

Efectos del N^G-nitro-L-arginina metil éster en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas

L. Rivas-Cabañero, J. M. Valdivielso, M. Criado-Jiménez, M. Arévalo* y J. M. López-Novoa

Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas, Departamento de Fisiología y Farmacología, y *Departamento de Histología, Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

RESUMEN

El presente estudio se diseñó para estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre el fracaso renal inducido por gentamicina en ratas. Para ello se trataron 18 ratas Wistar con 100 mg/kg peso corporal/día de gentamicina durante cinco días; otras 18 ratas se utilizaron como control. La mitad de las ratas tratadas con gentamicina y la mitad de las ratas control recibieron el inhibidor específico de la síntesis de óxido nítrico, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 0,05 mg/ml en el agua de bebida durante cinco días. La presión arterial media, así como la función renal, se midieron durante todos los días del estudio. La presión arterial media fue significativamente más alta en los animales que bebieron L-NAME que en los que no lo bebieron; esto sugiere que el tratamiento por vía oral con esta dosis de L-NAME fue efectivo para inhibir la síntesis de óxido nítrico. Las ratas que recibieron L-NAME y gentamicina mostraron mayores niveles de creatinina en plasma y de daño morfológico, así como menor excreción urinaria de Na⁺ y K⁺ y menor aclaramiento de creatinina, que las ratas que sólo recibieron gentamicina.

Estos datos muestran que la inhibición del NO agrava el daño inducido por gentamicina, y esto sugiere que la síntesis endógena de NO podría tener un papel protector en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina.

Palabras clave: **Renal. Glomérulo. Óxido nítrico. Gentamicina.**

EFFECTS OF N^G-NITRO-L-ARGININE-ESTHER IN GENTAMICIN INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

SUMMARY

The aim of this study was to assess the role of nitric oxide synthesis inhibition on gentamicin-induced acute renal failure. Eighteen Wistar rats were given subcu-

Recibido: 26-X-94.
En versión definitiva: 27-II-95.
Aceptado: 28-II-95.

Correspondencia: Prof. J. M. López-Novoa.
Departamento de Fisiología y Farmacología.
Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca.
Avenida Campo Charro, s/n.
37007 Salamanca, (España).

taneously 100 mg/Kg body weight/day of gentamicin sulphate for five days. Other eighteen animals were used as control. Half of gentamicin-treated rats and half of the control ones were also given a specific nitric oxide synthesis inhibitor. N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 0.05 mg/ml/day in the drinking water, for five days. Mean arterial pressure and renal function were measured every day of the study. Mean arterial pressure was significantly higher in L-NAME treated than in non treated animals, suggesting that oral treatment with this dose of L-NAME was effective to inhibit nitric oxide synthesis. Rats receiving L-NAME together with gentamicin showed higher levels of plasma creatinine and morfological damage, less urinary excretion of Na⁺ and K⁺ and lower creatinine clearance than rats receiving gentamicine alone.

These data show that nitric oxide synthesis inhibition agravates gentamicin induced injury, and suggest that endogenous nitric oxide synthesis could have a protective role in gentamicin-induced nephrotoxicity.

Key words: **Renal. Glomerulus. Nitric oxide. Gentamicin**

Introducción

El uso de antibióticos aminoglicósidos se ve complicado por la nefrotoxicidad de los mismos en el 10-20 % de los tratamientos, a pesar de la rigurosa monitorización de las concentraciones circulantes del fármaco. La nefrotoxicidad inducida por gentamicina se caracteriza por necrosis tubular, sin cambios morfológicos en las estructuras glomerulares¹. Aunque la nefrotoxicidad inducida por la gentamicina es eminentemente tubular, y la necrosis celular está confinada al segmento de la nefrona en el que se absorbe², los tratamientos crónicos con gentamicina inducen descensos en el filtrado glomerular (FGR)³ incluso sin que existan evidencias de daño tubular⁴. Schor y cols. (1981)³ han visto que los descensos observados en el FGR inducidos por la gentamicina se deben a marcados descensos en el coeficiente de ultrafiltración (Kf). La gentamicina induce contracción y proliferación de las células mesangiales. Estas células son determinantes fundamentales de la filtración glomerular y su contracción contribuye al descenso observado en el Kf (Rodríguez-Barbero y cols., en prensa).

Diversos estudios^{5,6} apoyan la teoría de que la gentamicina (sustancia hidrosoluble y fuertemente catiónica por sus grupos amino) se une a fosfatidilinosítoles aniónicos, especialmente fosfatidilinositol-4-5'-bifosfato (PIP), no uniéndose prácticamente a componentes aniónicos de naturaleza no lipídica^{7,8}. Esto ha llevado a la hipótesis de que los fosfolípidos aniónicos funcionan como receptores de membrana para el fármaco^{7,9,10}. La gentamicina entra por endocitosis al interior celular y se procesa en los lisosomas. Una vez dentro de la célula permanece en un «pool» con pobre intercambio, dando como resulta-

do una elevada vida media tisular. La gentamicina inhibe el metabolismo de los fosfolípidos, alterando la función mitocondrial y generando radicales libres de oxígeno, capaces de alterar numerosos procesos celulares. La suma de estos acontecimientos conduce al desarrollo de la toxicidad celular. La unión de la gentamicina con fosfolípidos aniónicos produce una inhibición de fosfolipasa A₂, reduciendo la síntesis de prostaglandinas¹¹. También modifica las propiedades biofísicas de los lisosomas, alterando la permeabilidad y estimulando la agregación de membranas¹². La alteración de las membranas ocasiona la liberación de las enzimas lisosomales², produciéndose fosfolipidosis y disfunción mitocondrial¹³, generándose necrosis tubular.

