



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

**Efecte de l'estrès oxidatiu induït per fàrmacs i
xenobiòtics sobre els tipus cel·lulars renals. La
seva importància en la litiasi renal.**

Marina Jaume Batle

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat per Rafel Prieto Almirall
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:
Estrès oxidatiu, nefrotoxicitat, lesió renal, litiasi renal

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	Pàgina 4
2. METODOLOGIA.....	Pàgina 10
3. RESULTATS.....	Pàgina 11
3.1. Fisiologia renal	Pàgina 11
3.1.1. Glomèrul	
3.1.2. Túbul proximal	
3.1.3. Túbul distal	
3.1.4. Túbul col·lector	
3.2. Estrès oxidatiu i substàncies nefrotòxiques.....	Pàgina 13
3.3. Marcadors de dany renal.....	Pàgina 20
3.4. Estrès oxidatiu i litiasi renal oxalocàlcica.....	Pàgina 20
4. CONCLUSIÓ.....	Pàgina 23
5. BIBLIOGRAFIA.....	Pàgina 24

1. INTRODUCCIÓ

L'oxidació és fonamental per a la vida, ja que es tracte d'un procés bioquímic de pèrdua d'electrons mitjançant el qual s'obté energia cel·lular (1). Durant aquest procés, es produeixen molècules molt inestables anomenades espècies reactives d'oxigen (ROS) capaces de reaccionar amb diversos substrats orgànics com són els lípids, les proteïnes i el DNA. L'oxidació d'aquestes biomolècules origina danys, compromet les funcions normals de les cèl·lules i pot contribuir a l'aparició d'estats patològics. En condicions fisiològiques, les espècies reactives originades s'inactiven mitjançant mecanismes de defensa. Per tant, encara que aquestes reaccions d'oxidació són indispensables, és necessari un mecanisme de captació d'electrons, anomenat reducció, que inactivi l'excés d'espècies indesitjables, dut a terme per els antioxidants, establint-se així un estat d'equilibri. Però, quan es produeix una ruptura d'aquest equilibri en les nostres cèl·lules degut a un augment en la quantitat de ROS i a una disminució dels antioxidants ocasionat en certes patologies o per agents externs, apareix el que es denomina estrès oxidatiu. Les principals ROS en els sistemes biològics són els radicals lliures. Un radical lliure és una molècula o àtom que conté electrons desaparellats. Degut a aquests electrons no aparellats, els radicals lliures són inestables i, per això, altament reactius (2). Les ROS comprenen diverses molècules químicament reactives derivades de l'oxigen com són el radical hidroxil, l'anió superòxid i el peròxid d'hidrogen, que encara que no es un radical si que en forma al ser molt inestable. El radical hidroxil es forma a partir del peròxid d'hidrogen a través d'una reacció que requereix ió ferrós o cuprós (reacció de Fenton o de Heber-Weiss) i és la molècula amb major capacitat de produir dany en els sistemes biològics en presència d'aquests dos ions (3).

Quan les ROS interaccionen amb les cadenes laterals d'àcids grassos poliinsaturats dels fosfolípids de membrana, es produeix la peroxidació lipídica d'aquests. Aquest fet dona lloc a una alteració estructural i funcional de la membrana cel·lular i la consegüent possibilitat de lisi, segons el grau de la peroxidació. Els hidroperòxids lipídics formats poden descompondre's posteriorment en productes altament citotòxics, com són els aldehids. Aquests, són agents alquilants que actuen sobre les proteïnes provocant una modificació irreversible en enzims i inhibint la seva activitat enzimàtica. En el cas de les proteïnes, es

produeix l'oxidació d'enzims que contenen grups sulfhidrils, fet que dóna lloc a la inactivació d'aquestes (2). L'efecte sobre els hidrats de carboni és menor que en altres molècules. Els monosacàrids com la glucosa i el manitol poden reaccionar amb el radical hidroxil per a produir substàncies reactives. Els polisacàrids poden sofrir l'atac dels radicals i fragmentar-se en unitats més senzilles (4). Els àcids nucleics també poden ser atacats pels radicals lliures. La citotoxicitat d'aquestes espècies químiques, en gran part, es deu a les modificacions químiques que sofreixen les bases i sucres del DNA produint modificacions del genoma al reaccionar amb els radicals lliures, especialment amb el radical hidroxil. Entre les modificacions més freqüents es troba la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG), la qual té un potencial altament mutagen. Les modificacions químiques dels nucleòtids provoquen la ruptura de les cadenes de DNA mitjançant el trencament de l'enllaç fosfodiéster. Si el dany ocasionat és tan gran que no es pot reparar, es produeix una mutació o mort cel·lular (4).

