de la vida, la filtración glomerular disminuye progresivamente, siendo el sustrato anatomopatológico subyacente a estas alteraciones el desarrollo de una esclerosis glomerular progresiva. Los mecanismos responsables del desarrollo de este proceso son totalmente desconocidos, pero no sería extraño que, al menos en parte, fueran comunes a otras formas de glomerulosclerosis. Si bien existen amplias referencias en la literatura a múltiples mediadores bioactivos responsables de la esclerosis glomerular, con un énfasis especial en los factores de crecimiento¹⁸⁻²⁰, la importancia prestada a los MADO en este campo ha sido muy escasa. No obstante, en un modelo de nefrectomía subtotal 5/6 se ha demostrado que el tratamiento con fármacos antioxidantes previene el desarrollo de la esclerosis glomerular progresiva⁷. Esto, junto al hecho de que, en otros órganos y tejidos, los radicales libres sí parecen jugar un papel fundamental en las alteraciones estructurales características del envejecimiento, determinó el planteamiento experimental cuyos resultados más importantes se exponen a continuación.

Las ratas Fischer 344 muestran, en el período comprendido entre los tres y los dieciocho meses, un deterioro progresivo de la filtración glomerular, con aumento de las concentraciones plasmáticas de creatinina y de la excreción urinaria de proteínas, sin modificaciones en el colesterol. A nivel estructural no se detecta, en los animales de dieciocho meses, una esclerosis glomerular evidente, si bien el contenido en proteína glomerular aumenta de forma muy significativa (tres meses: 39 ± 7 $\mu\text{g}/\text{glomérulo}$. Dieciocho meses: 117 ± 15 $\mu\text{g}/\text{glomérulo}$), sin variaciones en la celularidad glomerular. Estos datos son totalmente compatibles con la presencia de una esclerosis glomerular en fases tempranas, ya que las proteínas de matriz aumentan sin que exista todavía, con las técnicas histológicas estándar, un daño morfológico. Pues bien, incluso en estas fases tan tempranas de glomerulosclerosis es posible objetivar una producción incrementada de MADO en glomérulos aislados (fig. 1, panel superior) y células mesangiales en cultivo (fig. 1, panel inferior) de ratas Fischer 344.

Cuando en estos mismos animales se evaluó la actividad antioxidante en glomérulos y en células, se observó un incremento en la actividad catalasa, así como en el contenido de glutatión reducido, sin

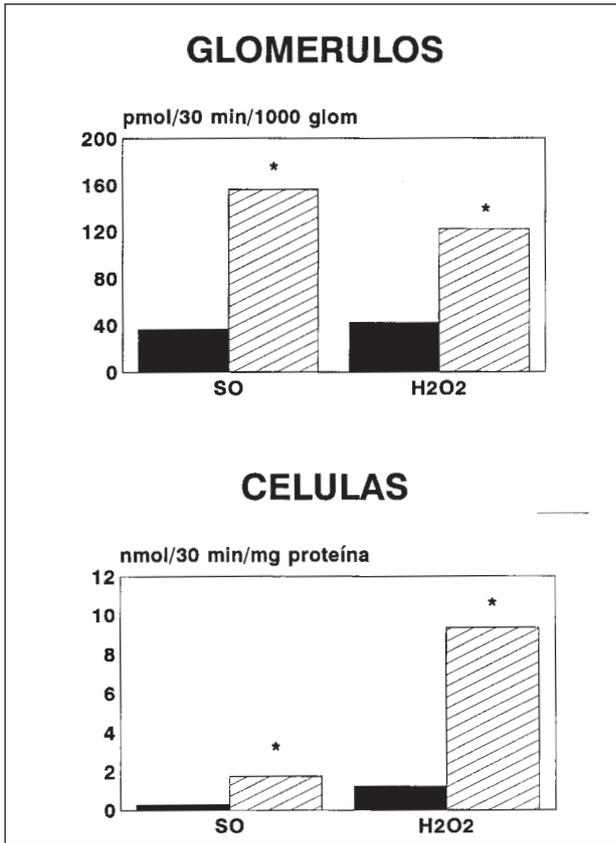


Fig. 1.—Producción de metabolitos activos derivados del oxígeno en glomérulos aislados y células en cultivo de ratas Fischer 344. Los resultados muestran la media \pm eem de 12 animales (glomérulos) o 6 cajas de cultivo (células). Las barras negras representan los valores de las ratas de 3 meses, mientras que las rayadas son las correspondientes a los animales de 18 meses. SO: anión superóxido. H₂O₂: peróxido de hidrógeno. * $p < 0,05$ vs 3 meses.