El óxido nítrico (NO) se forma a partir del átomo de nitrógeno del grupo guanidino terminal de la L-arginina en una reacción catalizada por la NO sintasa(s). Esta reacción puede inhibirse en presencia de análogos de la L-arginina¹⁴. Recientemente se ha demostrado que el NO juega un importante papel en la regulación local del flujo sanguíneo renal (FSR) de la rata y puede influenciar la dinámica intraglomerular¹⁵. El papel del NO en la función renal se ha estudiado mediante la inhibición de su síntesis o mediante su estimulación. En los estudios realizados, inhibiendo su síntesis, se ha observado que la administración de bajas dosis de L-NAME no modifica los niveles basales de FSR ni del FGR. Del mismo modo, la administración intrarrenal de un inhibidor de síntesis de NO distinto, el L-NMMA, no modifica la hemodinámica renal de forma importante^{16,17}. Sin embargo, no se puede concluir que el L-NAME no tiene efecto sobre el tono basal renal, ya que hay evidencias que muestran que el efecto de la inhibición del NO sobre la hemodinámica renal y sobre la natriure-

sis está ampliamente determinado por la dosis de antagonista y por la duración de la infusión¹⁷. Consideraciones similares pueden hacerse con respecto a la autorregulación del FSR y el FGR, ya que la inhibición de síntesis de NO no produce ningún efecto sobre ellos.

Basándonos en todo esto, el objetivo del presente trabajo fue comprobar el papel de la alteración de la síntesis de NO en la insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina.

Materiales y métodos

Se utilizaron 36 ratas Wistar hembras de 250 gramos, dividiéndose en cuatro grupos:

— Grupo control (n = 9): Estas ratas recibían diariamente 0,5 ml de solución salina isotónica por vía subcutánea (sc) durante cinco días.

— Grupo control + L-NAME (n = 9): Ratas que recibían diariamente 0,5 ml de solución salina isotónica sc durante cinco días, y tratadas con 0,05 mg/ml de L-NAME en el agua de bebida.

— Grupo genta (n = 9): Ratas tratadas con 100 mg/kg de sulfato de gentamicina en bolo de 0,5 ml sc durante cinco días.

— Grupo genta + L-NAME (n = 9): Ratas tratadas con 100 mg/kg de sulfato de gentamicina en bolo de 0,5 ml sc y con 0,05 mg/ml de L-NAME en el agua de bebida.

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas durante el tratamiento. Durante los días que duró el tratamiento se recogió orina a 4° C, libre de comida y heces en probetas graduadas que contenían aceite mineral (para evitar la evaporación) y azida sódica al 0,1 % (para minimizar la contaminación bacteriana). La presión arterial (PAM) se midió en la cola por un método esfigmomanométrico no invasivo (electroesfigmomanómetro, LETICA LE 5000, Leticia Barcelona, España) en animales con movimiento restringido.

El último día de tratamiento las ratas se anestesiaron con éter y tras una laparotomía media se canuló la arteria aorta a la altura de la bifurcación ilíaca. Se perfundió suero salino a 4° C para lavar los riñones de células sanguíneas, y tras decapsularlos y desmularlos se obtuvieron los glomérulos por un método mecánico¹⁸. Tanto este como todos los pasos subsiguientes requieren el uso de material apirógeno, así como precauciones especiales para minimizar la contaminación bacteriana, por lo que se realizaron en condiciones estériles.

Los glomérulos se contaron y, tras corregir por la viabilidad (exclusión con azul Trypan), se sembraron en placas de 6 × 4 pocillos, en una concentración de 7.000 glomérulos/pocillo en 1,5 ml de me-

dio de cultivo. El medio utilizado fue RPMI 1640 con rojo fenol (Gibco), libre de endotoxinas y suplementado con 10 % de suero de ternera fetal, insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), selenio (5 ng/ml), glutamina (2 mM), penicilina (10,66 µ/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y anfotericina B. Para evitar variaciones en el número de glomérulos entre los pocillos se utilizó en todos los casos la misma pipeta automática y se mantuvo en agitación constante el tubo que contenía los glomérulos mientras se sembraban todos los pocillos. Algunos de los pocillos se usaron como controles y a otros se les añadió L-arginina 10⁻³ M o L-NAME 10⁻⁴ M como concentración final.

Tras veinticuatro horas de incubación (y tras valorar nuevamente la viabilidad glomerular, que fue siempre superior al 90 %) se determinó la producción de NO por medida de la cantidad de nitritos en el sobrenadante, utilizando un método indirecto, cuantitativo y colorimétrico basado en la reacción de Griess¹⁹, convenientemente adaptado a nuestras condiciones experimentales. Para ello se buscó la longitud de onda a la cual la interferencia del rojo de fenol del medio de cultivo era mínima. Tras estudiar el rango de longitudes de onda desde 500 a 600 nm con intervalos de dos unidades, se eligió 560 nm, pues a esa longitud de onda no existía interferencia del rojo de fenol (fig. 1a). Para elegir un tiempo de incubación óptimo se valoró la absorbancia a distintos tiempos de incubación con un estándar de nitrito sódico (fig. 1b). Asimismo, se determinó la cantidad adecuada de reactivo de Griess a utilizar (fig. 1c). En vista de lo anteriormente expuesto, para la determinación de los nitritos se separaron 500 µl de sobrenadante de cada pocillo y se mezclaron con 250 µl de reactivo de Griess (sulfanilamida 1 % y dihidrocloruro de naftil-etilén-diamina 0,1 % en ácido ortofosfórico 2,5 %). Tras quince minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm. La concentración de nitritos se calculó usando un estándar de nitrito sódico.

En cada grupo de animales se estudió el daño histológico por microscopía óptica y electrónica. Para la microscopía óptica, la metodología consistió en pinzar el pedículo renal y extraer el riñón, que se cortó en dos partes iguales mediante un corte sagital. Estas se fijaron por inmersión en formaldehído al 10 % durante un día y después de deshidratar e incluir en parafina, se cortaron y montaron en portaobjetos, realizándose una tinción con hematoxilina-eosina.

Los cambios morfológicos se analizaron en un estudio ciego por un patólogo basado en una escala semicuantitativa que evalúa los cambios más frecuentes en el fallo renal agudo. Los mayores valores representan mayor daño renal (el máximo valor por

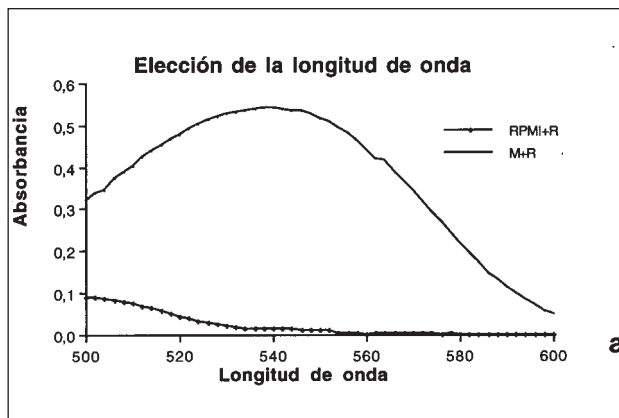


Fig. 1a.—Absorbancia de un estándar de nitrito sódico y de una muestra de medio de cultivo con rojo de fenol a distintas longitudes de onda.

