

Papel de los radicales libres en la fisiopatología renal

D. Rodríguez Puyol*, I. Duque, I. Arribas, G. Pérez de Lema, S. López Ongil y M. Rodríguez Puyol

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

Introducción

Los mecanismos responsables del fracaso renal agudo (FRA) y de la insuficiencia renal crónica (IRC) son complejos, multifactoriales, y el conocimiento que tenemos de los mismos va progresando lentamente, sin que estemos, ni con mucho, próximos a comprenderlos en profundidad. En los últimos años se ha prestado gran atención al posible papel que determinados mediadores biológicos podrían jugar en la génesis de estos efectos, considerando desde péptidos simples muy bien conocidos, como la angiotensina II, hasta metabolitos de bajo peso molecular, como el óxido nítrico o incluso factores de crecimiento. Una relación que intenta ser exhaustiva de los mediadores que pueden jugar un papel biológico a nivel glomerular, sobre todo en relación con las células mesangiales, se muestra en la [tabla I](#).

Dentro de estos mediadores, los metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO) han ido cobrando una importancia progresiva en los últimos años como mediadores del daño renal en determinadas situaciones fisiopatológicas. Estos productos se generan en todas las células del organismo durante el proceso de reducción del oxígeno molecular a agua ([fig. 1](#))^{1,2}. La molécula de oxígeno, incorporando progresivamente electrones, da lugar a la formación de anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ion hidroxilo (OH^-) y otros metabolitos, que comparten como propiedades su alta reactividad biológica y su corta vida media. La mayoría de ellos tienen electrones desapareados en sus orbitales, motivo por el que se conocen frecuentemente como ra-

dicales libres, si bien el término MADO es mucho más preciso, ya que, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno no tiene estructura de radical libre.

Tabla I. Mediadores bioactivos sintetizados por las células mesangiales y capaces de modular su función

| Naturaleza química-biológica | Actúan en células | Sintetizados por células |
|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Péptidos | Angiotensina II Vasopresina Insulina Glucagón ANP Somatostatina | Renina Endotelina |
| Lípidos | Prostanoides Metabolitos LO PAF | Prostanoides Metabolitos LO PAF |
| Aminas | Norepinefrina Histamina Dopamina | |
| Factores de crecimiento/citoquinas | PDGF TGFβ EGF Interleuquinas | PDGF TGFβ Interleuquinas |
| Otros | Adenosina MADO ON | MADO ON |

ANP: péptido natriurético atrial. LO: lipoxigenasa. PAF: factor activador de las plaquetas. PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas. TGFβ: factor de crecimiento transformador β. EGF: factor de crecimiento epidérmico. MADO: metabolitos activos derivados del oxígeno. ON: óxido nítrico.

La generación celular de MADO es un proceso que puede considerarse fisiológico, ya que en condiciones normales una cierta cantidad de los mismos es sintetizada en los procesos respiratorios mitocondriales, así como durante la activación de determinados sistemas enzimáticos. Esta síntesis fisiológica a nivel celular permanece en todo momento bajo control, ya que existe una serie de sistemas encargados

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

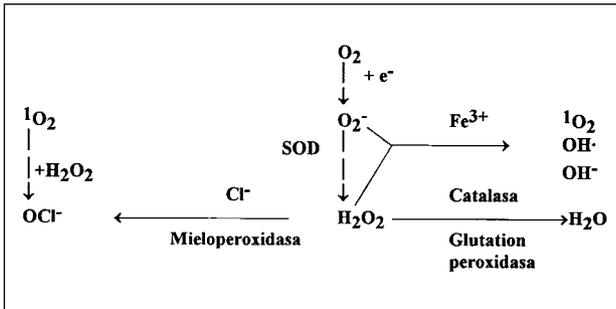


Fig. 1.—Formación de metabolitos activos derivados del oxígeno a partir del oxígeno molecular (O_2).

de la degradación de los metabolitos generados, incluyendo proteínas celulares constitutivas, como la catalasa y las distintas formas de superóxido dismutasa (fig. 1), el sistema del glutatión e incluso metabolitos exógenos como los tocoferoles. No obstante, cuando este sistema en equilibrio se descompensa, básicamente porque se sintetizan MADO en cantidades superiores a la capacidad degradadora de las células, es cuando pueden jugar un papel relevante como generadores de procesos patológicos.