Els antioxidants que presenta l'organisme poden ser endògens o exògens. Pel que fa als antioxidants endògens, els podem classificar en enzimàtics i no enzimàtics. Els enzims més importants implicats directament en la neutralització d'espècies reactives són la superòxid dismutasa, la catalasa, la glutatió peroxidasa i la glutatió reductasa. El superòxid dismutasa constitueix la primera línia de defensa reduint l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen. Seguidament, la catalasa o la glutatió peroxidasa transformaran el peròxid en aigua i oxigen molecular. D'aquesta manera, observem que té lloc una reacció en cadena per part dels enzims. La glutatió reductasa s'encarrega de regenerar la glutatió peroxidasa després que aquesta hagi estat oxidada pel peròxid d'hidrogen. Per altra banda, els antioxidants no enzimàtics són productes del metabolisme del propi organisme com, per exemple, l'àcid úric o la transferrina. També trobem antioxidants exògens, els quals l'organisme no pot produir i han de ser proporcionats a través de l'alimentació (5). Aquests interaccionen amb els radicals lliures cedint-los un electró (6). Un exemple és la vitamina E, que presenta vuit estereoisòmers dels quals l'alfa tocoferol és el més bioactiu (5). Aquest presenta hidroxil fenòlic, el qual és el responsable de la reducció antioxidant. Els fosfolípids de la membrana mitocondrial, del reticle endoplasmàtic i de la membrana plasmàtica presenten una elevada afinitat per l'alfa tocoferol. Els tocoferols actuen interrompent reaccions de cadena amb radicals lliures com a resultat de la seva capacitat de transferir l'hidrogen fenòlic a un radical peròxid lliure (6).

Com s'ha comentat, la causa del desajust en l'equilibri oxidatiu pot ser degut a l'efecte de determinats agents externs. Així, alguns fàrmacs i xenobiòtics són rellevants en el trencament d'aquest equilibri, quan s'abusa del seu ús, i en l'aparició d'un estat d'estrès oxidatiu. La toxicitat d'un fàrmac sol anar lligada a la dosi, la pauta d'administració i la susceptibilitat de les cèl·lules, la qual pot augmentar si estan exposades a condicions fisiològiques temporals com podria ser una isquèmia. L'entrada del fàrmac en la cèl·lula i la seva transformació en metabòlits actius es troba facilitada per enzims que catalitzen reaccions que generen productes altament reactius i potencialment tòxics i ROS, anomenades reaccions de fase I. Aquestes, solen anar acoblades a posteriors reaccions sintètiques i de conjugació, anomenades de fase II, que donen lloc a productes molt polars i biològicament inactius que s'excreten fàcilment a través de l'orina. El mecanisme òptim per a la protecció cel·lular enfront a la fase I és que també es realitzi la fase II, la qual no es produeix en totes les cèl·lules. Aquest perfil metabòlic cel·lular heterogeni explica la susceptibilitat de certes àrees als efectes dels ROS originades (7).

Els fàrmacs que amb més freqüència provoquen toxicitat són els antibiòtics (aminoglicòsids, penicil·lines i cefalosporines), els medis de contrast (com els iodats), antiinflamatoris no esteroïdes (com el piroxicam), immunosupressors (com el daclizumab i el tracolimus) i antivirals (com l'aciclovir) (8). Pel que fa als xenobiòtics, el seu metabolisme pot provocar un augment en la quantitat de ROS presents a l'organisme. La toxicitat de molts xenobiòtics es dona quan aquests són reduïts per un electró produint espècies químiques que reaccionen amb l'oxigen molecular per donar lloc a anió superòxid. Així, uns dels òrgans que es poden veure afectats són els ronyons, ja que molts dels fàrmacs i xenobiòtics són metabolitzats per les cèl·lules renals i filtrats pel glomèrul on poden provocar nefrotoxicitat mitjançant la generació de ROS.