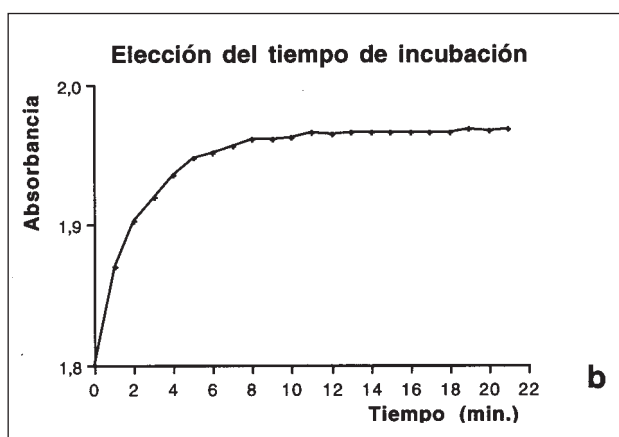


Fig. 1b.—Absorbancia a 560 nm de longitud de onda a distintos tiempos de incubación.

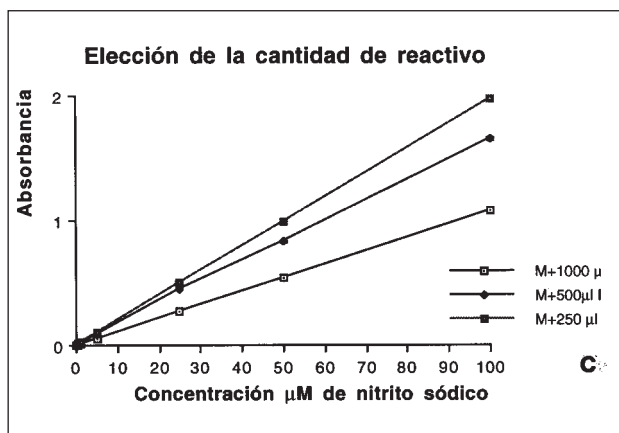


Fig. 1c.—Absorbancia a 560 nm de longitud de onda en presencia de distintas cantidades de reactivo de Griess.

túbulo fue 10). La puntuación se asignó de la siguiente manera: pérdida del borde en cepillo (1 punto), formación de vesículas en la membrana celular (1 o 2 puntos), edema intersticial (1 punto), necrosis celular (1 o 2 puntos), vacuolización citoplásmica (1 punto), obstrucción de la luz tubular (1 ó dos puntos) e infiltración (1 punto).

Para la microscopia electrónica, después de fijar la aorta por encima de la salida de las arterias renales, se perfundió el riñón derecho con 50 ml de solución salina heparinizada a un ritmo de perfusión de 600 ml/hora y a una presión de 150 cm de agua para el lavado sanguíneo total. Posteriormente se perfundió con 300 ml de glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato 0,2 M, pH 7,4, durante una hora para la fijación tisular.

Se extrajo el riñón derecho y se decapsuló cuidadosamente, se tallaron bloques de corteza renal de 1 mm³ que se sumergieron en el fijador (glutaraldehído al 2,5 %) durante una hora, pasándolos después a tampón cacodilato. A continuación, los bloques se postfijaron en tetróxido de osmio al 1 % en tampón cacodilato durante dos horas a 4° C, deshidratando los mismos con cantidades crecientes de etanol, y posteriormente con varios pases de óxido de propileno puro y mezcla de óxido de propileno y resina Durcupán a partes iguales. A continuación, las piezas se pasaron a resina pura durante veinticuatro horas, tras las cuales se incluyeron en cápsulas de gelatina que se rellenaron con resina Durcupán. Se dejaron polimerizar en la estufa a 60° C durante veinticuatro horas. De las pirámides obtenidas de esta manera, una vez seleccionadas y retalladas, se realizaron los correspondientes cortes ultrafinos que se depositaron en rejillas de cobre, contrastando las mismas con acetato de uranilo y nitrato de plomo. Las rejillas con las secciones se observaron con un microscopio electrónico Philips EM 201 a un potencial de aceleración de 60 Kv.

Las concentraciones de creatinina plasmática y urinaria se midieron diariamente por un método colorimétrico basado en la reacción de Jaffé. El FGR se determinó mediante el aclaramiento de creatinina. La N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) se midió por un método espectrofluorimétrico²⁰ y la fosfatasa alcalina (FA) por un método espectrofotométrico (Boehringer Mannheim)²¹.

La concentración plasmática y urinaria de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ se midió con electrodos selectivos para estos iones (CX-3, Beckman, Fullerton, California, USA).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± EEM. Para la comparación de medias entre los distintos

grupos se realizó el análisis de la varianza de una o dos vías, seguido de un test de comparación de medias múltiple (test de Scheffé). Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

El quinto día de tratamiento, las presiones sistólica, diastólica y media fueron significativamente mayores en los grupos que bebieron L-NAME que en sus respectivos controles (fig. 2). Estas diferencias comenzaron a ser significativas el segundo día entre los grupos control y control + L-NAME, mientras que entre genta y genta + L-NAME sólo lo fueron el último día. Además, la PAM fue significativamente menor en el grupo genta + L-NAME que en el grupo control + L-NAME. A partir del tercer día se encontraron diferencias significativas entre los grupos control + L-NAME y genta y entre control y genta + L-NAME, manteniéndose estas diferencias hasta el final.

