

# Estrés Oxidativo y Fisiopatología Renal: de la investigación básica al diagnóstico y/o pronóstico

**Dr. Walter Manucha**  
**Docente Investigador**  
**Facultad de Ciencias Médicas. Univ Nacional de Cuyo**  
**Investigador Asistente IMBECU - CONICET**  
**wmanucha@fcm.uncu.edu.ar**

## Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

En la actualidad, se reconoce la participación del estrés oxidativo en numerosos eventos fisiológicos y patológicos. El estrés oxidativo se presenta como resultado de un cambio en el balance entre los oxidantes y los antioxidantes, ya sea por exceso de oxidantes o por depleción de antioxidantes. La oxidación "se define como la remoción o pérdida de electrones, y la reducción como la ganancia de éstos".

Un antioxidante puede ser definido como "cualquier sustancia que, aún encontrándose en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, detiene o inhibe de manera significativa la oxidación del sustrato". Entonces, el efecto fisiológico de los antioxidantes es principalmente prevenir el daño celular causado por el incremento de los radicales libres, producto de varias reacciones químicas de oxidación. La evidencia sostiene que la producción de radicales libres lleva a un estrés oxidativo y que éste juega un papel importante en la fisiopatología de enfermedades comunes como la arterosclerosis, el fallo renal crónico y la diabetes.

Un radical libre es cualquier molécula autónoma que posea uno o más electrones desapareados en su órbita atómica (Halliwell y col., 1984). Por ello posee gran tendencia a interactuar con electrones de otras moléculas para formar el par, dejando a esa molécula desapareada en su último orbital, convirtiéndola en radical libre. Así se genera una peligrosa reacción en cadena que puede llevar a la reacción en forma inespecífica con distintos componentes celulares, ocasionando daños tisulares e incluso la muerte celular.

Muchos radicales son altamente reactivos y pueden ceder o aceptar con facilidad electrones de otras moléculas, por lo tanto, pueden participar tanto en reacciones de oxidación como de reducción. Pueden estar cargados positiva o negativamente o ser eléctricamente neutros.

Como consecuencia de su gran actividad, muchos radicales libres tienen una vida media muy corta (10-6

segundos o menos) en los sistemas biológicos. A partir del metabolismo celular normal se generan concentraciones muy bajas de radicales libres, los que además de inactivarse inmediatamente, tienen un radio de acción muy limitado. Por el contrario, cuando son generados en el proceso inflamatorio, sus concentraciones son altas, aumentando la probabilidad de inducir una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces. Tal es el caso de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, que aunque el radical libre inicial produce sólo efectos locales, el radical secundario y los productos de degradación oxidativa producen efectos a distancia del sitio de formación del primer radical.

Las principales especies reactivas del oxígeno (ERO) son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (HO), el ión peróxido ( $O_2^{2-}$ ), los radicales peroxilo (ROO) y el oxígeno singulete ( $1O_2$ ).

La adrenalina, los núcleos flavinas, los compuestos tioles (tioalcoholes) y la glucosa se pueden oxidar en presencia de oxígeno para producir superóxido. Estas reacciones se pueden acelerar por la presencia de metales como el hierro o cobre. La cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria realiza la reducción de oxígeno en agua. Durante este proceso se generan radicales libres que actúan sobre la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, hay un constante escape de unos pocos electrones dentro de la matriz mitocondrial y su resultado es la formación de superóxido.

La actividad de otras enzimas como la p450 citocromo oxidasa en el hígado o las que intervienen en la producción de las hormonas en la glándula suprarrenal, también facilitan el escape de unos pocos electrones en el citoplasma circundante que lleva a la formación de superóxido. La gran producción de  $O_2^-$  por el endotelio vascular neutraliza al óxido nítrico, mientras que la producción de  $O_2^-$  por otras células regula el crecimiento y diferenciación celular y la actividad metabólica de los fagocitos durante la cadena respiratoria.

Cualquier sistema biológico genera superóxido y también produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como resultado de una reacción espontánea de dismutación. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, pero por lo general es incluido dentro de las ERO. Su mayor habilidad consiste en cruzar la membrana celular libremente, lo cual no puede efectuar el  $O_2^-$ , y difundir a considerable distancia antes de descomponerse en radical hidroxilo, altamente



reactivo, que causa en la célula y en el espacio intercelular los efectos tóxicos propios del peróxido de hidrógeno. Se postula que todas las especies reactivas de oxígeno causan sus efectos patológicos al aumentar la formación del radical hidroxilo. La producción de radicales hidroxilo ocurre de manera constante y permanente en las células vivas que tienen moléculas de azúcar, aminoácidos, lípidos y nucleótidos.

En especial, en macrófagos se ha descrito que la activación de la ruta de las ERO requiere de un ligando (bacteriano) o de complejos Ag-Ac y quimiotácticos, entre otros, lo cual se traduce en la activación de receptores de la membrana plasmática, acoplados a proteína G y estimulación de fosfolipasa C (PLC) con la consiguiente liberación de IP3 y DAG, involucrados en la elevación de Ca<sup>2+</sup> intracito-plasmático.