Papel de los MADO en la fisiopatología renal

La idea de que los MADO podrían estar implicados en la generación de diversos procesos patológicos renales viene, fundamentalmente, de una serie de estudios realizados con antagonistas, por así decirlo, de estos MADO. De hecho, la administración de superóxido dismutasa, catalasa, desferrioxamina, manitol o vitamina E, sistemas todos ellos capaces de eliminar radicales libres, resulta beneficiosa en distintos modelos experimentales de daño renal, que abarcan desde formas de fracaso renal agudo³⁻⁵ hasta distintas glomerulonefritis⁶⁻¹², habiéndose incluso propuesto un papel de los MADO en la progresión crónica del daño renal^{13, 14}.

Junto a estos estudios, una serie de líneas de investigación han intentado evaluar el origen celular de los MADO generados en distintos contextos fisiopatológicos. Aunque la creencia inicial era que las células infiltrantes renales eran la principal fuente de MADO en distintas patologías^{1, 10, 15}, hoy en día se sabe que las propias estructuras renales, en respuesta a diversos estímulos, son capaces de sintetizar grandes cantidades de MADO¹⁶⁻²², con los subsiguientes efectos a nivel renal.

Así pues, se puede afirmar, a la vista de todo lo comentado, que las estructuras renales sintetizan MADO, que esta síntesis aumenta en condiciones fisiopatológicas y que la eliminación farmacológica de estos

metabolitos, cuando se sintetizan de forma anormal, resulta beneficiosa para el organismo. En otras palabras, es muy probable que los MADO jueguen un papel importante en la génesis de distintas enfermedades renales. Lo que ya no parece tan evidente es el mecanismo mediante el cual los MADO inducen alteraciones estructurales o funcionales a nivel renal.

La forma de resolver esta pregunta es compleja, por la dificultad de monitorizar directamente la síntesis tisular de MADO, así como por la gran labilidad de estos metabolitos. Por este motivo, diversos grupos de investigación, incluyendo el nuestro, se encuentran realizando una serie de experimentos *in vitro* en sistemas celulares en cultivo, con el fin de simplificar el abordaje a las preguntas fisiopatológicas relativas a los MADO. No obstante, antes de revisar detalladamente algunos de estos planteamientos, convendría revisar sus fundamentos teóricos.

El glomérulo renal es una estructura compleja, con tres tipos fundamentales de células: endoteliales, mesangiales y epiteliales viscerales, inmersas en una matriz extracelular con dos componentes fundamentales: la matriz mesangial y la membrana basal. Una revisión de los aspectos funcionales más importantes de todas estas estructuras está fuera de los objetivos de este manuscrito, pero hay algunos aspectos que habría que resaltar. En primer lugar, los tres tipos celulares descritos tienen receptores para múltiples sustancias bioactivas, como muestra la tabla I, para el caso de las células mesangiales. Se infiere, pues, fácilmente que muchas de estas sustancias ejercen sus efectos glomerulares previa interacción con las células residentes. En segundo lugar, se sabe que los tres tipos celulares, y especialmente las células endoteliales y mesangiales, tienen una enorme capacidad sintética, produciendo sustancias capaces de actuar sobre las propias células o incluso en estructuras próximas como los túbulos o las arteriolas. En tercer lugar, la capacidad contráctil de las células mesangiales ha sido estudiada ampliamente, y en el momento actual se piensa que puede ser muy importante en la regulación del coeficiente de ultrafiltración. Finalmente, el grado de proliferación de las células residentes glomerulares, así como su capacidad para mantener una matriz mesangial normal, pueden verse modificados en distintas situaciones patológicas, determinando la aparición de alteraciones estructurales a nivel glomerular.