Certes patologies afavoreixen l'aparició de l'estrès oxidatiu, com són la diabetis mellitus o la hipertensió, alhora que també provocaran la formació de més ROS que danyaran més les cèl·lules entrant així en un procés de retroalimentació positiva. Així, de manera indirecta, una malaltia establerta pot donar lloc a la generació d'un altre trastorn mitjançant l'excés de formació de ROS (9).

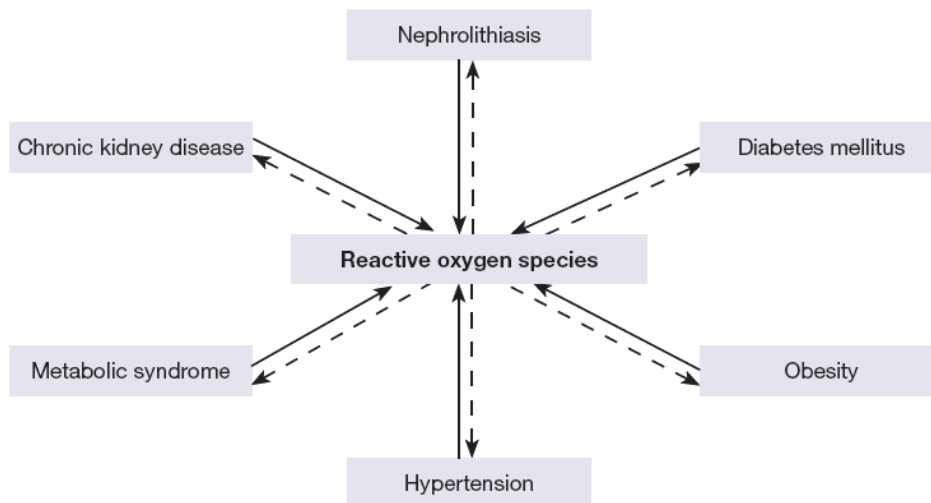


Figura 1: Paper de ROS en diverses malalties relacionant-les entre elles (9).

L'associació entre la nefrolitiasis, lesió renal crònica, diabetis mellitus, obesitat, hipertensió i el síndrome metabòlic és, probablement, el resultat de mecanismes fisiopatològics comuns. És possible que les ROS produïdes per un malaltia condueixin a una altre patologia sota unes circumstàncies apropiades. Per exemple, la hipercalciúria lleu o la hiperoxalúria lleu, que en condicions normals podrien ser només un canvi transitori, poden promoure a llarg termini la cristal·lització i la formació de càlculs quan les cèl·lules estat danyades per les ROS que s'han produït per un altre trastorn (9).

Diversos estudis indiquen que l'estrès oxidatiu juga un paper important en el desenvolupament d'algun tipus de litiasi renal. En condicions fisiològiques i controlades, en el nostre organisme té lloc un procediment de cristal·lització en els ossos i dents en forma d'alguna espècie de fosfat càlcic. La modificació dels factors que regulen aquest procediment pot provocar l'alteració del procés normal de calcificació donant lloc a cristal·litzacions descontrolades en altres teixits com són els ronyons, la pell o els vasos sanguinis i originar una cristal·lització patològica. Aquest fet pot originar l'aparició d'algun tipus de litiasi renal. Segons un estudi realitzat per l'Associació Espanyola d'Urologia, la incidència anual de litiasi renal és del 0,27% amb una prevalença del 4,8% en homes i 3,8% en dones, observant-se una màxima freqüència entre la tercera i la cinquena dècada de vida (10). Els càlculs renals poden agrupar-se en distints grups segons la seva composició i mecanisme de formació:

-Càlculs d'oxalat càlcic monohidratat: trobem els papil·lars i els de cavitat. Els càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lars es formen sobre la papila renal en la zona on la capa antiadherent de glicosaminoglicans es troba danyada degut a, per exemple, alguns agent extern o disfunció cel·lular. Aquests càlculs consten d'un nucli constituït per matèria orgànica, una capa intermitja estriada i una capa perifèrica amb estructura laminada. Per altra part, els de cavitat es formen en zones del ronyó que presenten una deficiència urodinàmica. En aquestes cavitats es dipositen partícules amb capacitat per actuar com a nucleants del càlcul (11).