Los grupos de ratas tratadas con L-NAME no experimentaron cambios significativos en los valores de creatinina plasmática (fig. 3) con respecto a sus respectivos controles durante los días de tratamiento. Las ratas tratadas con gentamicina mostraron incrementos significativos en la concentración de creatinina plasmática con respecto a las no tratadas. El grupo genta + L-NAME presentó diferencias significativas con respecto al grupo control a partir del tercer día de tratamiento; sin embargo, con respecto al grupo control + L-NAME, los valores son significativos a partir del cuarto día. El último día de tratamiento, el grupo genta + L-NAME presentaba mayores concentraciones de creatinina plasmática que el genta, pero estas diferencias no resultaron estadísticamente signi-

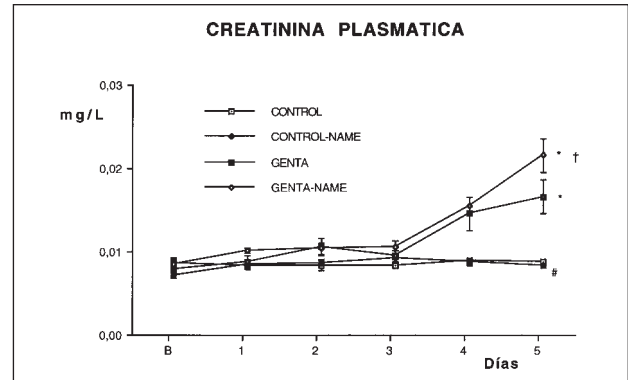


Fig. 3.—Creatinina en plasma a lo largo del tratamiento en los cuatro grupos experimentales estudiados. Significación estadística: p < 0,01 con respecto al grupo control. # p < 0,01 con respecto al grupo genta. + p < 0,01 con respecto al control-L-NAME

ficativas. El último día resultaron significativas las diferencias observadas entre los grupos control y genta y entre los grupos control + L-NAME y genta.

El aclaramiento de creatinina (fig. 4) se redujo progresivamente en los grupos tratados con gentamicina. El último día de tratamiento, esta reducción llegó a un 66 % en el grupo genta y a un 75 % en el grupo que además de gentamicina recibe L-NAME. Los dos grupos tratados con gentamicina presentaron valores de aclaramiento de creatinina significativamente menores que los grupos control. En el grupo genta + L-NAME se obtuvieron valores de aclaramiento de creatinina menores que en el grupo genta, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Los grupos tratados con gentamicina presentaron una excreción significativamente mayor de NAG y FA que los grupos control. El grupo control-L-NAME

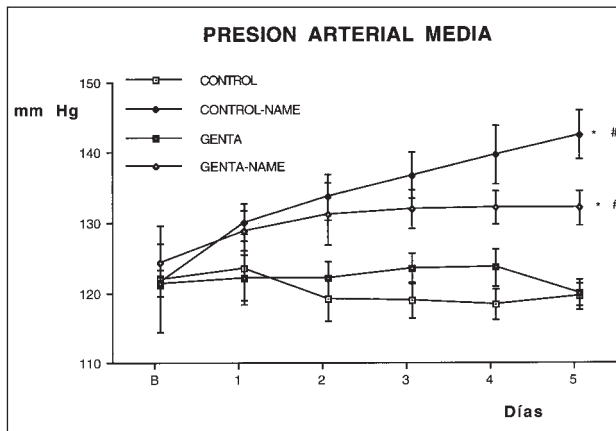


Fig. 2.—Presión arterial media a lo largo del tratamiento en los cuatro grupos experimentales estudiados. Significación estadística: *p < 0,01 con respecto al grupo control. # p < 0,01 con respecto al grupo genta.

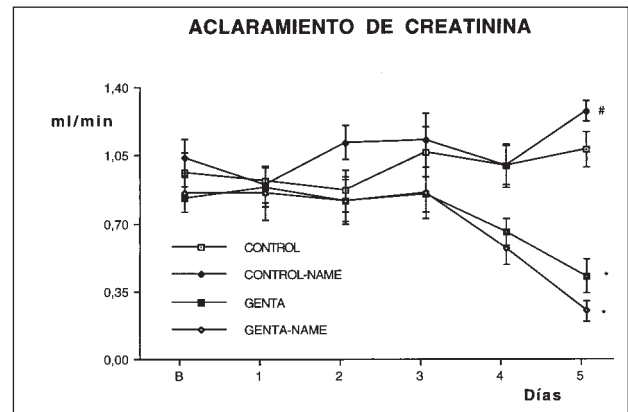


Fig. 4.—Aclaramiento de creatinina a lo largo del tratamiento en los cuatro grupos experimentales estudiados. Significación estadística: * p < 0,01 con respecto al grupo control. # p < 0,01 con respecto al grupo respecto al grupo genta. + p < 0,01 con respecto al control-L-NAME/control-L-NAME

muestra una excreción significativamente mayor de NAG que el grupo control, y el genta-L-NAME muestra una excreción urinaria de NAG significativamente mayor que el grupo genta (tabla I).

No se encontraron diferencias en la excreción urinaria de electrólitos entre los grupos de ratas control tratadas y no tratadas con L-NAME. Las ratas tratadas con gentamicina (con y sin L-NAME) mostraron un descenso significativo en la excreción de K⁺ (fig. 5) con respecto a sus respectivos controles, pero estas diferencias sólo resultaron significativas el quinto día. Las ratas del grupo genta + L-NAME mostraron un mayor descenso de la excreción urinaria de Na⁺ (fig. 6) y de K⁺ que las del grupo genta; estas diferencias fueron significativas el quinto día de tratamiento. Se calcularon las excreciones fraccionales tanto de Na⁺ como de K⁺ y se compararon los valores obtenidos antes de empezar el tratamiento (valor basal) con el obtenido el último día. Los resultados muestran que la excreción fraccional de sodio aumentó significativamente en los grupos tratados con gentamicina (con y sin L-NAME) en comparación con sus valores basales y con los valores obtenidos en los grupos control (tabla II). La excreción fraccional de potasio

sólo se modifica significativamente en el grupo genta-L-NAME. El resto de los grupos no presentan modificaciones con el tratamiento (tabla II). Los resultados de la incubación de glomérulos (tabla III) muestran una producción de nitritos significativamente mayor en los grupos de ratas tratadas con gentamicina que en las ratas control. Cuando se incubaron los glomérulos en presencia de L-arginina 10⁻³ M, los procedentes de ratas que no bebían L-NAME produjeron cantidades de nitritos significativamente mayores que los correspondientes pocillos control. Este aumento fue de un 367 % en los glomérulos procedentes de ratas control y de un 202 % en el grupo de ratas tratadas con gentamicina. No se observaron diferencias en la producción de nitritos entre los grupos control + L-NAME y genta + L-NAME.