Pues bien, los resultados que van a ser comentados a continuación con respecto a los MADO se van a centrar en estos aspectos funcionales de las células residentes glomerulares, asumiendo que, al menos en parte, los efectos patológicos de estos metabolitos podrían estar mediados por una modulación de las citadas funciones.

Capacidad de los MADO para contraer las células mesangiales en cultivo

La demostración de que una sustancia determinada es capaz de contraer las células mesangiales en cultivo conlleva una asunción conceptual importante, si bien todavía controvertida, a saber, que la sustancia en estudio es capaz de disminuir el coeficiente de ultrafiltración glomerular y, en consecuencia, disminuir el filtrado²³⁻²⁶. Cuando nuestro grupo se planteó demostrar este posible efecto de los MADO en la capacidad contráctil mesangial, se intentaba analizar los mecanismos fisiopatológicos que condicionaban la disminución del filtrado glomerular en las formas de fracaso renal agudo o glomerulonefritis en las que se había propuesto un papel para los MADO.

Como puede observarse en la parte superior de la figura 2, el área de sección de las células mesangiales de rata en cultivo disminuía en presencia de concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (panel de la izquierda) o al aumentar el tiempo de incubación con el citado metabolito (panel de la derecha). Como prueba de que el cambio de forma observado era una verdadera contracción, se analizó también si los mismos efectos eran evidentes en estructuras glomerulares íntegras, y como puede observarse en la parte inferior de la misma figura, se obtuvieron resultados totalmente comparables a los de las células.

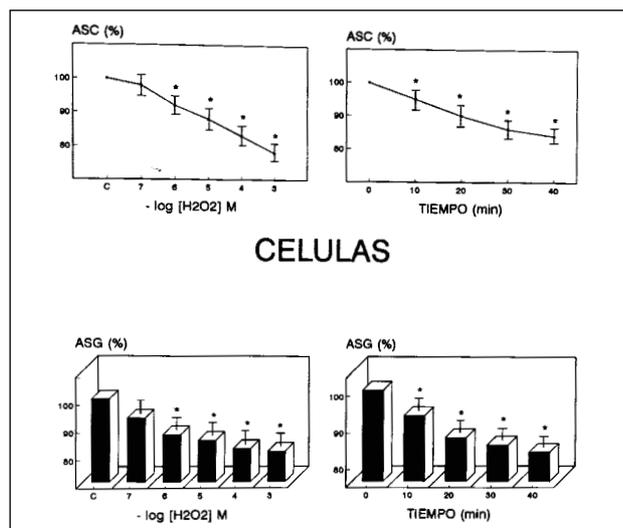


Fig. 2.—Efectos del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre el área de sección celular (ASC) (paneles superiores) y el área de sección glomerular (ASG) (paneles inferiores) de células mesangiales en cultivo y glomérulos aislados de rata. Los paneles de la izquierda muestran la dependencia de los efectos observados de las concentraciones utilizadas (tiempo de incubación, 30 min), mientras que los de la derecha analizan las variaciones en función del tiempo de incubación (concentración, 100 μM). * $p < 0,05$ vs C o tiempo 0.

Estos estudios, publicados en 1992²⁷, fueron la primera demostración del efecto contráctil de los MADO en células mesangiales en cultivo y glomérulos aislados. El efecto observado no era de naturaleza tóxica, ya que la viabilidad celular era perfecta tras las incubaciones. Se confirmó asimismo la naturaleza contráctil de los cambios de forma observados a nivel celular, demostrando que el peróxido de hidrógeno aumentaba también la incorporación de fósforo en la cadena ligera de la miosina, fenómeno bioquímico que desencadena la contracción celular. Finalmente, se comprobó que el efecto contráctil de los MADO dependía de la translocación de calcio desde el espacio extracelular al intracelular, siendo menos importantes los depósitos intracelulares de ese ion divalente.