-Càlculs d'oxalat càlcic dihidrat: s'observen en casos on existeix una calciúria i oxalúria anormalment elevada (11).

-Càlculs mixtes de hidroxipatita i oxalat càlcic dihidrat: composts per oxalat càlcic dihidrat i importants quantitats hidroxipatita. Es presenten normalment en pacients hipercalciúrics i es formen en cavitats de baixa eficiència urodinàmica (11).

-Càlculs infecciosos d'estruvita: solen tenir un tamany considerable i la seva superfície presenta una estructura característica en forma de Y. Una infecció bacteriana del tracte urinari sol ser la causa més comú. Té lloc una elevada del pH urinari i de la concentració d'amoni, el qual afavoreix la precipitació d'estruvita (11).

-Càlculs de hidroxipatita: contenen una gran quantitat de matèria orgànica. Les esferes de hidroxipatita s'acumulen en les cavitats de baixa eficàcia urodinàmica. Aquest fet, combinat amb valors de pH elevats i hipomagnesiúria, dóna lloc a la generació de microcritalls. La compactació per la pèrdua d'aigua acaba generant el càlcul (11).

-Càlculs de brushita: el seu mecanisme de formació, com passa amb els càlculs de hidroxipatita, requereix la presència de cavitats renals de baixa eficàcia urodinàmica. Els cristalls de brushita es disposen en paral·lel uns dels altres (11).

-Càlculs d'àcid úric: l'àcid úric pot cristalitzar en forma anhidra, dihidratada o una mescla entre les dues. L'àcid úric anhidri és la forma més estable mentre que el dihidrat, el qual es forma en condicions de saturació elevades, és més inestable i tendeix a transformar-se en anhidri mitjançant la pèrdua d'aigua (11).

-Càlculs de cistina: es caracteritzen per la seva duresa i difícil fragmentació. Es formen quan es produeix una eliminació renal anormalment elevada de cistina causada per alteracions genètiques i un pH urinari àcid (11).

El desenvolupament dels càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lar està vinculat a l'existència prèvia d'una lesió relacionada amb l'estrès oxidatiu i amb les ROS. Les ROS exerceixen els seus efectes sobre les cèl·lules renals provocant una lesió cel·lular i la inducció d'una cristal·lització de fosfat càlcic (hidroxiapatita) ja que els líquids corporals es troben sobresaturats en fosfat càlcic. La sobresaturació és la força impulsora de la cristal·lització provocant així la precipitació. Quan una dissolució es troba sobresaturada respecte a un determinat component, és inestable i acaba precipitant. En estudis in vitro s'ha demostrat que la lesió d'aquestes cèl·lules dóna lloc a vesícules de membrana que actuen com a nucleadors per la formació dels cristalls de calci. Aquest, seguidament, experimentarà un procés de creixement. Una lesió cel·lular en els túbuls renals pot créixer el suficient fins a contactar amb l'orina en la interfase entre la papil·la renal i l'orina continguda en el calze renal. L'orina, en aquest cas sobresaturada en oxalat càlcic, en contacte amb un cristall o calcificació d'hidroxiapatita promou la cristal·lització de l'oxalat càlcic monohidrat. Aquest incrementa la seva mida amb el temps fins a formar un càlcul que ja no pot ser eliminat per el sistema de conductes renals (pelvis, urèters, bufeta i uretra) degut a la seva mida.

En aquest treball es pretén estudiar en profunditat els mecanismes de nefrotoxicitat de diverses substàncies descrits en la bibliografia. Per tant, es tindrà com a objectiu la determinació dels efectes de l'estrès oxidatiu provocat per fàrmacs i xenobiòtics sobre les cèl·lules renals, així com la seva implicació amb la possible aparició de litiasi renal.