Los glomérulos de ratas tratadas con L-NAME respondían disminuyendo significativamente la producción de nitritos cuando se añadía L-NAME al pocillo, pero mientras que en el grupo control + L-NAME la

Tabla I. Excreción urinaria de enzimas el último día de tratamiento.

	Control	Control + L-NAME	Genta	Genta + L-NAME
NAG (mg/día)	0,51 ± 0,07	2,33 ± 0,9*	3,17 ± 0,4*	4,71 ± 0,4*##
FA (U/día)	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,07	0,76 ± 0,2*#	0,7 ± 0,17*#

Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 9 en todos los casos. Abreviaturas: NAG: N-acetil-beta-D-glucosaminidasa; FA: Fosfatasa alcalina. Significación estadística: * p < 0,05 con respecto al grupo control; # p < 0,05 con respecto al grupo control + L-NAME; + p < 0,05 con respecto al grupo genta. (Test de Scheffé).

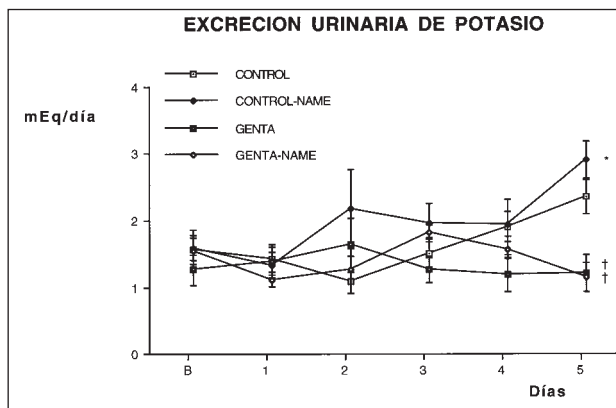


Fig. 5.—Excreción urinaria de potasio a lo largo del tratamiento en los cuatro grupos experimentales estudiados. Significación estadística: * p < 0,01 con respecto al grupo control. + p < 0,01 con respecto al grupo control-L-NAME.

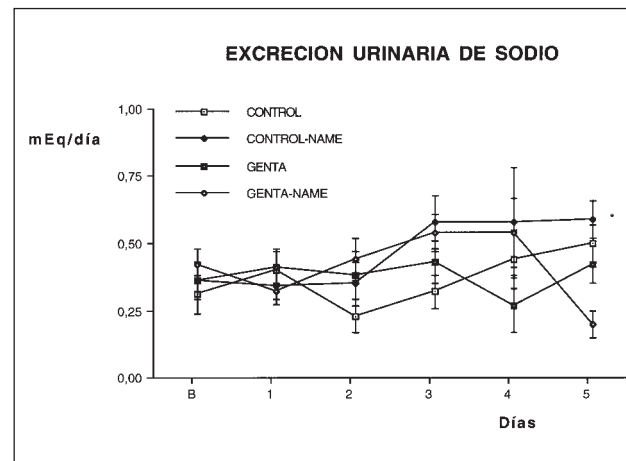


Fig. 6.—Excreción urinaria de sodio a lo largo del tratamiento en los cuatro grupos experimentales estudiados. Significación estadística: * p < 0,01 con respecto al grupo control.

Tabla II. Excreción fraccional de sodio y de potasio en los distintos grupos experimentales

	Control	Control + L-NAME	Genta	Genta + L-NAME
EF Na ⁺ basal	2,23	2,4	3,04	3,44
Final	3,26	3,26	7,14*#	5,84*#
EF K ⁺ basal	35,36	33,22	32,77	39,1
Final	48,04	50,31	47,08	81,06*+

Los datos son medias ± EEM y están expresados como % n = 9 en todos los casos. Significación estadística: * p < 0,01 con respecto a su propio basal; # p < 0,01 con respecto a los grupos control (con y sin L-NAME); + p < 0,01 con respecto a todos los demás grupos.

Tabla III. Producción glomerular de nitritos en los diferentes grupos

	Control	Control + L-NAME	Genta	Genta + L-NAME
Basal	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,64 ± 0,03*#	0,167 ± 0,03*#
+L-NAME 10 ⁻⁴ M	0,52 ± 0,08 ^a	0,11 ± 0,02* ^a	0,84 ± 0,06*# ^a	0,24 ± 0,09* ^a
+L-arginina 10 ⁻³ M	0,92 ± 0,11 ^a	0,20 ± 0,03	1,29 ± 0,12 ^a	0,62 ± 0,02

Los datos son medias + EEM y están expresados como nmol/1.000 glomérulos. n = 40 en todos los casos. Significación estadística: * p < 0,05 con respecto al grupo control; # p < 0,05 con respecto al grupo control+L-NAME; + p < 0,05 con respecto al grupo genta; ^a p < 0,01 vs su propio basal (test de Scheffé).

disminución era de un 27 %, en el grupo genta + L-NAME fue de un 49 %. Sin embargo, en las ratas que no bebían L-NAME, la adición de éste a los pocillos produjo un incremento significativo en la producción de NO. Este aumento fue mayor en las ratas del grupo control, en las que se incrementó en un 347 %, que en las del grupo genta, en las que sólo lo hizo en un 227 %.

La concentración de nitritos fue la misma cuando se incubó el medio de cultivo RPMI sólo y cuando se incubó éste con L-NAME 10⁻⁴ M sin glomérulos (0,24 ± 0,02 vs 0,22 ± 0,02 µM).