En particular, durante el estallido oxidativo, el DAG induce la traslocación de proteinquinasa C desde el citosol a la membrana plasmática para fosforilar proteínas del sistema oxidasa, tal es el caso de NADPH-oxidasa. Por otro lado, el Ca<sup>2+</sup> permite el ensamblaje de microtúbulos y la activación del sistema actina/miosina para la secreción de gránulos y motilidad.

Asociado al aumento del consumo de O<sub>2</sub> se produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> que debido a su inestabilidad reacciona en dos sentidos básicos: por un lado, la citocromo C lo transforma en singulete para estabilizarse finalmente en O<sub>2</sub> molecular y luz, y por otro, una vía mediada por superóxido dismutasa (SOD) genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta última, progresa hacia la producción de H<sub>2</sub>O por la glutatión reductasa (GR), o bien genera radical hidroxilo en presencia de hierro (Fe<sup>2+</sup>).

Otro de los efectos de los compuestos halogenados consiste en la formación de mono y dihidroaminas que oxidan residuos de cisteína, metionina, triptófano y tirosina, produciendo daños irreversibles en proteínas estructurales y en los sistemas de comunicación celular debido a que la mayor parte de los receptores transmiten información gracias a la fosforilación de residuos de tirosina.

En resumen, la formación de radicales hidroxilo puede ocurrir por varias vías pero, el mecanismo in vivo más importante, es por la descomposición de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción catalizada por metales como el hierro y el cobre. Esta secuencia de eventos es conocida con el nombre de Reacción de Haber-Weiss.

Además, en sistemas biológicos también encontramos a las denominadas especies reactivas del nitrógeno. Para abordar este aspecto, cabe aclarar que el óxido nítrico (ON), es su principal exponente.

La activación de la ONSe tiene como función mantener niveles de ON que garanticen las propiedades vasodilatadoras y antiagregantes requeridas para una buena función hemodinámica. La activación de esta enzima se incrementa por el aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico y presencia

de calmodulina al producirse mecanoactivación de canales de Ca<sup>2+</sup> con el flujo pulsátil de la sangre.

Cuando la célula endotelial es sometida al influjo de citoquinas proinflamatorias o a la exposición a LDL oxidada, se deprime de manera sensible la expresión del gen de la ONSe y la vida media de su ARNm, aumentando la actividad de la ciclooxigenasa (COX1) y llevando a disminución en la producción de ON por vía constitutiva.

Por otro lado, gracias a citoquinas y productos microbianos (FNT $\alpha$ , IFN $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ , LPS) se induce la ONSi en los macrófagos libres y residentes; igualmente lo realizan agentes no microbianos / no citoquina, como el ozono y asbesto, que también participan en la expresión de la enzima inducible.

El gen de la enzima ONSi consta de un promotor con una secuencia de "TATA-box" y regiones para unión de factores de transcripción (NF-k $\beta$ ), para elementos de respuesta relacionada con LPS (IL6-NF-kB) y para elementos de respuesta para INF $\alpha$ , LPS y para unión del factor regulatorio de INF $\alpha$ .

Asimismo, se han descrito otras vías de generación de ON, como es el caso de la vía no enzimática, a partir de L-arginina o D-arginina, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como respuesta del organismo al estrés oxidativo generado, por ejemplo, en los procesos inflamatorios; también la producción no enzimática a partir de reducción de nitritos, que se activa en situaciones de hipoxia por efectos catalíticos del pH ácido.

Todo lo expuesto se traduce en la formación de grandes cantidades de ON por tiempo prolongado, lo cual confiere al gas actividad citotóxica y citostática contra virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y células tumorales. Las acciones antimicrobianas y citotóxicas del ON son igualmente potenciadas por otros productos del macrófago como glutatión, cisteína, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Aunque la elevada producción de ON inicialmente está orientada a la protección contra la infección, el efecto supresivo en la proliferación de linfocitos y el daño a la célula huésped confieren al ON una función dual protectora / destructiva.

La consecuencia inmediata de la producción incontrolada de ON es la activación de ERO. Los radicales libres de nitrógeno junto con los de oxígeno generan en última instancia disfunción endotelial.

El ON como radical inestable tiene numerosas alternativas de reacción, de las cuales podemos considerar las siguientes: reacciona con el radical superóxido para formar el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual puede reaccionar en cadena para oxidar grupos sulfhidrilo de proteínas, lípidos y ADN y atacar la glutamina sintetasa para impedir la formación de glutamina. Finalmente, se transforma en ácido peroxinitroso contribuyendo así a la disminución del pH. Como producto intermediario de esta vía, se genera radical hidroxilo. Por esta vía se activa además la COX1 la cual induce la formación de radicales libres.

