

NEFROTOXICIDAD: ANALISIS DE MECANISMOS BASICOS

Mecanismos básicos de nefrotoxicidad

L. Rivas-Cabañero, A. Rodríguez-Barbero, N. Eleno y J. M. López-Novoa

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

Introducción

El desarrollo de nuevos y potentes fármacos ha supuesto un avance importante en el tratamiento intrahospitalario de enfermedades hasta hace poco tiempo mortales. Sin embargo, algunos de estos tratamientos son causa de una elevada morbilidad por la toxicidad que producen. La consecuencia de la toxicidad renal de estos fármacos y de otros agentes tóxicos que pueden ser accidentalmente ingeridos (sales de metales pesados, hidrocarburos, toxinas vegetales o bacterianas) es la aparición de una insuficiencia o fallo renal agudo (FRA). En esta revisión analizaremos cómo los agentes tóxicos actúan sobre el riñón y sus mecanismos de acción a nivel celular. Las sustancias químicas utilizadas de forma habitual en el tratamiento médico son una de las causas más frecuentes de FRA en la actualidad.

Para poder entender mejor los mecanismos por los que la nefrotoxicidad conduce a un FRA hay que poner de manifiesto que el FRA es un síndrome multifactorial en el que se ponen de manifiesto factores vasculares/glomerulares y factores tubulares (fig. 1). Los efectos glomerulares de una sustancia nefrotóxica se manifiestan como una disminución del coeficiente de ultrafiltración (K_f) (que puede estar provocado por alteraciones en la permeabilidad hidráulica de la barrera de filtración o por la activación de contracción y proliferación de las células mesangiales intraglomerulares). Las nefrotoxinas actúan sobre los vasos sanguíneos produciendo una disminución del flujo sanguíneo renal (FSR). En el túbulo, la nefrotoxina provoca necrosis celular por distintos mecanismos que se desarrollarán más adelante, conduciendo a una obstrucción tubular y a un «backleak» o esca-

pe del líquido desde la luz tubular. La disminución del FSR y la obstrucción tubular tienen un efecto negativo sobre el gradiente de presión hidrostática en el glomérulo. El descenso de la presión efectiva de ultrafiltración, la disminución del K_f y el «backleak» del líquido tubular producen como resultado final una disminución en la tasa de filtración glomerular (FG). Los fármacos nefrotóxicos más importantes (antibióticos aminoglucósidos, cisplatino y ciclosporina) ejercen sus efectos fundamentalmente en el túbulo proximal.

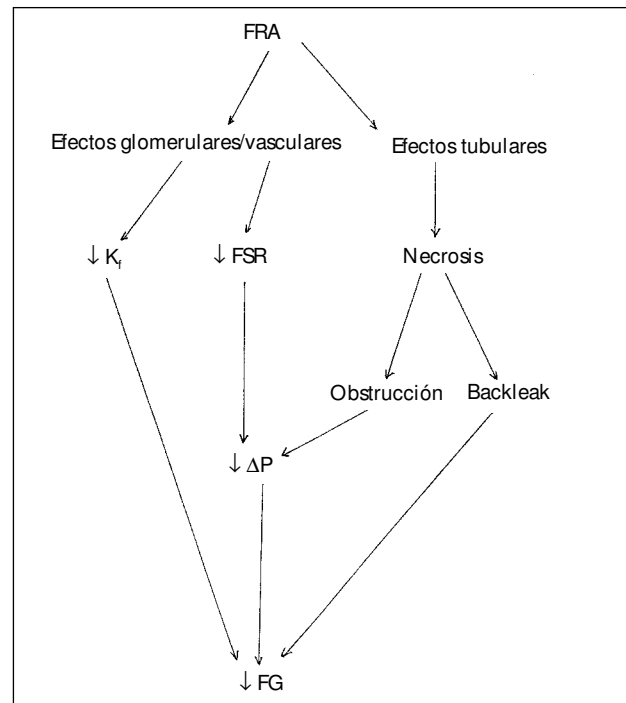


Fig. 1.—Mecanismos que conducen a la disminución del filtrado glomerular durante el daño renal. Abreviaturas: K_f : Coeficiente de ultrafiltración; FSR: Flujo sanguíneo renal; P: Presión neta de ultrafiltración; FG: Tasa de filtración glomerular.