cambios en la actividad superóxido dismutasa total y glutatión peroxidasa. Aunque estos resultados puedan parecer sorprendentes, existen evidencias en la literatura que demuestran una superinducción de enzimas antioxidantes en condiciones de estrés oxidativo^{21, 22}, lo que podría explicar nuestros resultados. Además, el contenido en malonil dialdehído glomerular, un índice global de oxidación, directamente proporcional al nivel de producción de MADO e inversamente proporcional al estado de antioxidación tisular, aumentó significativamente en las ratas de 18 meses (3 meses: 158 ± 22 fmol/glomérulo. Dieciocho meses: 633 ± 116 fmol/glomérulo), lo que demuestra claramente que el aumento de actividad antioxidante es la consecuencia del exceso de oxidación, en un intento de restaurar parcialmente la homeostasis celular.

Un aspecto muy importante de estos resultados es el hallazgo de una producción incrementada de MADO por las células procedentes de animales viejos.

El cultivo celular es un sistema en el que las condiciones externas a las células son sistemáticamente homogéneas, haciendo desaparecer así las posibles influencias del medio externo. En este contexto, las posibles diferencias observadas en la biología de las células son necesariamente la consecuencia de modificaciones fenotípicas. Así pues, se puede afirmar que el aumento en la síntesis de MADO característico del envejecimiento es la consecuencia no sólo de ciertas agresiones ambientales, sino que también depende de factores genéticos. Se podría, pues, hablar de una programación celular que, a través de la síntesis de determinados metabolitos bioactivos, sería la responsable de algunos de los cambios funcionales y estructurales asociados al envejecimiento.

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS FENOMENOS DE ISQUEMIA REPERFUSION

La fisiopatología de las alteraciones tisulares asociadas a los fenómenos de isquemia-reperfusión ha recibido una atención especial en los últimos años²³. Sin intentar revisar exhaustivamente el problema, hay que decir que, entre los muchos fenómenos que tienen lugar al reperfundir un órgano isquémico, uno de los más característicos es la producción de una extravasación de fluido hacia el espacio intersticial y, al parecer, los MADO parecen jugar un papel relevante como mediadores de las alteraciones tisulares.

La regulación de la distribución de fluidos entre el espacio intravascular y el intersticial ha sido atribuida, en general, al equilibrio entre las presiones hidrostáticas y osmóticas tanto capilares como intersticiales²⁴. No obstante, recientes evidencias experimentales²⁵ sugieren que el endotelio podría participar de forma activa en los fenómenos de formación de edema, al menos en circunstancias fisiopatológicas; de hecho, la contracción endotelial, favoreciendo la extravasación de fluido, jugaría un papel relevante en el edema local producido por la inyección de histamina²⁵.

Por este motivo, nuestro grupo elaboró la siguiente hipótesis de trabajo: los MADO, liberados en cantidades masivas tras la reperfusión de los órganos isquémicos, podrían inducir una marcada contracción de las células endoteliales a nivel de la microcirculación, favoreciendo así la extravasación de líquido desde el compartimiento intravascular a los tejidos, condicionando la aparición de edema.