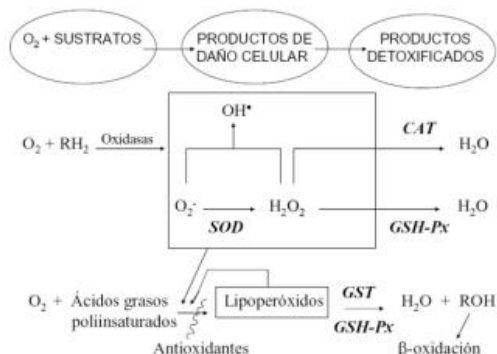
Por reacción con el oxígeno molecular, el ON produce NO<sub>2</sub>, el cual se transforma a N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y éste a sus productos finales inactivos NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Por reacción con el Na<sup>+</sup> se forma NaNO<sub>2</sub> que se disocia a HNO<sub>2</sub>, el cual contribuye a la acidificación del medio, siendo tóxico para las bacterias. Reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando GSH (peroxiglutación), libera Fe<sup>+2</sup> de las bacterias y contribuye al rompimiento de las cadenas de ADN, ocasionando la muerte de los microorganismos.

El ON también reacciona con radicales libres lipídicos para producir peroxinitrito lipídico. Induce la formación de nitrosotioles como s-nitrosoglutación y s-nitrosocisteína, potentes bacteriostáticos, bactericidas y parasiticidas. Bloquea intermediarios del ciclo de Krebs, lo cual disminuye los niveles de ATP disponibles. Bloquea a la ribonucleótido reductasa interrumpiendo la síntesis de ADN y de proteínas tardías en el ciclo celular por falta de desoxiribonucleótidos, impidiendo la replicación viral y la síntesis de factores de virulencia, entre otros.

Las diferentes posibilidades de reacción del ON están orientadas inicialmente a destruir los microorganismos, sin embargo también los efectos en cadena se extienden a células vecinas como es el caso del endotelio vascular, donde contribuyen en la generación de una serie de alteraciones que denominamos: disfunción endotelial.

Por otro lado, se encuentra un complejo sistema de defensa antioxidante que metaboliza y detoxifica de las ERO y que comprende a enzimas antioxidantes y a agentes antioxidantes no enzimáticos. Los antioxidantes intracelulares enzimáticos incluyen a la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, enzimas que proveen la línea primaria de protección celular frente al daño oxidativo barriendo directamente las ERO, regulando en particular la vía de peroxidación de lípidos. (Figura 1)

Figura 1  
Acción de los Sistemas de Defensa Antioxidante sobre las ERO originadas en el Metabolismo Oxidativo



La superóxido dismutasa comprende un grupo de metaloproteinasas que catalizan la destrucción del O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Elas existen como enzimas contenedoras de cobre y zinc (Cu-ZnSOD), fundamentalmente en el citoplasma y sensibles a altas concentraciones de cianuro, y como proteínas contenedoras de manganeso (MnSOD), principalmente localizadas en la matriz mitocondrial (McCord y col., 1969). Se encuentran distribuidas en todos los tejidos, excepto MnSOD que no está presente en los eritrocitos.

La catalasa reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua, a través de una glutatión peroxidasa contenedora de selenio que protege a la célula tanto del peróxido de hidrógeno como de los hidroperóxidos lipídicos. Se encuentra presente en casi todas las células de mamíferos. Se localiza en organelas subcelulares, como los peroxisomas, y también en el citosol. (Chance y col., 1979).

La glutatión peroxidasa (GSH-Px) se presenta en cuatro formas selenio dependientes, cuyos sustratos son el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos: GSH-Px1 en eritrocitos, GSH-Px2 gastrointestinal, GSH-Px3 plasmática o extracelular y GSH-Px4 con alta afinidad para los hidroperóxidos de fosfolípidos de membrana (Wu y col., 1998). Se ha descrito otra que no contiene Se y que metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgánicos. El esquema de la Figura 1, resume las interrelaciones entre el metabolismo oxidativo, las ERO y los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos.

El sistema antioxidante no enzimático incluye a las vitaminas A, E, C y K, los compuestos sulfidrilos como el glutatión reducido (GSH), las metalotioneínas y metales como el selenio, entre otros. Los mismos proveen una importante protección a las membranas celulares de la peroxidación de lípidos inducida por los radicales libres actuando directamente como barreiros de las ERO. El  $\alpha$ -tocoferol es el mayor antioxidante no enzimático presente en la región lipofílica de la membrana celular. Las metalotioneínas son pequeñas metaloproteínas (aproximadamente de 6 kDa) que contienen en su configuración un tercio de residuos de cisteína. Poseen un tiempo de vida medio de 4 a 6 días, por lo tanto, están sometidas a un control dinámico de su síntesis y degradación en los tejidos animales. Han sido identificadas tres isoformas (MT I, II y III) que se expresan en todas las etapas del desarrollo en ratón y son reguladas por metales, glucocorticoides y estrés inflamatorio. Entre sus funciones figura el transporte, almacenamiento y detoxificación de metales y la protección contra su vía principal de toxicidad, el estrés oxidativo (Palmiter y col., 1998).

Por lo común, la alteración metabólica y/o celular es el proceso que sobreviene luego de que son producidas cantidades importantes de radicales libres y sobrepasan los mecanismos de defensa citados, o que éstos se encuentran disminuidos o anulados.