Correspondencia: Prof. José M. López-Novoa.
Departamento de Fisiología y Farmacología,
Edificio Departamental, Campus Miguel de Unamuno.
Universidad de Salamanca.
Avenida Campo Charro, s/n.
37007 Salamanca (España).

La actividad terapéutica o tóxica de un fármaco depende de la dosis, de la pauta de administración y de otros parámetros farmacocinéticos que determi-

nan la concentración del principio activo en el tejido diana. Otro de los factores que pueden determinar la acción tóxica de un fármaco es la susceptibilidad relativa de las células, que puede aumentar cuando se encuentran expuestas a determinadas condiciones fisiopatológicas o patológicas, como, por ejemplo, la isquemia. El riñón es particularmente vulnerable a la acción de fármacos y toxinas, ya que es el órgano que recibe mayor irrigación por gramo de tejido y es la principal vía de eliminación de fármacos y de sus metabolitos. Distintos segmentos de la nefrona pueden estar expuestos a los efectos de un fármaco o de sus metabolitos, dependiendo de los diferentes mecanismos que median su eliminación. Ciertos fármacos se secretan en las células del túbulo proximal a través del sistema transportador de cationes orgánicos, y otros se absorben activamente en estas mismas células. En consecuencia, estas células están expuestas a concentraciones elevadas de agentes potencialmente tóxicos. Además, se pueden alcanzar concentraciones mucho más elevadas de los agentes tóxicos en la luz tubular de la nefrona que en la sangre por la capacidad del riñón para concentrar la orina. Hay ocasiones en que la absorción fraccional de agua excede a la del fármaco, lo que provoca un aumento en la concentración luminal del mismo.

La entrada del fármaco en la célula y su transformación en metabolitos activos se facilita por mecanismos como el transporte iónico y el metabolismo de la célula renal. En ocasiones, el efecto tóxico de un fármaco deriva de que durante el proceso de excreción renal éste sufre la transformación en un metabolito activo por una amplia variedad de enzimas que catalizan dos tipos de reacciones^{1,2}. Las reacciones de fase I (oxidaciones, reducciones e hidrólisis) generan productos altamente reactivos y potencialmente tóxicos. Estas reacciones suelen encontrarse acopladas a reacciones de fase II (sintéticas y de conjugación), dando lugar a productos muy polares y biológicamente inactivos que pueden ser excretados fácilmente a través de la orina. El mecanismo óptimo para la protección celular frente a las reacciones de fase I es que las células posean los dos sistemas metabólicos, lo que no ocurre en los diversos tipos celulares del riñón. Este perfil metabólico heterogéneo explica la susceptibilidad de ciertas áreas del riñón al daño producido por diversas sustancias tóxicas. Las sustancias tóxicas que se activan por enzimas de fase I afectan preferentemente al segmento S₃ del túbulo renal, que es rico en este tipo de enzimas³.

En resumen, el que una célula renal sea especialmente vulnerable a la acción de una nefrotoxina depende de si la célula renal es diana para la acción del fármaco, el fármaco se biotransforma en las células renales, el fármaco se concentra en la orina, se

capta y se acumula en estas células renales, existen procesos concomitantes que aumenten la susceptibilidad de estas células renales (por ejemplo, la isquemia que se pone de manifiesto en tratamientos con aminoglucósidos).

Mecanismos celulares de nefrotoxicidad

Una sustancia nefrotóxica puede ejercer su efecto sobre la célula renal bien de forma directa (por unión a la membrana plasmática o captación celular), bien de forma indirecta (por liberación de mediadores vasoactivos y producción de isquemia). La citotoxicidad directa es la causa más común de nefrotoxicidad, aunque la isquemia concomitante es capaz de agravar el efecto tóxico renal de una determinada sustancia.

Efecto tóxico directo sobre las células renales

Las sustancias nefrotóxicas pueden interactuar con los componentes de la membrana plasmática o pueden ser captadas por las células renales, ejerciendo así sus acciones tóxicas a nivel intracelular⁴.

Algunas nefrotoxinas producen el daño celular interactuando con la membrana de la célula tubular, mientras que otras, como la ciclosporina de carácter hidrofóbico, se une a los lípidos de membrana sin aparentes efectos adversos^{5,6}. El daño celular se manifiesta en alteraciones morfológicas y funcionales de las células renales.