El efecto contráctil de los MADO en células mesangiales en cultivo fue confirmado posteriormente por otros autores, lo que apoyaba claramente nuestro planteamiento inicial, que proponía un efecto contráctil intrínseco sobre las células mesangiales como mecanismo responsable de los cambios en la filtración glomerular en presencia de MADO.

Capacidad de los MADO para inducir la proliferación de las células mesangiales en cultivo

Muchas glomerulonefritis se caracterizan por la proliferación de células de distinto origen en el ovillo glomerular, y es muy posible que estos cambios estructurales puedan tener relación con las modificaciones funcionales agudas y, sobre todo, con los cambios crónicos que se producen en estos procesos. Dado que, como se ha comentado antes, el tratamiento con antioxidantes mejora en ocasiones la evolución de estos procesos, el planteamiento de nuestro grupo fue que, quizá, la proliferación de células residentes glomerulares, en particular de las mesangiales, podría verse estimulada directamente por los MADO. Esto parecía, a primera vista, un planteamiento contradictorio, ya que siempre se ha pensado que los MADO eran capaces de destruir células, pero no de estimular su crecimiento.

El peróxido de hidrógeno estimula la proliferación de células mesangiales de rata en cultivo, siendo posible demostrar, en células tratadas con este MADO, no sólo una mayor síntesis de ADN, sino también un incremento real de la celularidad²⁸. Al igual que ocurría con la contracción, este efecto era dependiente de calcio extracelular, siendo bloqueado con verapamilo y diltiazem. La figura 3 muestra la dependencia de la incorporación de timidina tritiada en el ADN celular de la concentración de peróxido de hidrógeno utilizada.

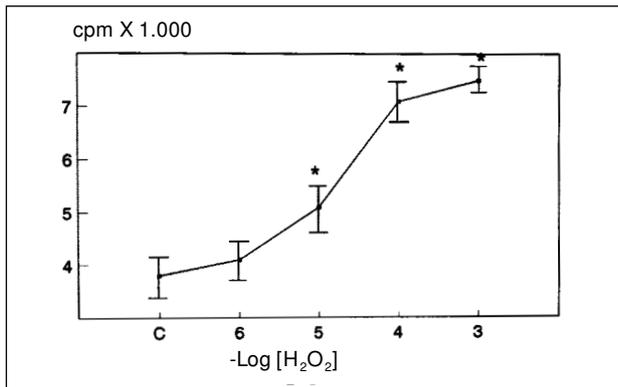


Fig. 3. –Incorporación de timidina tritiada en células mesangiales de rata en cultivo incubadas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). * p < 0,05 vs C.

Resultados recientes de nuestro grupo, en colaboración con la Universidad de Erlangen, han contribuido a explicar, con una mayor profundidad, los mecanismos celulares implicados en la proliferación mesangial en presencia de MADO²⁹. En estos experimentos, aparte de confirmar el efecto inductor de la proliferación de los MADO, fue posible demostrar la capacidad del peróxido de hidrógeno para inducir la fosforilación en residuos tirosina del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, así como de la proteína *src*, sabiéndose hoy en día con bastante precisión que estos cambios bioquímicos se asocian al fenómeno de proliferación celular.

Capacidad de los MADO para inducir la síntesis de mediadores bioactivos en las células mesangiales y endoteliales en cultivo

Ya desde hace años es bien conocido el efecto de los MADO para modular la síntesis de prostanoides en estructuras glomerulares aisladas o incluso en células mesangiales en cultivo. Los estudios de Baud y cols. demostraron un aumento de la síntesis de prostanoides en glomérulos aislados incubados con MADO, dependiendo el efecto específicamente del peróxido de hidrógeno y no de otros productos reactivos³⁰. Por su parte, Adler y cols. encontraron un efecto bifásico de los MADO sobre la síntesis de prostanoides en células mesangiales de rata en cultivo³¹. Una muestra de nuestros resultados³², que coinciden con los de Baud, se indica en la figura 4: los glomérulos aislados de rata, incubados con peróxido de hidrógeno, sintetizan más tromboxano A₂, medido como su metabolito estable tromboxano B₂, que los controles, de forma dosis (panel superior) y tiempo (panel inferior) dependiente.