2. METODOLOGIA

Abans de la redacció, s'ha dut a terme una recerca bibliogràfica prèvia a través de diverses fonts científiques. Les bases de dades utilitzades han estat PUBMED, GOOGLE ACADEMY i SCIELO (*Scientific electronic library online*). També s'han realitzat recerques en fonts bibliogràfiques en paper com són llibres i apunts relacionats amb el tema a tractar. La recerca dels termes en bases de dades s'ha fet tant en anglès com en castellà i els més buscats han estat *oxidative stress*, *nephrotoxicity*, *renal litiasi* i *renal diseases* entre altres. Mitjançant l'anàlisi de nombrosos articles, s'han elegit els que contenien la informació necessària i responien a les qüestions plantejades a l'hora de fer el treball, arribant a un total de 26 articles inclosos en la bibliografia. Posteriorment, s'ha dut a terme la redacció per tal de donar resposta als objectius plantejats a la introducció.

3. RESULTATS

3.1. Fisiologia renal

Els ronyons són un òrgan complex encarregat de la filtració dels productes residuals provinents de la sang i de la producció d'orina així com també del manteniment de la homeòstasi, la regulació de la pressió osmòtica i arterial, i de l'equilibri àcid-base. L'escorça, la medul·la i la pelvis renal són les tres zones en les que s'organitza un ronyó. La sang circula per l'escorça i la medul·la mitjançant l'artèria renal, la qual es ramifica en artèries de menor mida. Cada una d'aquestes artèries desemboca en les anomenades nefrones on es forma una xarxa capil·lar al voltant d'un sistema tubular i es produeix l'orina. La nefrona és la unitat funcional del ronyó (12). Un ronyó pot disposar, aproximadament, d'un milió de nefrones (13). Podem dividir cada nefrona en el glomèrul, el tub proximal, el túbul distal i el túbul col·lector (12).

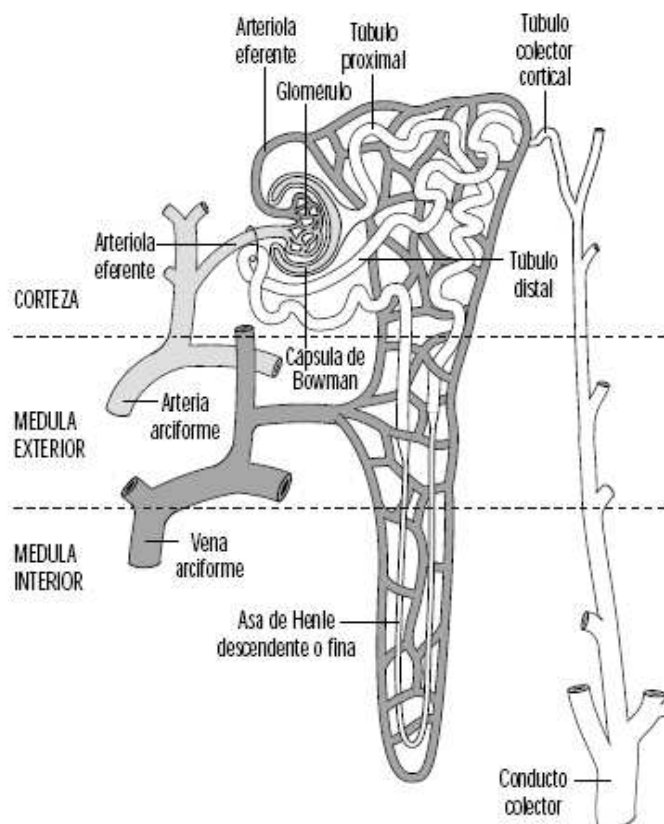


Figura 2: Estructura d'una nefrona (13).