El examen de microscopía óptica (fig. 7) reveló la existencia de un daño total renal significativamente mayor en los grupos tratados con gentamicina que en los grupos control y control-L-NAME. Además, el grupo genta-L-NAME mostró un daño morfológico significativamente mayor al mostrado por todos los demás grupos. La figura 8 (a-d) muestra cortes transversales de túbulos proximales procedentes de ratas de los distintos grupos experimentales (microscopía electrónica). Los riñones de los animales control mostraron una arquitectura de características normales cuando se observaron al microscopio electrónico (fig. 8a). Los animales tratados únicamente con L-NAME mostraron un aumento en el número y tamaño de los lisosomas de las células tubulares proximales, conservando bastante bien el resto de organelas, incluido el ribete en cepillo de las microvellosidades (fig. 8b). En los animales tratados con gentamicina se observó una necrosis tubular aguda masiva y difusa; no obstante, se pueden observar túbulos proximales en los que, a pesar de verse varias alteraciones, como pérdida parcial del ribete en cepillo, vacuolas intracito-plásmicas grandes y numerosos cuerpos residuales (además de pérdida parcial de los laberintos basales), mantienen aún parte de sus características morfológicas (fig. 8c). Los animales tratados con gentamicina + L-NAME muestran una necrosis tubular masiva y difusa, con desestructuración casi total de la arquitectura de la mayor parte de los túbulos pro-

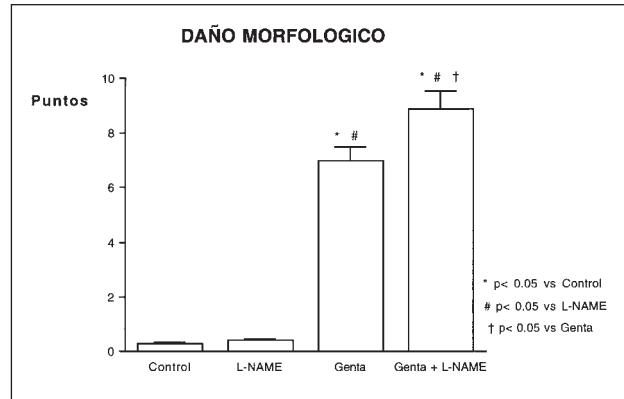


Fig. 7.—Valores de daño renal total, valorado por microscopía óptica. Significación estadística: * p < 0,01 con respecto al grupo control; # p < 0,01 con respecto al grupo control-L-NAME; + p < 0,01 con respecto al grupo genta.

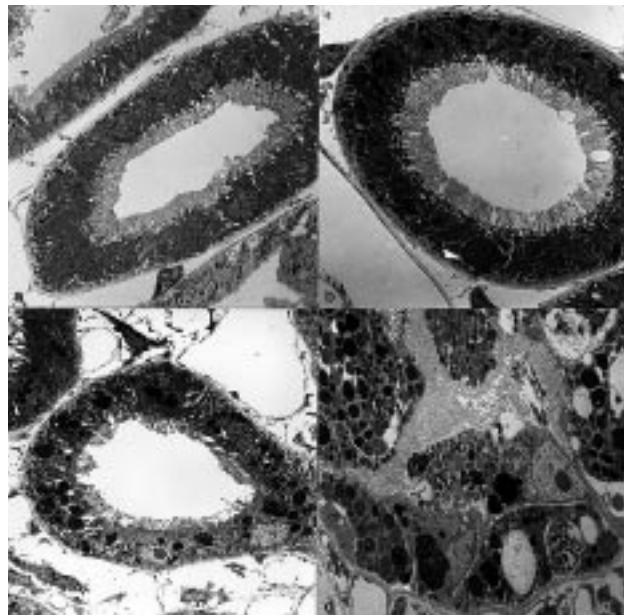


Fig. 8a.—Micrografía electrónica correspondiente a una rata control, en la que se observa en el centro una sección transversal casi completa de un túbulo proximal (2.400 × en original). b. Micrografía electrónica en la que se observa un corte transversal de un túbulo proximal perteneciente a una rata del grupo control-L-NAME (2.400 × en original), c. Micrografía electrónica en la que se observa la sección transversal de un túbulo proximal perteneciente a una rata del grupo gentamicina (2.400 × en original). d. Micrografía electrónica de un corte transversal perteneciente a un túbulo proximal perteneciente a una rata del grupo gentamicina-L-NAME (2.400 × en original).

ximales renales, siendo difícil encontrar túbulos en los que aún puede adivinarse la arquitectura celular, a pesar de las graves alteraciones ultraestructurales (fig. 8d).

Discusión

El tratamiento con L-NAME (5 mg/kg día) durante cinco días en ratas despiertas indujo un aumento significativo en la presión sistólica, diastólica y en la PAM, tal como se había descrito previamente por Baylis y cols.²², lo que sugiere que el tratamiento con L-NAME fue efectivo inhibiendo la síntesis de NO. Estos resultados también sugieren la existencia de un tono vasodilatador dependiente de NO en estos animales.

No se observaron efectos significativos sobre la función renal medida como aclaramiento de creatinina y como excreción urinaria de electrólitos. Es improbable que la dosis de L-NAME utilizada sea incapaz de inhibir la síntesis glomerular renal de NO, ya que no hay razones para pensar que el L-NAME sea eficaz en los vasos de resistencia, aumentando la presión arterial, pero ineficaz en el riñón. Aunque se ha publicado que el tratamiento agudo con L-NAME induce una disminución del FGR y de la excreción urinaria de sodio²³, un tratamiento de cinco días no indujo cambios en la función renal, probablemente porque éstos se compensan con los cambios observados en presión arterial. Baylis y cols.⁴ han publicado que un tratamiento de dos meses con la misma dosis de L-NAME utilizada por nosotros induce hipertensión y disminuye el FGR. Probablemente en nuestro estudio el tiempo de administración de L-NAME no es suficiente para inducir daño renal.

En las ratas tratadas con gentamicina, los niveles de creatinina en plasma se duplicaron, mientras que el aclaramiento de creatinina se redujo en un 75 %. Además, los animales tratados con gentamicina mostraron un marcado incremento en la excreción urinaria de NAG y de FA, lo que refleja un fracaso renal significativo y una importante necrosis tubular¹. Numerosos autores afirman que los niveles enzimáticos en orina son importantes como índices tempranos del daño del túbulo proximal^{29,30}. La NAG y la FA son, por tanto, buenos parámetros para determinar la influencia de los aminoglucósidos sobre el túbulo proximal. La NAG es una enzima lisosomal y su aumento en la excreción urinaria refleja el daño lisosomal. La FA es una enzima asociada al borde en cepillo y su aumento en la excreción urinaria refleja la necrosis celular inducida por el aminoglucósido. De esto se puede concluir que las ratas tratadas con gentamicina tienen mayor daño tubular que las no tratadas y que el L-NAME agrava el daño renal inducido por la gentamicina. La NAG es un buen parámetro de daño tubular, y en las ratas control-L-NAME su excreción es significativamente mayor que en las ratas control, lo que indica que el L-NAME por sí mismo produce daño tubular, lo que se

confirmó con los estudios histológicos, donde, como ya hemos dicho, se observa daño tubular sobre todo a nivel lisosomal.