Cuando un tóxico interactúa con los componentes de la membrana plasmática de las células renales altera tanto la permeabilidad de la membrana como la actividad de sus sistemas de transporte. Esto provoca cambios en la concentración citosólica de iones y otras sustancias que discutiremos más adelante. La unión del tóxico a las membranas también puede originar la activación de las enzimas asociadas a ellas. Así, podríamos destacar:

- La fosfolipasa A₂, cuya activación induce las síntesis de eicosanoides y de factor activador de las plaquetas (PAF)⁷.
- La fosfolipasa C, que induce la liberación de inositol trifosfato (IP₃) y de diacilglicerol (DAG) a partir de PIP₂.
- La fosfolipasa D, que favorece la liberación de DAG.

Los aumentos intracelulares de IP₃ activan la salida de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, aumentando de esta forma los niveles de Ca²⁺ citosólico libre. El

DAG estimula a la proteína kinasa C (PKC), que es capaz de activar enzimas celulares por fosforilación. En ambos casos se produce una activación celular que, si no tiene un adecuado soporte energético (ATP), puede tener efectos deletéreos para la célula.

Como ya hemos señalado anteriormente, las nefrotoxinas pueden ejercer su acción al ser captadas por las células. Si esto ocurre se ponen de manifiesto efectos sobre la función lisosomal y mitocondrial.

Procesos lisosomales. Los lisosomas sirven de lugar de almacenamiento para diversas sustancias. Así, los aminoglucósidos se unen a la membrana apical de las células del túbulo proximal por interacciones de carga y se transportan a través de ella por pinocitosis concentrándose en los lisosomas⁸. Algunas nefrotoxinas, entre ellas los aminoglucósidos, modifican las propiedades biofísicas de los lisosomas: se altera la permeabilidad de su membrana y se estimula la agregación de membranas⁹. Esto ocasiona la liberación de las enzimas lisosomales¹⁰, produciéndose fosfolipidosis, destrucción del lisosoma y subsecuentemente necrosis celular. Estudios de autorradiografía han demostrado la presencia de aminoglucósidos en vacuolas intracelulares próximas a la membrana tras la administración del antibiótico⁸. También se ha observado la formación de cuerpos mieloides osmiofílicos multilamelares, aunque aparentemente no son tóxicos¹⁰. Otros fármacos catiónicos, como cloroquina, antidepresivos tricíclicos y clorpromazina, pueden producir cambios morfológicos similares, pero sin nefrotoxicidad aparente. Por lo tanto, estos cambios pueden no estar relacionados con el daño celular, representando la activación de mecanismos normales de fagocitosis celular¹¹.

Procesos mitocondriales. La mitocondria de la célula tubular renal es el lugar de acción de muchas nefrotoxinas¹². Estas interfieren con la fosforilación oxidativa y la consiguiente producción de ATP, alterando las funciones de transporte celular dependientes del mismo y produciendo muerte celular. Existen evidencias de necrosis celular tras depleción de ATP en modelos experimentales de nefrotoxicidad por cloruro de mercurio, gentamicina y cisplatino¹³.

Otro posible mecanismo de nefrotoxicidad es la formación de metabolitos intracelulares altamente reactivos, como son los radicales libres de oxígeno, cuyas implicaciones biológicas han sido ya descritas^{14, 15}. Los radicales libres formados durante las reacciones oxidativas por oxidasas asociadas al citocromo P-450 y las xantino oxidasas (radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno) pueden generar moléculas muy inestables a partir de fármacos y pueden

reaccionar químicamente con macromoléculas celulares como proteínas y ácidos nucleicos, produciendo daño celular por modificaciones covalentes¹⁶. Así, el metabolismo del ácido araquidónico por ciclooxigenasas o hidropoxidadas pueden co-oxidar fármacos como el acetaminofeno, produciendo radicales libres en la médula renal¹⁷; este proceso puede jugar un importante papel en la nefropatía por analgésicos. Existen diversos mecanismos a nivel intracelular cuya función es disminuir los efectos adversos de estos radicales libres. Así, las enzimas superóxido dismutasa y catalasa aumentan la conversión del radical superóxido en agua y oxígeno molecular, y la glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno. Es difícil establecer si la producción de radicales libres y la disminución de su eliminación por el riñón es causa o efecto del daño celular. Se han encontrado evidencias del papel de estos radicales en la nefrotoxicidad por acetaminofeno¹⁸ y cefalosporinas¹⁹, mientras que en la nefrotoxicidad por aminoglucósidos, cisplatino o ciclosporina es más incierto. En cualquier caso, el papel concreto de los radicales libres en este fenómeno se detalla extensamente en otro artículo de este número.