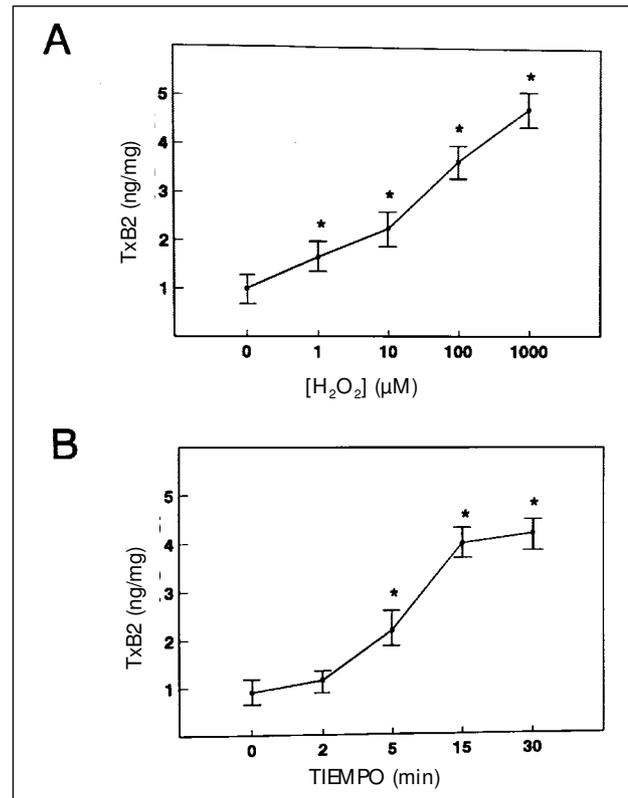


Fig. 4. –Síntesis del metabolito estable del tromboxano A₂, tromboxano B₂ (TxB₂), en glomérulos aislados de rata incubados con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 30 min. (panel superior) o con una misma concentración (100 μM) durante tiempos diferentes (panel inferior). * p < 0,05 vs concentración o tiempo 0.

En adición a esta modulación de la síntesis de prostanoides, nuestro grupo también ha demostrado que los MADO pueden estimular la producción de factor activador de las plaquetas (PAF), tanto en células en cultivo como en glomérulos aislados de rata^{27, 32}. Este efecto no había sido puesto en evidencia previamente en esta estirpe celular, si bien sí había sido posible demostrar la producción de PAF en células endoteliales incubadas con MADO.

Junto a estos efectos estimuladores de la síntesis de mediadores bioactivos por parte de los MADO en células mesangiales, es muy posible que estos derivados del oxígeno también puedan modificar la actividad funcional de otras células glomerulares, como las endoteliales. El cultivo de endotelio glomerular es una técnica muy compleja, utilizada únicamente por unos pocos investigadores en el mundo. Nuestro grupo ha evaluado, no obstante, el efecto de los radicales libres sobre la expresión del mRNA de una enzima endotelial muy importante, la óxido nítrico sintetasa constitutiva, responsable de la síntesis de