Pues bien, cuando se analizó la capacidad de los MADO para contraer las células endoteliales en cultivo de aorta bovina, se observó, tanto por criterios morfológicos (reducción del área celular) como bioquímicos (fosforilación de la cadena ligera de la miosina), que las células se contraían significativamente en pre-

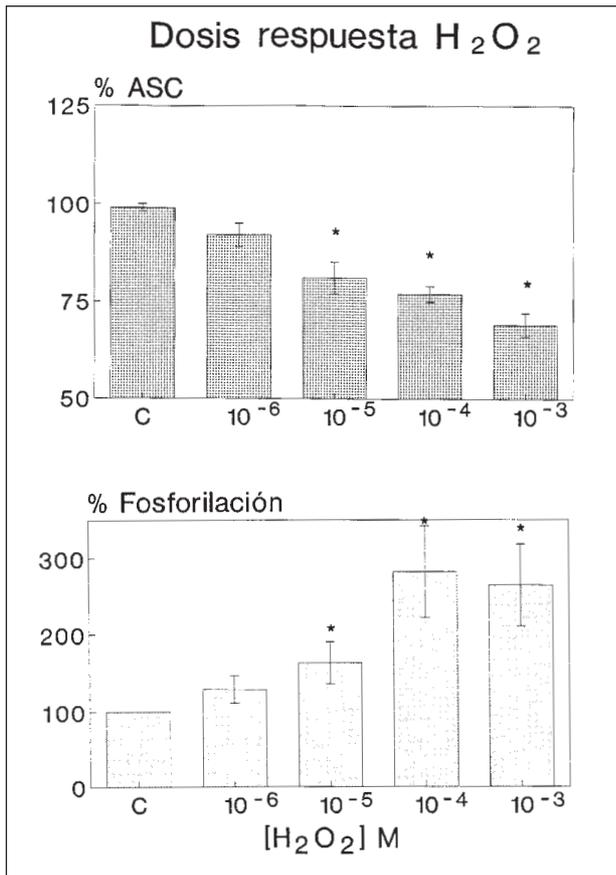


Fig. 2.—Modificaciones en el grado de contracción relajación de células endoteliales de aorta bovina en presencia de peróxido de hidrógeno. Los resultados que se muestran son la media \pm eem de 5 experimentos diferentes en el caso del análisis del área celular (panel superior) y de tres experimentos a la hora de evaluar la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM-P) (panel inferior). Se utilizaron concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 1 μ M y 1 mM durante 30 min., sin evidenciarse en ningún momento toxicidad celular. $p < 0,05$ vs C.

sencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (fig. 2). Sorprendentemente, este efecto era independiente de calcio, ya que no desaparecía al realizar los experimentos en un medio sin calcio que contenía además altas concentraciones de verapamilo y TMB-8, bloqueantes farmacológicos de la entrada de calcio al interior de la célula y de la traslocación del mismo desde las organelas al citoplasma, respectivamente, y dependiente de proteína quinasa C (PKC), siendo inhibido completamente por bloqueantes de esta quinasa. Se trataría, pues, de una contracción calcio-independiente, PKC-dependiente, fenómeno que no ha sido descrito previamente en ninguna estructura celular y que está siendo analizado en detalle.

En consecuencia, estos resultados en células endoteliales proponen nuevos mecanismos en la génesis del edema local asociado a los fenómenos de reper-

fusión tisular, si bien habrá que realizar estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

LOS RADICALES LIBRES COMO SEGUNDOS MENSAJEROS CELULARES

A lo largo de la presente exposición se han hecho continuas referencias a los MADO como metabolitos bioactivos, pero escasas como mediadores de toxicidad celular. Ello no quiere decir que, a altas concentraciones, estos derivados del oxígeno molecular no tengan propiedades tóxicas a nivel celular. Sin embargo, en los últimos años, y en parte los resultados de nuestro grupo han contribuido a ello, se los considera cada vez más, sobre todo a bajas concentraciones, como reguladores fisiológicos a distintos niveles.

En este sentido tienen especial importancia los efectos descritos recientemente en el campo de la proliferación celular. Tras demostrar que el peróxido de hidrógeno puede ser un regulador positivo de la proliferación celular¹², recientes estudios han puesto en evidencia que este efecto parece depender de la fosforilación en residuos tirosina de ciertas proteínas intracelulares, de forma similar al mecanismo de acción descrito para determinados factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)²⁶. Pero, y esto es conceptualmente mucho más importante, estos mismos autores demuestran que el propio efecto del PDGF desaparece al aumentar de forma masiva las concentraciones intracelulares de catalasa, es decir, al eliminar completamente el peróxido de hidrógeno intracelular²⁶. Dicho en otras palabras, el efecto de un factor de crecimiento tan conocido como el PDGF depende totalmente de la síntesis intracelular de peróxido de hidrógeno, por lo que se puede afirmar que, al igual que el AMP cíclico o el calcio, el peróxido de hidrógeno puede actuar como segundo mensajero intracelular en el proceso de la proliferación celular. Esto no debe sorprender, si se tiene en cuenta que existe un consenso bastante unánime en la literatura acerca de la capacidad del peróxido de hidrógeno para activar ciertos factores de transcripción nuclear, en particular el NF κ B²⁷.