Las ratas que, además de gentamicina, recibieron L-NAME mostraron mayores niveles de daño de la función renal que los animales que recibieron únicamente gentamicina, como se refleja por los mayores valores encontrados de creatinina en plasma y los menores valores de aclaramiento de creatinina, mayor excreción urinaria de NAG y menor excreción urinaria de sodio y potasio, a pesar de la mayor PAM que se observa en los animales tratados con gentamicina + L-NAME con respecto a las ratas tratadas con gentamicina solamente. La excreción fraccional de sodio es un índice de la natriuresis en relación con el FGR. Las ratas tratadas con gentamicina (con y sin L-NAME) muestran valores significativamente más altos al finalizar el tratamiento que sus respectivos controles. Estos valores son también significativamente más altos que sus correspondientes basales. Esto significa que en estos grupos se produce una mayor natriuresis en proporción al FGR que tienen (que es muy pequeño, como consecuencia del tratamiento con gentamicina), aunque en términos absolutos el valor de excreción de sodio sea menor que en los grupos control. El aumento de excreción fraccional de sodio que se observa es otro índice de daño tubular proximal, ya que es en este segmento de la nefrona donde tiene lugar la mayor reabsorción de sodio cuando la función renal es normal.

En las células epiteliales del túbulo distal existe la Na-K-ATPasa, que saca sodio y mete potasio al interior celular. Este aumento de la concentración intracelular de potasio permite que pueda salir a la luz tubular por un mecanismo pasivo a favor de gradiente de concentración y de potencial. La consecuencia final será, por tanto, que la disminución de la reabsorción proximal de sodio (y, por tanto, el aumento de natriuresis) aumenta la secreción distal de potasio y su eliminación en orina. Está demostrado que la actividad Na-K-ATPasa de las células tubulares renales está disminuida y la permeabilidad de la membrana incrementada por la gentamicina. La disminución en la concentración celular de potasio puede ser debida bien a una disminución de potasio vía la Na-K-ATPasa o a un cambio en la salida causado por el aumento de la permeabilidad de la membrana o despolarización del potencial eléctrico de la célula. Esto sólo se pone de manifiesto cuando se trata a los animales conjuntamente con gentamicina y L-NAME, lo que parece indicar que estos tratamientos en conjunto deterioran el túbulo distal, cosa que no ocurre cuando se dan estos tratamientos aisladamente.

Las ratas tratadas con gentamicina mostraron una producción glomerular de nitritos significativamente

mayor que las controles. En las condiciones de óxido-reducción del medio de incubación, el NO se transforma en nitrito y a continuación en nitrato; los iones nitrito y nitrato son productos aniónicos estables que se forman en una relación molecular 3:2 a partir del NO y como resultado de su catabolismo²⁴. Así, la producción de nitritos es un ensayo directo de la producción de NO en ausencia de contaminación bacteriana¹⁹. Estos datos confirman previos resultados de nuestro laboratorio, que demuestran que los glomérulos procedentes de ratas con FRA inducido por tratamiento con gentamicina muestran una producción aumentada de GMPc²⁵. Como el NO liberado de las células glomerulares estimula la síntesis de GMPc en este tejido, concluimos que el tratamiento con gentamicina induce un aumento de la síntesis glomerular de NO. El tratamiento crónico con L-NAME no modificó la producción glomerular de nitritos. La causa probable es que como el L-NAME es un inhibidor competitivo, al aislar los glomérulos e incubarlos en un medio sin L-NAME, éste se diluye en el medio y desaparece su acción. La adición de L-arginina al medio de cultivo indujo aumentos significativos en la producción glomerular de nitritos en los grupos control y genta. Los grupos tratados crónicamente con L-NAME no responden a la estimulación con L-arginina. Quizá la enzima que está crónicamente inhibida por el tratamiento no es capaz de estimularse por sustrato. La estimulación que se observa en el grupo control es mayor que en el grupo genta; una explicación posible es que la producción basal de los glomérulos de estas ratas esté tan estimulada que una estimulación por sustrato no consiga ser tan elevada como la observada en el grupo control. En cuanto a la estimulación de la producción de nitritos que ocurre en presencia de L-NAME en los grupos que no recibieron L-NAME como tratamiento crónico en el agua de bebida, hay que señalar que el L-NAME, aceptado comúnmente como inhibidor «específico» de la síntesis de NO, bloquea la producción de nitritos tras tiempos de incubación cortos (15 minutos)²⁵, pero la estimula tras períodos largos de incubación (resultados sin publicar). El efecto del L-NAME estimulando la producción de NO parece que no se debe a ninguna sustancia presente en el medio de cultivo. Los glomérulos tienen un gran número de células endoteliales, y trabajos recientes han demostrado la capacidad de las células endoteliales de metabolizar las metilargininas a L-citrulina y, subsecuentemente, a L-arginina^{26, 27}, que puede actuar como sustrato de síntesis de NO. Algunos autores han publicado que el L-NMMA es un agonista parcial de síntesis de NO²⁸. Además, se ha aislado y purificado una nueva enzima, la N⁶, N⁶-dimetilarginina dimetilamino-hidrolasa en el riñón de rata. Esta enzima cataliza la liberación hidrolítica del grupo dimeti-

lamino de las metil argininas y libera L-citrulina y dimetilamina. Aunque esta enzima es bastante específica, podría ser posible que actuara de la misma manera a partir del L-NAME, causando de esta forma liberación de NO por las células glomerulares. Estos efectos no se observan en las ratas que recibieron tratamiento crónico con L-NAME. Una explicación posible podría ser que cuando el L-NAME se da en agua de bebida (tratamiento «*in vivo*»), ejerce su efecto antes de que el mecanismo descrito anteriormente se ponga en marcha (como muestran los datos de presión arterial). Cuando los glomérulos procedentes de estas ratas se cultivan, prevalece el efecto de la inhibición crónica por el L-NAME en el agua de bebida sobre el efecto de la degradación enzimática del L-NAME que se pone en el pocillo, apareciendo como efecto final la inhibición de la síntesis de NO.