### Estrés oxidativo y la Fibrosis tubulointersticial

Todas las células que conforman la estructura renal, tanto a nivel vascular (endoteliales y musculares



lisas) como a nivel glomerular (endoteliales y mesangiales) o tubular (proximal, distal y colector), son capaces de producir y liberar ERO ante determinados estímulos como ciertos fármacos, hipertensión aguda, radiación, presión de oxígeno elevada e hipoxia, entre otros.

También las células circulantes infiltrantes (granulocitos, monocitos-macrófagos y plaquetas) que están presentes en numerosos procesos inflamatorios renales (glomerulonefritis, vasculitis, pielonefritis), son capaces de producir grandes cantidades de ERO, siendo imposible separar el papel de ellas, del papel de las ERO producidas por las células residentes, a la hora de evaluar su acción en la patología renal (Stratta y col., 1991).

Los estímulos que favorecen la producción de ERO en los neutrófilos son: bacterias, inmunocomplejos, la fracción C5 del complemento, el factor activador de las plaquetas (PAF), y la interleukina-1, entre otros. En los macrófagos, así como en los neutrófilos, la proteína de Tamm-Horsfall puede lograr la liberación de ERO. En las plaquetas, la producción de ERO puede producirse durante el metabolismo del ácido araquidónico y aquellos estímulos que disparan este metabolismo también favorecen su producción.

Los mecanismos a través de los cuales las ERO pueden contribuir a la progresión de la enfermedad renal son variados. Hemodinámicamente, al dañar las propiedades características del glomérulo, induciendo respuestas de crecimiento incoordinado y aberrante. También, al inducir la pérdida del fenotipo celular y la apoptosis. Promoviendo respuestas inflamatorias agudas y crónicas, los oxidantes pueden suprarregular la adhesión de ciertas moléculas y mediadores proinflamatorios, y la transcripción de factores y citocinas fibrogénicas que están claramente implicadas en la progresión de la enfermedad renal (Haugen y col., 1999).

Tras una pérdida de masa renal en las nefronas supervivientes, se produce un aumento del consumo de O<sub>2</sub>, lo que implica un aumento del estrés oxidativo potencialmente dañino para estas nefronas (Nath y col., 1998 y Nath y col., 1994). El trabajo de los túbulos supervivientes también aumenta, por lo que el consumo de O<sub>2</sub> así como la producción de ERO también se incrementa. Esto implica que en condiciones basales, puede haber un daño continuo inducido por las ERO que en determinadas circunstancias estaría agravado por un aumento del metabolismo local y de la producción de ERO. Este sería el caso de una sobrecarga proteica, ya que se induce un mayor consumo de oxígeno en las nefronas remanentes, aumentando la producción de ERO y acelerando el deterioro renal (Haugen y col., 1999 y Nath y col., 1994).

Desde el punto de vista morfológico a nivel glomerular, y en el contexto de algunas glomerulonefritis, procesos microtrombóticos, microangiopáticos y daño por tóxicos (fármacos, radiaciones), las ERO inducen la producción de edema, descamación del endotelio y denudación de la membrana basal, trombos, mesangiolisis,

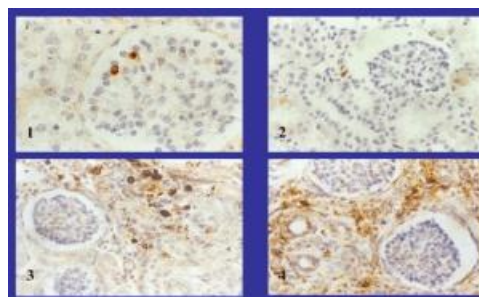
vacuolización epitelial, y fusión de los pedicelos. Desde el punto de vista funcional, esto conlleva un aumento de la permeabilidad de la proteinuria y cambios hemodinámicos intraglomerulares.

En el túbulo, podemos observar edema, desgarro de la membrana basal y lisis. Los cambios de la función consisten en un aumento de la permeabilidad, alteración del potencial transmembrana y en una respuesta proliferativa. Se observa en situaciones de injuria por reperfusión, daño por tóxicos (gentamicina, cisplatino) y cilindros por pigmentos.

Numerosos estudios clínicos y experimentales demuestran con claridad que uno de los eventos iniciales de la enfermedad renal progresiva es la infiltración de los macrófagos en los compartimientos tubulointersticiales y glomerulares (Figura 2). Los macrófagos son liberados tanto en situaciones pro-inflamatorias como pro-fibrogénicas, incluyendo a las especies reactivas del oxígeno, citocinas, factores de crecimiento, proteasas y proteínas de la matriz extracelular. Así, han sido implicados en la nefritis pasiva de Heymann, la nefrosis por aminonucleósido y adriamicina, la ablación renal, la nefropatía diabética inducida por estreptoizotocina y la obstrucción ureteral, entre otros.

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) por ligadura (donde nuestro laboratorio tiene experiencia), es un excelente modelo de estudio, cuyo pionero fue el Dr. Saulo Klahr (Klahr 1991 y Klahr 1994). Es no proteinúrico y no lipídémico, carente de un efecto injurioso inmunológico o tóxico directo sobre el riñón. Con un característico inicio de fibrosis intersticial progresiva relacionada a un infiltrado de macrófagos tubulointersticiales corticales.