3.1.1. Glomèrul

El glomèrul és una estructura situada entre les arterioles aferents i eferents (13). Es tracte d'un cabdell vascular capil·lar format per la divisió de l'arteriola aferent en capil·lars que es reuneixen posteriorment format l'arteriola eferent. Aquest cabdell vascular es troba situat dins una estructura esfèrica anomenada càpsula de Bowman, la qual consta de dues capes epitelials. Per una banda, tenim la capa epitelial visceral que recobreix la superfície dels capil·lars glomerulars i, per l'altra, tenim la capa epitelial parietal que recobreix la superfície interna de la càpsula de Bowman (14). Les cèl·lules que formen l'epiteli visceral són els anomenats podòcits (12). Aquests tenen diverses funcions com augmentar la superfície d'absorció i formar porus pels quals passa el filtrat (13). Des d'una perspectiva física, el filtrat glomerular es troba entre les dues capes de cèl·lules epitelials (12).

El filtre glomerular a través del qual pot passar el filtrat consta de tres capes: l'endoteli fenestrat, en el qual trobem les cèl·lules endotelials del capil·lar, la membrana basal glomerular i la capa de podòcits (12). En la configuració de la membrana basal, podem trobar un espai anomenat mesangial el qual està format per les cèl·lules mesangials. Aquestes cèl·lules actuen com a macròfags específics, a més de produir la matriu mesangial (12).

La sang és empesa per la pressió arterial a través del glomèrul cap a l'interior de la càpsula de Bowman. Aquesta pressió fa filtrar la sang pel filtre glomerular. Els nutrients essencials són reabsorbits per les cèl·lules tubulars (13). El glomèrul només permet el pas de proteïnes amb una càrrega definida i una mesura determinada (13).

3.1.2. Túbul proximal

Format pel túbul contornejat proximal i l'assa de Henle. En el túbul contornejat proximal es reabsorbeix entre el 65 i el 70% del filtrat glomerular. Això és degut a una reabsorció passiva de sodi que arrossega de forma passiva l'aigua. A més de sodi i aigua, es reabsorbeix gran part del bicarbonat, glucosa i aminoàcids filtrats pel glomèrul. L'assa de Henle té com a funció crear un interstici medul·lar amb una osmolaritat creixent a mesura que ens aproximem a la papil·la renal. En aquest segment es reabsorbeix un 25% de clorur sòdic i un 15% de l'aigua filtrada, de manera que el contingut tubular a la sortida d'aquesta part és hiposmòtic respecte al plasma. Cada dia es filtren un total de 180 litres de plasma, que

porten aigua, sals minerals, vitamines, hormones, lípids, sucres senzills i proteïnes amb un pes inferior a 70000 (12).

3.1.3. Túbul distal

Aquesta zona és impermeable a l'aigua però permeable a alguns ions. Aquí és on es produeix la secreció tubular, la qual consisteix en eliminar les substàncies en excés, que no han estat filtrades inicialment, per a la seva excreció. Està format per una porció recta i una contornada. Entre les dues es troba la màcula densa, la qual està formada per entre vint i trenta cèl·lules epitelials (12).

3.1.4. Túbul col·lector

En aquest segment es produeix la reabsorció d'aigua mitjançant l'hormona antidiürètica (ADH). Si aquesta hormona disminueix la seva acció, el túbul col·lector és impermeable a l'aigua i aquesta s'excreta en gran volum. La part on les obertures dels túbuls col·lectors ingressen al ronyó s'anomena papil·la renal, on l'orina flueix cap als urèters (12).

3.2. Estrès oxidatiu i substàncies nefrotòxiques

Cada una de les parts de la nefrona realitza una funció específica i té una aportació sanguínia diferenciada. Certes substàncies químiques poden influir directament sobre un determinat segment de forma crònica o aguda. Així, segons el lloc on actuïn aquestes substàncies, es veuran afectats diversos aspectes de la funció renal. El glomèrul i el túbul proximal són les zones més afectades per les ROS, ja que són les que tenen major contacte amb les substàncies nefrotòxiques que les produeixen.