Papel del calcio en la toxicidad celular

Existe un gradiente de calcio entre el interior y el exterior celular que se mantiene por la baja permeabilidad al calcio de la membrana plasmática en condiciones basales. Los agentes nefrotóxicos inducen un aumento del calcio citosólico libre ($[Ca^{2+}]_c$) por dos mecanismos fundamentales: inducen un aumento de la permeabilidad de la membrana al mismo y disminuyen tanto la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico como el bombeo de calcio al exterior, al haber una disminución del ATP celular. Ambos procesos están mediados por la $Ca^{2+}/ATPasa$.

Los niveles aumentados de calcio intracelular ponen en marcha mecanismos de extrusión de calcio dependientes de energía²⁰ como la $Ca^{2+}/ATPasa$ del sarcolema, procesos mitocondriales de captación de calcio y activación de proteínas contráctiles. Todos estos mecanismos deplecionan a la célula de ATP. Es bien conocido que el calcio regula muchas funciones celulares²¹. Se ha sugerido que un aumento no fisiológico en el $[Ca^{2+}]_c$ es causa primaria de daño celular irreversible. Un aumento en $[Ca^{2+}]_c$ se asocia con daño celular debido a toxinas que actúan sobre la membrana²². La captación de calcio por la mitocondria produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa²³. El aumento en $[Ca^{2+}]_c$ activa diversas fosfolipasas de la membrana mitocondrial²⁴ y plasmática. La activación de las fosfolipasas de la membrana plasmática provoca cambios en los fosfolípidos de

membrana, alterando la actividad enzimática de la membrana²⁵ y la permeabilidad. Este daño se ve agravado porque la actividad de las fosfolipasas también aumenta la producción y liberación de ácidos grasos y de lisofosfolípidos, que tienen actividad detergente y desnaturalizan las membranas. Además, los ácidos grasos liberados producen otros efectos como el desacoplamiento de la fosforilación en la membrana mitocondrial, inhibición de la Na⁺/K⁺-ATPasa de la membrana plasmática e inhibición de la Ca²⁺/ATPasa del retículo sarcoplásmico. Además, los ácidos grasos poliinsaturados se pueden peroxidar, dando lugar a peróxidos lipídicos tóxicos, y el ácido araquidónico liberado se metaboliza por la vía de la lipo y ciclooxigenasa, liberando sustancias que aumentan el tono vascular y, por tanto, producen isquemia que incrementa la susceptibilidad celular al daño producido por el tóxico.

La activación de la fosfolipasa A₂ de las membranas mitocondriales, entre otras cosas, degrada cardiolipinas, que constituyen la subunidad catalítica de enzimas importantes, como la citocromo oxidasa²⁶, ATP sintetasa²⁷ y la translocasa de nucleótidos de adenina²⁸. Estas enzimas son vitales para la célula y la falta de ellas es causa de muerte celular. La activación de la fosfolipasa C estimula la degradación de lecitina; esto inhibe el complejo succinato deshidrogenasa²⁹.

El aumento de los niveles de [Ca²⁺]_c produce además otros efectos, como la activación de gelsoína, que disuelve la red de actina o la activación del complejo calcio-calmodulina³¹ que favorece la desagregación de microtúbulos. El calcio, además, potencia el daño inducido por los radicales libres, de los que hemos hablado con amplitud anteriormente.

En resumen, los efectos celulares de los agentes nefrotóxicos se recogen en la figura 2.