Figura 2  
Estudio Inmunoquímico para Anticuerpos Monoclonales CD68. Inmunomarcación CD68 en tejido renal control (400x) 1. Pequeño incremento del infiltrado intersticial de macrófagos en tejido renal de niños con 1 año de desobstrucción (400x) 2. Gran incremento del infiltrado intersticial de macrófagos en tejido renal de niños con desobstrucción más tardía (400x)3 con una dilatación de los túbulos colectores corticales y túbulos proximales. Gran incremento del infiltrado intersticial de macrófagos en tejido renal de niños con desobstrucción más tardía e intensa caída del filtrado glomerular al momento de la cirugía. (400x) 4.



Risdon y col. en 1968, mostraron una correlación positiva entre la histología de la atrofia tubular y la

disminución del índice de filtración glomerular. Más tarde, otros investigadores (Schainuck y col., 1970), también notaron que la función renal alterada, correlacionaba mejor con aberraciones estructurales en el intersticio tubular renal. Teniendo en cuenta que aproximadamente el 80% del volumen renal está ocupado por los túbulos, no sería sorprendente que el daño tubular crónico asociado con la fibrosis intersticial esté estrechamente vinculada a la función renal global.

El desarrollo de cicatrices en la corteza renal como secuela de la obstrucción del tracto urinario es la manifestación principal de la fibrosis intersticial.

El reclutamiento de los macrófagos en el intersticio medular es dependiente, al menos en parte, de la producción de proteínas quimioattractivas y moléculas de adhesión. Existe una dramática sobreexpresión de moléculas de adhesión intercelulares (ICAM)-1 (Ricardo y col., 1996), proteínas quimioattractivas de monocitos (MCP)-1 (Diamond y col., 1994) y osteopontina (Diamond y col., 1995), pocas horas después del disturbio mecánico de la obstrucción ureteral. En el mismo sentido, también ha sido descrito un incremento de la expresión del ARNm de las moléculas de adhesión a células vasculares (VCAM)-1 luego de tres días de obstrucción ureteral unilateral, con un significativo enlentecimiento por la administración del inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), enalapril (Morrissey y col., 1998).

Los estímulos para la inducción de las moléculas de adhesión y quimioattractivas de las células epiteliales tubulares en la corteza renal después de la obstrucción, permanecen sin aclarar.

La ICAM-1 es una glicoproteína de la superficie celular que puede ser sobreexpresada por citocinas proinflamatorias así como especies reactivas del oxígeno. Tanto el factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1 y el interferón gamma, han sido descritos como excelentes estímulos para incrementar la síntesis de ICAM-1 por las células epiteliales tubulares renales, células mesangiales y células endoteliales glomerulares, in vitro (Springer y col., 1990). La generación de ERO, puede activar la expresión de ICAM-1 y otras moléculas de adhesión y quimioattractivas, incluyendo MCP-1 y RANTES en células mesangiales cultivadas (Schlondorff y col., 1995).

La MCP-1 es un miembro de una nueva familia de citocinas pequeñas producida por una variedad de células inmunológicas y no inmunológicas como células mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso. La actividad de MCP-1 incrementa por estimulación de citocinas proinflamatorias específicas como interleucina 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Por su parte, Robin y col. en 1990, demostraron que la obstrucción ureteral unilateral produce una molécula quimioattractiva específica de naturaleza lipídica. De igual modo, se ha puesto de manifiesto la sobreexpresión de MCP-1 en la membrana apical de los túbulos 12 horas después de realizada la obstrucción ureteral unilateral. Además, se ha demostrado por análisis con Northern Blot, el incremento de la expresión

del ARNm de MCP-1 en los riñones obstruidos en comparación con los contralaterales intactos (Diamond y col., 1994).

A su vez, se está poniendo especial atención al incremento de la expresión de osteopontina por el epitelio tubular cortical renal, como un marcador del infiltrado de macrófagos al intersticio y el desarrollo de consecuencias pro-fibrogénicas, culminando en la fibrosis intersticial (Diamond y col., 1995).

La osteopontina es una fosfoproteína glicosilada que fue aislada originalmente de la matriz del hueso. Normalmente está ausente en la corteza renal, con excepción del epitelio parietal y la cápsula de Bowman. Un incremento del ARNm de la osteopontina ha sido descrito en el epitelio tubular proximal, solamente en riñones obstruidos y luego de cuatro horas de realizada la obstrucción (Diamond y col., 1995).

Las ERO pueden jugar un papel vital en la inflamación tubulointersticial asociada a la nefropatía obstructiva. Las ERO, derivadas de la vasoconstricción inicial por modificaciones del flujo plasmático renal durante la obstrucción ureteral unilateral, debido a una progresiva vasoconstricción a expensas de la producción local de compuestos vasoactivos incluyendo angiotensina II (Pimental y col., 1995), con subsecuente reperfusión, y la desregulación de las enzimas tubulares antioxidantes podrían exacerbar el estado pro-inflamatorio post-obstrucción ureteral unilateral. No obstante, se producirían disturbios de las enzimas tubulares proximales durante la isquemia. Al respecto, Modi y col. en 1990, investigaron el efecto de Probuco, un antioxidante sintético, en ratas controles y obstruidas unilateral y bilateralmente por 24 horas. Demostraron que en las ratas con obstrucción bilateral e ingestión de Probuco se producía un marcado y significativo descenso en los niveles renales de malonildialdehído, un producto de la peroxidación lipídica, además de la disminución del infiltrado de leucocitos y disminución de los niveles renales de glutatión oxidado, en contraposición con las obstruidas bilaterales sin Probuco.