En concordancia con las medidas funcionales, las ratas tratadas con gentamicina y L-NAME muestran mayor nivel de daño morfológico renal que las que reciben solamente gentamicina. La gentamicina se une a ciertas estructuras subcelulares: núcleo, mitocondrias, lisosomas, proteínas citosólicas solubles y otras sustancias intracelulares. Esta unión puede alterar el comportamiento de dichas organelas intracelulares y puede ser un factor importante de la nefrotoxicidad. La primera lesión patológica observada a microscopía electrónica, tras el tratamiento prolongado con gentamicina es un aumento en el número y tamaño de los lisosomas secundarios. El siguiente cambio es una disminución en el número de cilios, así como un aumento de las microvellosidades de los rniomos; a esto le sigue una vacuolización citoplasmática, una dilatación de la cisterna del retículo endoplasmático en las células tubulares proximales y una hinchazón mitocondrial. De esta manera se produce una necrosis celular progresiva y una disminución de la capacidad de excreción renal.

Así, se puede concluir que el mayor daño de función renal observado en las ratas que reciben L-NAME (y que, por lo tanto, tienen suprimida la síntesis de NO) y gentamicina, en comparación con las que reciben gentamicina solamente, sugiere un papel de la síntesis glomerular de NO aumentada, contrarrestando el daño glomerular producido por la gentamicina.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con una beca DGICYT (SAF 92/93) y de la Junta de Castilla y León. Agradecemos la cooperación de A. Pérez, del Hospital Universitario de Salamanca, en las preparaciones histológicas. También agradecemos a Schering Plough Laboratorios la donación del sulfato de gentamicina.

L. Rivas-Cabañero es becaria de Investigación de la Universidad de Salamanca.

Bibliografía

- Rodríguez-Barbero A, Bosque E, Rivas-Cabañero L y cols.: Effect of platelet activating factor, antagonist treatment on gentamicin nephrotoxicity. *Mediat Inflamm* 1:23-26, 1992.
- Kaloyanides GJ y Pastoriza-Muñoz E: Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 18:571-582, 1980.
- Schor N, Ichikawa J, Rennke HG y cols.: Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside treated rat. *Kidney Int* 19:288-296, 1981.
- Baylis C: The mechanism of the decline in glomerular filtration rate in gentamicin induced acute renal failure in the rat. *J Antimicro Chem* 6:381, 1980.
- Schacht J: Isolation of an aminoglycoside receptor from guinea pig inner ear tissues and kidneys. *Arch Otorhinolaryngol* 224:129-134, 1979.
- Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM y cols.: Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 222:350-358, 1982.
- Au S, Weiner ND y Schacht J: Aminoglycoside antibiotics preferentially increase permeability in phosphoinositide-containing membranes: A study with carboxyfluorescein in liposomes. *Biochim Biophys Acta* 902:80-86, 1987.
- Williams SE y Schacht J: Binding of neomycin and calcium to phospholipids and other anionic compounds. *J Antibiotics* 39:457-462, 1986.
- Kaloyanides GJ: Renal pharmacology of aminoglycoside antibiotics. En: *Contributions to Nephrology*, 42. Bianchi C, Bertelli A, Duarte CG, eds. Karger, Basel, pp. 148-167, 1984.
- Kaloyanides GJ, Bowman RL y Silverblatt FJ: Comparison of the nephrotoxicity of netilmicin and gentamicin in the rat. *Antimicrob Agents Chemother* 12:474-478, 1977.
- Brinker KR, Bulger RE, Dobyan DC y cols.: Effect of potassium depletion of gentamicin nephrotoxicity. *J Lab Med* 98:292-301, 1981.
- Ramsamy LS y Kaloyanides GJ: The effect of gentamicin on the biophysical properties of phosphatidic acid liposomes is influenced by the O-C=O group of the lipid. *Biochem* 27:8249-8254, 1988.
- Humes HD, Weinberg JM y Knauss TC: Clinical and pathophysiological aspects of aminoglycoside nephrotoxicity. *Am J Kid Dis* 2:5-29, 1982.
- Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142, 1991.
- Zatz R y DeNucci G: Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol* 261:F360-F363, 1991.
- Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ y cols.: Effects of N^G-nitro-L-arginine methylester and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension* 15:659-663, 1990.
- Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ y cols.: Mediator role of endothelium-derived nitric oxide in renal vasodilatory and excretory effects of bradykinin. *Am J Hypertension* 4:260-262, 1991.
- Olivera A y López-Novoa JM: Adenosine stimulates Ca²⁺ fluxes and increases cytosolic free Ca²⁺ in cultured rat mesangial cells. *Biochem J* 282:871-876, 1992.
- Cattell V, Cook T y Moncada S: Glomeruli synthesize nitrite in experimental nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 38:1056-1060, 1990.
- Robinson D y Thorpe R: Fluorescent assay of alpha-L-fucosidase. *Clin Chim Acta* 55:65-69, 1974.
- Bretaudiere JP y Spillman T: Alkaline phosphatases. En Bergmeyer HU (ed): *Methods in enzymatic analysis*, 3rd ed., Weinheim: Verlag Chemie, pp 75-82, 1984.
- Baylis C, Mitruka B y Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90:278-281, 1992.
- Romero JC, Lahera V, Salom MG y cols.: Role of endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2:1371-1378, 1992.
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD y Wishnok JS: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711, 1982.
- Rivas-Cabañero L, Montero A y López-Novoa JM: Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol* 270:119-121, 1994.
- Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ y cols.: Endothelial cells metabolize N^G-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Comm* 167:1037-1043, 1990.
- MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GSJ y cols.: Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol* 112:43-48, 1994.
- Archer SL y Hampl V: N^G-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise. *Biochem Biophys Res Comm* 188:590-596, 1992.
- Flandrois C, Gravagna B, Maire I y Mathieu M: Enzimurie. *Ann Biol Clin (Paris)* 44:486-490, 1986.
- Price RG: Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal diseases. *Toxicol* 23:99-134, 1982.