En este sentido, nuestro grupo está trabajando activamente en el análisis del papel de los MADO, concretamente el peróxido de hidrógeno, en la contracción celular. La contracción celular dependiente de angiotensina II es, aparentemente, un proceso bien definido. Tras la interacción del péptido con un receptor de membrana se desencadenan una serie de reacciones celulares, mediadas fundamentalmente por calcio y por PKC, que son las responsables de la contracción inicial de las células, así como del mantenimiento de la citada contracción. Para nuestra sorpresa, esta contracción desaparece en presencia de

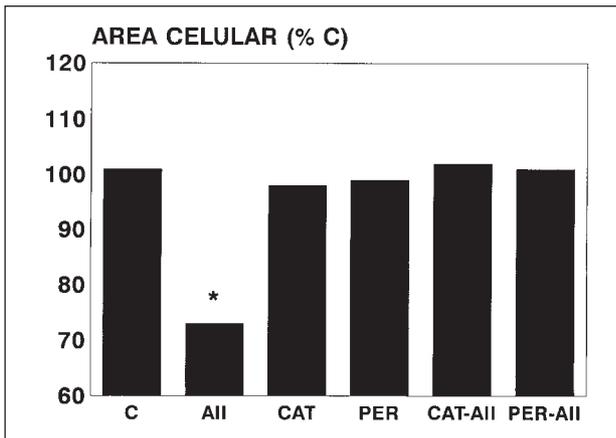


Fig. 3.—Efecto de la adición de enzimas antioxidantes (CAT: catalasa, 20 µg/ml. PER: peroxidasa de rábano, 200 µg/ml) en la contracción de células mesangiales incubadas con angiotensina II 10 nM (AII) durante 30 min. Los valores son la media ± eem de 5 experimentos diferentes. C: células control. * p < 0,05 vs C, CAT, PER, CAT + AII y PER + AII.

catalasa y de cualquier otro quelante de peróxido de hidrógeno como la peroxidasa de rábano (fig. 3). Tras analizar cuidadosamente el fenómeno se ha llegado a la conclusión de que la liberación de peróxido de hidrógeno es fundamental para que los fenómenos perimembranarios asociados a la contracción celular tengan lugar. Estamos de nuevo ante la demostración de un fenómeno que sugiere que los MADO juegan un papel fundamental como reguladores de fenómenos biológicos básicos, mucho más allá de los efectos tóxicos inicialmente descritos.

COMENTARIOS FINALES

Se ha intentado, a lo largo de esta exposición, actualizar al máximo los conceptos fundamentales referentes a los MADO desde un punto de vista fisiopatológico. Obviando la descripción de su bien descrita toxicidad, se han revisado otros posibles papeles reguladores, cuya trascendencia se va conociendo progresivamente. No siempre se han hecho consideraciones exclusivamente glomerulares, ya que hemos preferido mostrar aspectos muy actuales, pendientes muchos de ellos de contrastes experimentales adicionales. En cualquier caso, se ha intentado plasmar nuevas alternativas de pensamiento en un campo tan complejo y de reciente adquisición como el de los MADO.

Agradecimiento

Este trabajo, así como parte de los resultados en él incluidos, han sido financiados por la CICYT (SAF 93/0713) y por el FIS (FIS 95/0027).