La disminución de la expresión proteica y del ARNm de las enzimas antioxidantes y el incremento de la generación de las ERO, participarían en forma integrada en el desarrollo de la injuria tubulointersticial asociada con la hidronefrosis experimental (Ricardo y col., 1997).

El desarrollo de fibrosis intersticial está caracterizada por una progresiva acumulación de tejido conectivo debida a una compleja secuencia fisiopatológica de eventos celulares y moleculares. El estrés oxidativo y/o la alteración del estado oxidativo celular intervendrían en la culminación de la fibrosis intersticial, finalizando el incremento de la expresión de citocinas fibrogénicas y la transcripción y síntesis de proteínas de matriz extracelular (Poli y col., 1997).

Existen numerosos trabajos referidos a la importancia del estrés oxidativo y los productos de peroxidación lipídica en una gran variedad de modelos



experimentales y clínicos con desórdenes fibróticos incluyendo al tetracloruro de carbono, la hemocromatosis y la sobrecarga experimental de hierro, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, aterosclerosis, etc.

Las ERO, estarían involucradas en la activación de los genes de la MCP1 e ICAM-1, moléculas de adhesión que participan en la mediación de células del infiltrado inflamatorio, la proliferación celular y la acumulación de la matriz extracelular, todos, importantes eventos en el desarrollo de la fibrosis tubulointerstitial (Schlondorff y col., 1995). El estrés oxidativo perturba la adhesión de las células epiteliales tubulares renales a las proteínas de la matriz extracelular por alteración de las integrinas, con lo cual se produce una disrupción entre las células modificadas por la oxidación y los contornos de la matriz. Al respecto, Andreoli y col. en 1990, observaron que los túbulos proximales son más susceptibles a la injuria oxidativa que los distales.

A su vez, las ERO incrementan la síntesis de colagenasa tipo I por los fibroblastos. Al respecto, se ha descrito que el estrés oxidativo estimula la expresión del gen de la colagenasa tipo I en cultivos de fibroblastos humanos (Houglam y col., 1991). La adición de  $\alpha$ -tocoferol, al cultivo de fibroblastos, disminuye la síntesis y transcripción del gen de la colagenasa. Los cambios en el estado redox de las células pueden también influenciar la síntesis y la acumulación de colágeno. Shan y col. demostraron en 1994, que niveles elevados de glutatión, incrementan la secreción de colágeno y los niveles del ARNm de las colagenasas tipo I y IV.

Por otro lado, numerosas evidencias apoyan la participación del peróxido de hidrógeno y otras ERO en la activación de vías de señalización y factores de transcripción como NF $\kappa$ B y AP-1. La subunidad de la familia NF $\kappa$ B forma complejos proteicos dimericos en el citosol de las células los cuales pueden activar genes que contribuyen a la inflamación tisular (Grilli y col., 1993). La secuencia de AP-1 está presente en numerosos genes eucariontes y es activada a través de una familia de proteínas nucleares (jun-fos). En tal sentido, se ha demostrado por inmunohistoquímica, el incremento de la expresión de NF $\kappa$ B en los núcleos de las células tubulares corticales durante la obstrucción ureteral unilateral en ratas (Morrissey y Klahr, 1997). Los mismos autores encontraron que el efecto inflamatorio del enalapril, un inhibidor de la ECA, podría deberse a una disminución en la activación de NF $\kappa$ B. Un efecto directo de las ERO, o de los aldehídos como producto final de la peroxidación lipídica, sería la estimulación de la expresión génica de las citoquinas fibrogénicas, a través de la activación de NF $\kappa$ B y AP-1, durante la inflamación. La activación de TGF- $\beta$  y PDGF ocurre a través de sitios de unión con AP-1, mientras que los sitios de unión para NF $\kappa$ B estarían localizados en la región promotora de TNF- $\beta$  e IL-6 (Lieberman y col., 1990).

En la peroxidación lipídica inducida por tetracloruro de carbono, la expresión de TGF- $\beta$  y proteínas de la matriz extracelular, fueron completamente abolidas por la

suplementación con vitamina E (Parola y col., 1992). De igual modo, también han sido descritas otras citoquinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  inducidas por las ERO (Poli y col., 1990).

El mantenimiento de la homeostasis en los tejidos normales refleja un balance entre la proliferación y la muerte celular. La apoptosis juega un papel importante en la morfogénesis y en el recambio de las células normales del tejido adulto.