Nefrotoxicidad indirecta

Ya hemos comentado anteriormente que en muchos casos una parte sustancial del efecto tóxico renal de muchas sustancias se debe a que inducen también una reducción notable del FSR. En la mayor parte de los casos en que esto ocurre, el efecto del tóxico no es directo sobre el músculo liso vascular, sino que está mediado por la liberación de factores vasoconstrictores (PAF, Ang II, endotelina) o por la inhibición de factores vasodilatadores (NO). Con respecto a la liberación de factores vasoconstrictores, la liberación de endotelina parece mediar las alteraciones renales que ocurren tras la administración de ciclosporina³¹ o tras la isquemia renal. La estimulación de la síntesis y liberación de PAF también se ha relacionado con la nefrotoxicidad inducida por ciclospo-

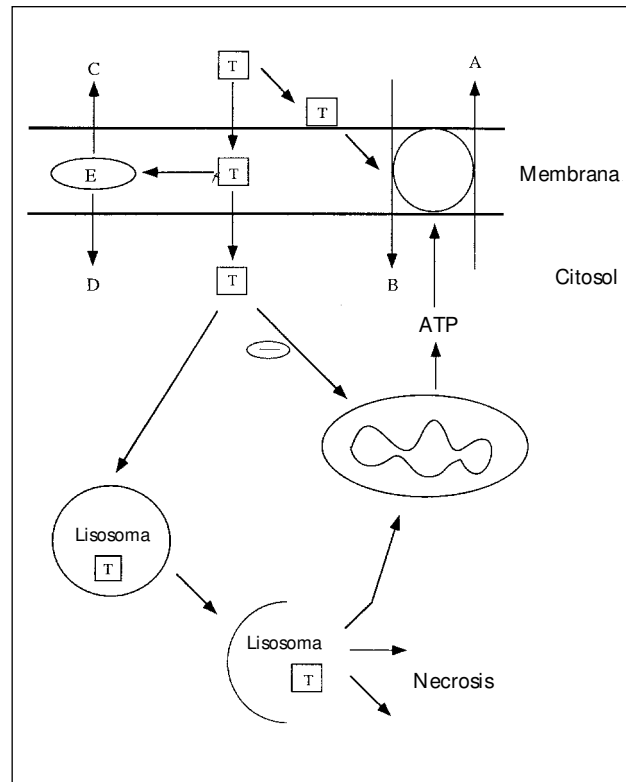


Fig. 2.—Mecanismos de acción intracelulares de un agente nefrotóxico. Abreviaturas: T: Agente nefrotóxico; E: Enzima de membrana; A, B: Sustratos transportados; C, D: Productos de actividad enzimática.

rina³², gentamicina^{33, 34} y cisplatino³⁴, mientras que la angiotensina II se ha involucrado en la reducción del FG inducido por la gentamicina³⁵.

Otra de las posibilidades de que un agente produzca efecto nefrotóxico es que disminuya la producción de NO. Esto se ha demostrado en modelos de nefrotoxicidad inducida por contrastes iodados³⁶. Sin embargo, datos de nuestro laboratorio han demostrado una producción glomerular aumentada de NO en ratas tratadas con gentamicina^{37, 38}. Además, cuando se administra L-NAME (un inhibidor de la síntesis de NO) en el agua de bebida a ratas tratadas con gentamicina, se observa mayor daño de la función renal que en las ratas que reciben solamente gentamicina³⁸. Estos resultados sugieren que el NO, cuya síntesis está estimulada por la gentamicina, podría tener la función de proteger al riñón de la vasoconstricción e isquemia que induce este agente nefrotóxico.