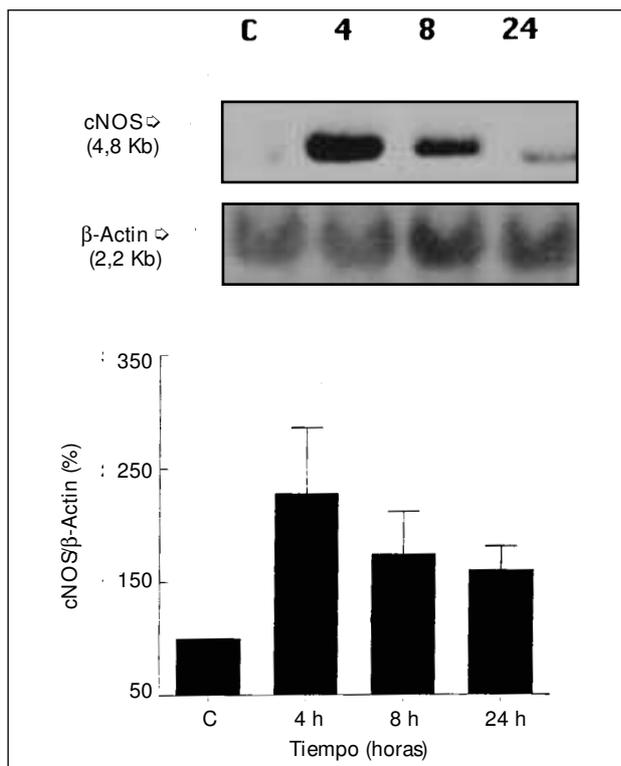


Fig. 5.—Expresión del mRNA de la óxido nítrico sintetasa constitutiva (panel superior) en células endoteliales de aorta bovina incubadas durante 4, 8 y 24 horas con un sistema generador de metabolitos activos derivados del oxígeno (xantina 0,1 M más xantina oxidasa 1 mU/ml). El panel medio muestra los cambios observados en la expresión del mRNA de la actina, mientras que el inferior es un análisis numérico del cociente entre ambas expresiones de mRNA.

óxido nítrico, pero lo ha hecho en endotelio de aorta. Como puede observarse en la figura 5, que recoge unos resultados muy preliminares, el mRNA de la enzima aumenta en función del tiempo de incubación con un sistema generador de radicales libres. La consecuencia de este efecto sería, evidentemente, un aumento en la producción celular de óxido nítrico.

La importancia conceptual de estos hallazgos es muy grande. Los prostanooides, el PAF y el óxido nítrico regulan múltiples aspectos de la función renal, incluyendo la propia función de las células residentes glomerulares, el grado de constricción/dilatación de las arteriolas aferente y eferente y el manejo tubular de iones. Teniendo en cuenta que todas las estructuras mencionadas se encuentran próximas al lugar de síntesis de estos mediadores, se comprende fácilmente que los MADO, induciendo variaciones en su tasa de producción, puedan modificar de forma marcada diversos aspectos de la función renal.

Comentarios finales

En consecuencia, y a la vista de las evidencias comentadas hasta el momento, se podría concluir que los MADO juegan un papel primordial en el desarrollo de ciertas patologías renales, agudas y crónicas. Un esquema tentativo de cómo podría ser su mecanismo general de acción se representa en la figura 6. Las vías del mesangio y el endotelio han sido exploradas con éxito, si bien son precisas muchas más evidencias experimentales para comprender el problema en toda su profundidad. El posible papel de los MADO en la regulación de la función del epitelio glomerular es mucho menos conocido y deberá ser estudiado en años venideros.



Fig. 6.—Esquema integrador del posible mecanismo de acción de los metabolitos activos derivados del oxígeno, en condiciones fisiopatológicas, a nivel glomerular.

Agradecimientos

Parte de los trabajos incluidos en este manuscrito fueron financiados por la CICYT (SAL89-0875; SAF93-0713). Susana López Ongil es becaria del CAM.

Bibliografía

1. Klebanoff SJ: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 93:480-489, 1980.
2. Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-161, 1994.
3. Paller MS, Hoidal JR y Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 74:1156-1164, 1984.
4. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG y Ward PS: Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest* 51:396-403, 1984.
5. Paller MS: Free radicals scavengers in mercuric chloride-induced acute renal failure in the rat. *J Lab Clin Med* 105:459-463, 1985.
6. Rehan A, Wiggins RC, Kunkel RG, Till GO y Johnson KJ: Glomerular injury and proteinuria in rats after intrarenal injection of cobra venom factor. *Am J Pathol* 123:57-66, 1986.