Son corrientes las investigaciones que relacionan los procesos apoptóticos con el desarrollo de las anomalías glomerulares y tubulares. La enfermedad renal puede presentarse si median estímulos o toxinas exógenas tales como las ERO, que rompen los mecanismos de control normal de numerosas células pudiendo alterar el citoesqueleto celular o los receptores de adhesión entre células, desagregándolas y generando apoptosis. (Korsmeyer y col., 1995).

Desde el punto de vista morfológico, la apoptosis está caracterizada por el achicamiento celular, pérdida de contactos entre células, agregación de la cromatina, y fragmentación de cuerpos apoptóticos unidos a membrana, los cuales son rápidamente fagocitados por macrófagos.

En forma inmediata después de la obstrucción ureteral unilateral no sólo se produce una disminución de la expresión de sustancias antioxidantes sino que además existiría una amplificación en la generación de las ERO, lo cual podría contribuir a incrementar la apoptosis. Es así que durante la enfermedad renal tubular, la apoptosis podría asociarse con la atrofia tubular posterior a la obstrucción, y con el daño tubular luego de la injuria por la isquemia-reperusión. Los principales factores modificados durante la obstrucción se detallan en la Tabla.

---

Tabla: Factores con expresión incrementada durante la obstrucción Ureteral unilateral

- Factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1)
  - Proteína 53 (p53)
  - Proteína 21 [p21, (WAF1)]
  - Inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1)
  - Decorina
  - Factor Nuclear-KB (NF $\kappa$ B)
  - Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ )
  - Compuestos vasoactivos como: angiotensinógeno, angiotensina II, endotelinas, tromboxano A<sub>2</sub>,
  - Prostaglandinas.
  - Protooncogenes como: c-fos, c-jun, jun B, c-myc, cH-Ras.
  - Factores de crecimiento como: interleucina-6, factor activador de plaquetas (PAF)
  - Proteínas involucradas en la apoptosis como: clusterina (SGP-2), osteopontina.
  - Sustancias Compuestas Quimioattractivas: péptido quimioattractivo monocítico-1 (MCP-1), osteopontina
  - Proteínas de adhesión: molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1). Proteínas de matriz: colágeno tipos I, III y IV.
-

Al presente se conoce que la activación de la endonucleasa es un evento inicial generador del daño a nivel del ADN y la muerte celular en células epiteliales tubulares renales expuestas al peróxido de hidrógeno. Los peróxidos han sido relacionados como mediadores de la apoptosis en varios sistemas, justificado por la alta tasa de difusión del peróxido de hidrógeno o su capacidad de generar más intermediarios tóxicos del oxígeno como el hidroxilo. El estado antioxidante celular también es un regulador importante de la apoptosis mediada por las ERO. La expresión de glutatión peroxidasa, una conocida enzima inhibidora del peróxido de hidrógeno y de la peroxidación lipídica, también actuaría como indicador de apoptosis (Korsmeyer y col., 1995).

A la fecha existen muchas evidencias que sugieren que la apoptosis contribuye al daño tubular y la fibrosis intersticial asociada a la obstrucción ureteral unilateral. Estudios morfológicos han demostrado que la atrofia del parénquima renal luego de la obstrucción es tan extensa como la delección celular causada por apoptosis (Gobe y col., 1995). Con referencia a esto, recientemente en nuestro laboratorio comunicamos en obstrucción ureteral unilateral que el tratamiento con un inhibidor de los receptores AT1 de angiotensina II (Losartan) lograba proteger del daño tubulointersticial con disminución del estrés oxidativo y asociado a la expresión de una proteína de golpe de calor (HSP70) conocidas por su expresión en situaciones de estrés (Manucha y col., 2005a).

Es concebible que los eventos moleculares y celulares que median el remodelado de la matriz intersticial durante el estado proinflamatorio puedan también promover el daño tubular. El daño de los túbulos puede desarrollarse como consecuencia de la oclusión de los capilares peritubulares generadores de isquemia, o por el incremento de la apoptosis a través de las ERO y siguiendo con el daño del ADN.

Lo cierto es que el proceso del daño tubular es fundamental en la declinación de la función renal. Por último, es esperable que dicho proceso ocurra con alteraciones en la integridad de las membranas celulares, en particular teniendo en cuenta que las ERO son responsables de la lipoperoxidación.

Es conocida la importancia del mantenimiento de la composición de lípidos, en particular fosfolípidos y colesterol, para la fluidez y funcionamiento normal de las membranas biológicas. En ese sentido, se ha demostrado que los niveles de ceramida y de colesterol se incrementan en la falla renal por procesos isquémicos y nefrotóxicos (Zager y col., 1998). Por otro lado, se ha sugerido en el daño renal agudo que los cambios en la expresión del colesterol podrían estar asociados a modificaciones en la susceptibilidad de la membrana plasmática a la injuria tubular (Zager y col., 1999). Hasta el presente, las bases bioquímicas para estos cambios aún no están bien definidas. No obstante, en nuestro laboratorio demostramos que el bloqueo de los receptores de Angiotensina (tipo 1),

atenua el aumento del contenido y síntesis de colesterol en membranas (Manucha y col., 2005b).