Bibliografía

1. Anders MW: Metabolism of drugs by the kidney. *Kidney Int* 18:636-647, 1980.

L. RIVASy cols.

2. Tarloff JB, Goldstein RS y Hook JB: Xenobiotic metabolism in the mammalian kidney. En *Nephrotoxicity in the Experimental and Clinical Situation. Part 1*, edited by Bach PH, Lock EA. London, 1987. Martinus Nijhoff, pp. 371-404.
3. Rush GF, Smith JH, Newton F y Hook JB: Chemically induced nephrotoxicity. Role of metabolic activation. *CRC Crit Rev Toxicol* 13:99, 1984.
4. Coggins CH y Fang LST: Acute renal failure associated with antibiotics, anesthetic agents and radiographic contrast agents. En: *Acute renal failure*. Ed. BM Brenner and JM Lazarus, Churchill Livingstone, 1988, pp. 295-352.
5. Clejan S y Bittman R: Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *JBiol Chem* 260:2884, 1985.
6. Jackson NM, Hsu C, Visscher GE y cols.: Alterations in renal structure and function in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *JPharmacol Exp Ther* 242:749, 1987.
7. De Winter JM, Vianen GM y Van Den Bosch H: Purification of rat liver mitochondrial phospholipase A₂. *Biochem Biophys Acta* 712:332-341, 1982.
8. Morin JD, Viotte G, Vandewalle A y cols.: Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach. *Kidney Int* 18:583, 1980.
9. De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten GA y cols.: Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 25:643, 1984.
10. Kaloyanides GJ y Pastoriza-Muñoz E: Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 18:571-582, 1980.
11. Lullman H, Lullman-Rauch R y Wassermann O: Drug induced phospholipidosis. *C. R. C. Crit Rev Toxicol* 4:185, 1975.
12. Rosa RM y Brown RS: Acute renal failure associated with heavy metals and organic solvents. En *Acute renal failure*. Ed. BM Brenner and JM Lazarus, Churchill Livingstone, 1988, pp. 353-369.
13. Humes HD y Weinberg JM: Alterations in renal tubular cell metabolism in acute renal failure. *Miner Electrol Metab* 9:290-305, 1983.
14. Halliwell B y Gutteridge JM: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14, 1984.
15. Salter TF: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15, 1984.
16. Gutteridge JM: The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalyzed by iron salts. *FEBS Lett* 150:454, 1984.
17. Zenser TV y Davis BB: Enzyme systems involved in the formation of reactive metabolites in the renal medulla: Co-oxidation via prostaglandin H synthetase. *Fund Appl Toxicol* 4:922, 1984.
18. Mohandes J, Duggin GG, Horvath JS y Tiller DJ: Metabolic oxidation of acetaminophen mediated by cytochrome P-450 mixed function oxidase and prostaglandin endoperoxide synthetase in rabbit kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 61:252, 1981.
19. Kuo CH, Maita K, Seight SD y Hook JB: Lipid peroxidation: A possible mechanism of cephaloridine-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 67:78, 1983.
20. Schatzman HJ: ATP-dependent Ca²⁺-extrusion from human red cells. *Experientia* 22:364-365, 1966.
21. Campbell AK: *Intracellular calcium: its universal role as regulator*. New York, John Wiley and Sons, 1983.
22. Cheung JY, Bonventre J, Malis CD y Leaf A: Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 314:1670-1676, 1986.
23. Rossi CS y Lehninger AL: Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca²⁺ and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *JBiol Chem* 239:3971-3980, 1964.
24. Chien KR, Abrams J, Serroni A y cols.: Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *JBiol Chem* 253:4809-4817, 1978.
25. Coleman R: Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochem Biophys Acta* 300:1-30, 1973.
26. Fry M y Green DE: Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *JBiol Chem* 256:1874-1880, 1981.
27. Agarwal N y Kalra VK: Purification and functional properties of the DCCD-reactive proteolipid subunit of the H⁺-translocating ATPase from Mycobacterium flihei. *Biochem Biophys Acta* 723:150-159, 1983.
28. Beyer K y Klingenberg M: ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 24:3821-3826, 1985.
29. Awasthi Y, Ruzicka FJ, Crane FL: The relationship between phospholipase action and liberation of NADH dehydrogenase from mitochondrial membrane. *Biochem Biophys Acta* 206:233-248, 1970.
30. Weisenberg RC: Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177:1104-1105, 1972.
31. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harview BR, Ichikawa I y Hoover RL: Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 37:1487, 1990.
32. Rodríguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, López-Farré A, Ortega G, Hernando L y López-Novoa JM: Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 35:632-637, 1989.
33. Rodríguez-Barbero A, Bosque E, Rivas-Cabañero L, Arévalo M y López-Novoa JM: Effect of platelet activating factor antagonist on gentamicin nephrotoxicity. *Mediat Inflamm* 1:23-26, 1992.
34. Pavao dos Santos OF, Boim M, Barros EJJ y Schor N: Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 40:742-747, 1991.
35. Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL y Brenner BM: Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 19:288-296, 1981.
36. Schwartz D, Blum M, Peer G, Wollman Y, Maree A, Serban I, Grosskopf I, Cabili S, Levo Y y Iaina A: Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 267:F374-F379, 1994.
37. Rivas-Cabañero L, Montero A y López-Novoa JM: Glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol* 270:119-121, 1994.
38. Rivas-Cabañero L, Rodríguez-Barbero A, Arévalo M y López-Novoa JM: Effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron* (en prensa).