D. RODRIGUEZ PUYOL y cols.

7. Thakur V, Walker PD y Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria in rat. *Kidney Int* 34:494-499, 1988.
8. Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heymann nephritis in rat. *Am JPhysiol* 254:F337-F344, 1988.
9. Rahman M, Emancipator Sy Sedor J Hydroxyl radical scavengers ameliorate proteinuria in immune complex glomerulonephritis. *JLab Clin Invest* 112:619-626, 1988.
10. Johnson RJ Guggenheim SJ Klebanoff SJ Ochi RF, Wass A, Baker P, Schulze M y Couser WG: Morphologic correlates of glomerular oxidant injury induced by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system of the neutrophil. *Lab Invest* 5:294-301, 1988.
11. Yoshioka T e Ichikawa I: Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Am JPhysiol* 257:F53-F59, 1989.
12. Baliga R, Baliga M y Shah SV: Effect of selenium deficient diet in experimental glomerular disease. *Am JPhysiol* 263:F56-F61, 1992.
13. Nath KA y Salahudeen AK: Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *JClin Invest* 86:1179-1192, 1990.
14. Stratta P, Canavese C, Dogliani M, Mazzucco G, Monga G y Vercellone A: The role of free radicals in the progression of renal disease. *Am JKidney Dis* 27:33-37, 1991.
15. Johnson RJ Couser WG, Chi EY, Adler Sy Klebanoff SJ New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *JClin Invest* 79:1279-1387, 1987.
16. Shah SV: Light emission by isolated rat glomeruli in response to phorbol myristate acetate. *JLab Clin Med* 98:46-57, 1981.
17. Baud L, Hagege J Sraer J Rondeau E, Pérez Jy Ardaillou R: Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis is associated with stimulation of lipoygenase activity. *JExp Med* 158:1836-1852, 1983.
18. Baud L, Pérez Jy Ardaillou R: Dexamethasone and hydrogen peroxide production by mesangial cells during phagocytosis. *Am JPhysiol* 250:F596-F604, 1986.
19. Sedor JR, Carey SW y Emancipator SN: Immune complexes bind to cultured rat glomerular mesangial cells to stimulate superoxide release. Evidence for an Fc receptor. *JImmunol* 138:3751-3757, 1987.
20. Guidet BR y Shah SV: In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am JPhysiol* 256:F158-F164, 1989.
21. Radeke HH, Meier B, Topley N, Flöge J, Habermehl GG y Resch K: Interleukin 1 alfa and tumor necrosis factor alfa induced oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int* 37:767-775, 1990.
22. Rovin BH, Wurst Ey Kohan DE: Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in cultures. *Kidney Int* 37:1509-1514, 1990.
23. Schlondorff D: The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1:272-281, 1987.
24. Kreisberg J: Biology and biochemistry of the glomerular mesangium. *Min Electrol Metab* 14:167-175, 1988.
25. Michael AF y Kim Y: The glomerular mesangium. *Am JKidney Dis* 12:393-396, 1988.
26. Mene P, Smonson MS y Dunn MJ: Physiology of mesangial cells. *Physiol Rev* 69:1347-1424, 1989.
27. 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.
28. Duque I, Rodríguez-Puyol M, Ruiz P, 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 Ther* 267:612-616, 1993.
29. González-Rubio M, Voit S, Rodríguez-Puyol D, Weber M y Marx M: Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF alfa and beta receptor and pp60 c-src in rat mesangial cells. Aceptado para publicación en *Kidney Int*.
30. 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.
31. Adler S, Sthal RAK, Baker PJ, Chen YP, Pritzl PM y Couser WG: Biphasic effect of oxygen radicals on prostaglandin production by rat mesangial cells. *Am JPhysiol* 252:F743-F749, 1987.
32. Duque-Marín I, Arribas I, Díez-Marqués ML, Lucio-Cazaña FJ, Rodríguez-Puyol M y Rodríguez-Puyol D: A possible role for platelet-activating factor in the hydrogen peroxide-induced T x B2 and PGE2 glomerular synthesis. Aceptado para publicación en *JLipid Res*.