A pesar de los incansables esfuerzos por comprender los mecanismos que inician, mantienen y eventualmente concluyen los desbalances oxidativos en diversas patologías como las relacionadas a la injuria tubulointersticial renal, aún permanecen sin ser completamente dilucidados. Lo cierto es que se cuenta con mucha información que contribuye al diagnóstico y eventualmente permite realizar un pronóstico más acertado.

#### **Bibliografía:**

- Andreoli SP, McAteer JA. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kidney Int.* 1990; 38: 785-794.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59: 527-605.
- Diamond JR, Kees-Folts D, Ding G. Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1 and TGF-B1 in experimental hydronephrosis. *Am J Physiol.* 1994; 266 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 35): F926-F933.
- Diamond JR, Kees-Folts D, Ricardo SD. Early and persistent up-regulated expression of renal cortical osteopontin in experimental hydronephrosis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1455-1466.
- Gobe G, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest.* 1995; 56: 273-281.
- Grilli M, Chiu JLL, Lenardo MJ. NF-kB and Rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol.* 1993; 143: 1-62.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14.
- Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif.* 1999; 17 (2-3): 58-65.
- Houglam K, Brenner DA, Chojkier M. D-alpha-tocopherol inhibits collagen alpha 1 gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest.* 1991; 87: 2230-2235.
- Klahr S, Purkenson ML. The pathophysiology of obstructive nephropathy: the role of vasoactive compounds in the hemodynamic and structural abnormalities of the obstructed kidney. *Am J Kidney Dis.* 1994; 23: 219-223.
- Klahr S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1991; 18: 689-699.
- Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1271: 63-66.
- Lieberman TA, Baltimore D. Activation of the interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 2327-2334.
- Manucha w, Carrizo L, Álvarez S, Vallés P, Oliveros L. EFFECT OF LOSARTAN PRETREATMENT ON KIDNEY LIPID CONTENT AFTER UNILATERAL-OBSTRUCTION IN RATS. *Cellular and Molecular Biology.* 2005; 51, 539-545



- Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Molina H, Vallés P. ANGIOTENSIN II TYPE I ANTAGONIST ON OXIDATIVE STRESS AND HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP 70) EXPRESSION IN OBSTRUCTIVE NEPHROPATHY. *Cellular and Molecular Biology*. 2005; 51, 547-555.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for eurythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244: 6049-6055.
- Modi KS, Morrisey J, Shah SV. Effects of probucol on renal function in rats with bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1990; 38: 843-850.
- Morrisey JJ, Klahr S. Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis. *Am J Physiol*. 1998; 274: F580-F586.
- Morrisey JJ, Klahr S. Enalapril decreases nuclear factor kB activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1997; 52: 926-933.
- Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH. Effect of dietary protein restriction on oxygen consumption and oxidant stress in the remnant nephron. *Kidney Int*. 1998; 33: 381 (abstr).
- Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH. The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int*. 1994; 45: S 11-S 115.
- Palmiter RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1998; 95: 8428-8430.
- Parola M, Muraca R, Dianzani I. Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor B1 gene expression in the rat liver. *FEBS Lett*. 1992; 308: 267-270.
- Pimental JL, Montero A, Wang S. Sequential changes in renal expression of renin-angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1995; 48: 1247-1253.
- Poli G, Kinter A, Justement JS. Tumor necrosis factor a fuctions in an autocrine manner in induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 782-785.
- Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free radical Biol Med*. 1997; 22: 287-305.
- Ricardo SD, Ding G, Eufemio M, Diamond JR. Antioxidant expression in experimental hydronephrosis: role of mechanical stretch and growth factors. *Am J Physiol*. 1997; 272: F789-F798.
- Ricardo SD, Levinson ME, DeJoseph MR, Diamond JR. Expression of adhesion molecules in rat renal cortex during experimental hydronephrosis. *Kidney Int*. 1996; 50: 2002-2010.
- Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet*. 1968; 1: 363-366.
- Robin BH, Harris KPG, Morrison A, Klahr S, Schreiner GF. Renal cortical release of a specific macrophage chemoattractant in response to ureteral obstruction. *Lab Invest*. 1990; 63: 213-220.
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. *Human Pathol*. 1970; 1: 631-640.
- Schlondorff D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int*. 1995; 47: S44-S47.
- Shan ZT, Satriano J, Silbiger S, Schlondorff D. Intracellular glutathione influences collagen generation by mesangial cells. *Kidney Int*. 1994; 46: 388-395.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990; 346: 425-434.
- Stratta P, Canavese C, Dogliani M, Mazzucco G, Monga G, Vercellone A. The role of Free Radicals in the progression of renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1991; XVII, 5 (S 1):33-37.
- Wu A, Arthur J, Wahle K. Regulation of phospholipid glutathione peroxidase gene expression in human endothelial cells. *CPL* 1998; 89:abs. Section.
- Zager RA, Burkhart KM, Johnson ACM, Sacks BM. Increased proximal tubular cholesterol content: Implications for cell injury and acquired cytoresistance. *Kidney Int*. 1999; 56: 1788-1797.
- Zager RA, Conrad DS, Lochhead K, Sweeney EA, Igarashi Y, Burkhart KM. Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic and acute renal failure. *Kidney Int*. 1998; 53: 573-582.