L'estrès oxidatiu pot afectar a la funció glomerular degut a la seva acció sobre les cèl·lules mesangials i endotelials glomerulars. Una elevada quantitat de ROS en el mesangi induïx l'apoptosi de les cèl·lules mesangials (15). Els efectes glomerulars d'una substància nefrotòxica es manifesten com una disminució del coeficient d'ultrafiltració degut a la lesió provocada per les ROS. Els nefrotòxics actuen sobre els vasos sanguinis del glomèrul produint una disminució del flux sanguini renal (FSR). Mitjançant la realització de diversos

estudis, s'ha pogut demostrar l'efecte nefrotòxic de fàrmacs per un increment de l'activitat de les ROS. La ciclosporina A, fàrmac immunosupresor, en un estudi in vitro utilitzant glomèruls aïllats de rates es va demostrar un augment de l'anió superòxid i de peròxid d'hidrogen en els animals tractats amb el fàrmac respecte als animals control (16). Aquest fenomen, passava paral·lelament al deteriorament de la funció renal dels animals. En el mateix estudi es realitzaren experiments amb cèl·lules mesangials humanes comprovant així que la ciclosporina A augmentava la síntesi in vitro de ROS i que la preincubació amb vitamina E neutralitzava aquest efecte. Tot i que no es varen determinar clarament els mecanismes moleculars pels quals la ciclosporina A produeix ROS, es creu que la seva formació podria relacionar-se amb l'acció del fàrmac sobre sistemes com el citocrom P450 o sobre la baixada de la concentració d'antioxidants. A més, es va veure que la ciclosporina A produïa una baixada dels nivells de NADPH, molècula necessària pel manteniment de l'estat reduït del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial i que donaria lloc a la mort cel·lular. Aquest fet, es pensa que pot ser degut a l'oxidació d'enzims involucrats en la seva síntesi com la deshidrogenasa o el citrat sintasa mitocondrials. S'observà una oxidació de la cardiolipina, lípid present a la membrana interna mitocondrial que contribueix a la estabilització d'aquesta a través d'interaccions amb proteïnes i complexos de la cadena respiratòria. La ciclosporina A alterà l'emissió de fluorescència de NAO, substrat que s'uneix de forma específica a la cardiolipina, suggerint oxidació d'aquesta. L'oxidació de la cardiolipina afecta a varis components de la cadena respiratòria mitocondrial, alterant el flux electrònic. Com que existeix un mecanisme acoblat al transport d'electrons, que consisteix en la translocació de protons des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana, tampoc es generarà el gradient electroquímic imprescindible per a la síntesi d'ATP mitocondrial, comprometent el metabolisme energètic cel·lular. Una hipòtesis postula que l'augment de ROS pot condicionar l'alliberació de vasoconstrictors originant deteriorament en la funció renal. La ciclosporina c provoca un augment de l'alliberació de citocrom c mitocondrial al citosol, suggerint que produeix una obertura dels porus de transició de permeabilitat mitocondrial, els quals es formen en zones de contacte entre les membranes mitocondrials externa i interna. Aquesta obertura condicionarà l'alliberació de factors proapoptòtics.

En el cas de les cèl·lules tubulointersticials, les ROS indueixen l'expressió de gens de mediadors inflamatoris com citoquines en les cèl·lules de l'epiteli tubular renal, els quals

promouen el reclutament de leucòcits i macròfags que contribueixen a augmentar la lesió preestablerta pels radicals (15). En el túbul, la nefrotoxina provoca necrosi cel·lular conduint a una obstrucció tubular i a una sortida del líquid tubular, també anomenat backleak. Un exemple de substància nefrotòxica és la vancomicina, antibiòtic utilitzat pel tractament d'infeccions produïdes per bacteris grampositius. Aquest fàrmac, inhibeix la formació de la paret cel·lular dels bacteris, impedit la formació dels peptidoglicans. La vancomicina s'elimina quasi exclusivament de forma renal, principalment per filtració glomerular i, en certa mesura, a través de la secreció tubular (17). Estudis realitzats en animals (18) han demostrat que la vancomicina produeix necrosi de les cèl·lules tubulars causant així efectes sobre el correcte funcionament del ronyó. S'ha vist que, en rates, la vancomicina indueix la disminució de l'activitat d'enzims antioxidants (17), fet que influeix en la generació d'estrès oxidatiu i, per tant, aparició de nefrotoxicitat. Tot i això, és difícil determinar si la nefrotoxicitat és produïda per una elevada i continuada dosi d'aquest medicament o si és el resultat del seu ús en pacients amb lesió renal preexistent.