Bibliografía

- Rodríguez-Puyol D, Duque I, Arribas I, Pérez de Lema G, López Ongil S y Rodríguez-Puyol M: Papel de los radicales libres en la fisiopatología renal. *Nefrología XV* (S 1):49-54, 1995.
- Rehan A, Johnson KJ, Kunkel RC, Wiggins RC y Ward PS: Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotic nephritis. *Lab Invest* 51:396-403, 1984.
- Johnson KJ y Weinberg JM: Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 2:625-635, 1993.
- Boyce NW, Tipping PG y Holdsworth SR: Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerular glomerulonephritis. *Kidney Int* 35:778-782, 1989.
- Rahman M, Emancipator S y Sedor J: Hydroxyl radical scavenger ameliorate proteinuria in immune complex glomerulonephritis. *JLab Clin Med* 112:619-626, 1988.
- Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ, Michael Jy, Adu D: The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 73:329-332, 1987.
- Modi KS, Schreiner GF, Purkerson M y Klahr S: Effects of probucol in renal function and structure in rats with subtotal kidney ablation. *JLab Clin Med* 120:310-317, 1992.
- Scharschmidt LA, Douglas JG y Dunn MJ: Angiotensin II and eicosanoids in the control of glomerular size in the rat and human. *Am JPhysiol* 250:F348-F356, 1986.
- Méné P, Smonson MS y Dunn MJ: Physiology of mesangial cells. *Physiol Rev* 69:1347-1424, 1989.
- Lamas S, López Novoa JM y Rodríguez Puyol D: Estudios en células mesangiales en cultivo: aportaciones a la fisiología y fisiopatología renales. *Nefrología* 9:229-232, 1989.
- Duque I, García-Escribano C, Rodríguez Puyol M, Díez-Marqués ML, López-Novoa JM, Arribas I, Hernando L y Rodríguez Puyol D: Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 263:F466-F473, 1992.
- Duque I, Rodríguez Puyol M, Ruiz Torres MP, González Rubio M, Díez-Marqués ML y Rodríguez Puyol D: Calcium channel blockers inhibit hydrogen peroxide-induced proliferation of cultured rat mesangial cells. *JPharmacol Exp Therap* 267:612-616, 1993.
- González-Rubio M, Voit S, Rodríguez Puyol D y Marx M: Oxidizing conditions induce tyrosine phosphorylation of PDGF α and β receptors and pp60^{c-src} in mesangial cells. *JAm Soc Nephrol* 5:724 (A), 1994.
- Ullrich A y Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosin kinase activity. *Cell* 61:203-212, 1990.
- Baud L, Nivez MP, Chansel D y Ardaillou R: Stimulation by oxygen radicals of prostaglandin production by rat renal glomeruli. *Kidney Int* 20:332-339, 1981.
- Arribas I, Duque I, Pérez de Lema G, Díez-Marqués ML, Lucio J, Rodríguez Puyol M y Rodríguez Puyol D: A possible role for platelet-activating factor in the hydrogen peroxide-induced TxB₂ and PGE₂ glomerular synthesis. *JLipid Res* 36:260-265, 1995.
- De Arriba G, Barrio V, Hernando L, López Novoa JM y Rodríguez Puyol D: Changes in glomerular cross sectional area induced by platelet activating factor. *Nephrol Dial Transplant* 2:224-227, 1987.
- Isaka Y, Fuhiiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T e Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *JClin Invest* 92:2597-2601, 1993.
- Borsi L, Castellani P, Fisso AM, Leprini A y Zardi L: Transforming growth factor-β regulates de splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Letters* 261:175-178, 1990.

D. RODRIGUEZ PUJOL y cols.

20. Roberts AB, Heine UI, Flanders KC y Sporn MB: Transforming growth factor- β : major role in regulation of extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci* 580:225-232, 1990.
21. Ichikawa I, Kiyama S y Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9, 1994.
22. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarret T, Greene HL, Burr IM e Ichikawa I: Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 38:282-288, 1990.
23. Granger DN y Korthuis RJ: Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 57:311-332, 1995.
24. Haddy FJ, Scott JB y Granger GJ: Fluid transfer across the microvascular membrane. *Int J Physiol* 9:63-72, 1976.
25. Moy AB, Shasby SS, Scott BD y Shasby DM: The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest* 92:1198-1206, 1993.
26. Sundaresan M, Yu Z, Ferrans VJ, Irani K y Finkel T: Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299, 1995.
27. Schrek R, Rieber P y Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258, 1991.