Quan es produeix una interacció entre les ROS produïdes a causa del nefrotòxic i els lípids de la membrana plasmàtica de les cèl·lules renals, té lloc una alteració tant de la permeabilitat de la membrana com de l'activitat del seus sistemes de transport. A més, aquesta unió pot ocasionar l'activació d'enzims associats a la membrana. Un dels enzims que s'activen és la fosfolipasa C, que indueix l'alliberació de inositol trifosfat. L'augment intracel·lular dels nivells de inositol trifosfat activen la sortida de calci del reticle endoplasmàtic cap al citosol. Això dona lloc a una activació cel·lular que si no té un suport energètic adequat pot donar lloc a apoptosi. Els nefrotòxics poden alterar les funcions dels lisosomes i les mitocòndries. Algunes substàncies alteren les propietats dels lisosomes, s'altera la permeabilitat de la seva membrana i s'estimula l'agregació de membranes ocasionant l'alliberació d'enzims lisosomals donant lloc a fosfolipidosi, destrucció del lisosoma i, per tant, necrosi cel·lular. Per altra banda, les mitocòndries de les cèl·lules tubulars són llocs d'acció de molts nefrotòxics alterant les funcions de transport cel·lular i produint mort cel·lular (7).

Els agents antineoplàstics s'utilitzen comunament pel tractament de càncers metastàtics, però alguns d'aquests són nefrotòxics. Diversos estudis han determinat el paper de l'estrès

oxidatiu induït pel cisplatí en l'aparició de dany renal, el qual s'acumula en els mitocondris de les cèl·lules epitelials del túbul renal. El cisplatí induïx la formació de ROS en les cèl·lules epitelials renals en disminuir les concentracions intracel·lulars de glutatió, el qual és un dels principals antioxidants de les cèl·lules. Un altre fàrmac que pot donar lloc a nefrotoxicitat és la vincristina, utilitzat en el tractament de diverses entitat oncològiques. Es va tractar models murí de rata amb el fàrmac i, en comparació amb un grup control, s'observà un dany significatiu sobre els lípids de les membranes cel·lulars provocat per lipoperoxidació causada per ROS (19).

Així com s'ha vist que diversos fàrmacs afavoreixen una situació d'estrès oxidatiu, el mateix passa amb determinats xenobiòtics. Un xenobiòtic és tota substància estranya o aliena a les que procedeixen de la composició o metabolisme dels organismes vius. Una classe de xenobiòtics de rellevant importància són els metalls, ja que s'introdueixen en gran quantitat en l'ambient degut als efectes col·laterals de l'activitat industrial. A més, no són biodegradables i persisteixen llargs períodes en el medi ambient (20). Un exemple és el plom, el qual també és capaç de produir alteracions en altres sistemes de l'organisme. Els principals usos d'aquest metall es donen en la fabricació de productes com bateries, ceràmiques, plàstics i cobertes de cablejat entre altres. La quantitat de plom present en els aliments és mínima, però no nul·la. Les principals fonts d'exposició són els cereals, les verdures i l'aigua de l'aixeta. El plom s'absorbeix principalment per via intestinal i respiratòria i, en menor mesura, a través de la pell. L'absorció intestinal es troba regulada pel transportador DMT-1 i s'incrementa amb la ingesta deficient de Fe i Zn afavorint la seva toxicitat. L'absorció respiratòria és una via altament eficient amb una captació major del 40% del plom inhalat, encara que el mecanisme molecular es desconeix. El plom es filtra a través del glomèrul i és reabsorbit pel túbul proximal pel procés d'endocitosi. A l'interior de les cèl·lules, el plom promou la generació de ROS i provoca alteracions en diversos enzims antioxidants com la catalasa i el superòxid dismutasa entre altres. Així, el plom té la capacitat d'incrementar els nivells de radicals lliures i disminuir la disponibilitat de reserves antioxidant, donant lloc a la generació de l'estrès oxidatiu. Les ROS generades induiran peroxidació lipídica en els àcids grassos insaturats de les membranes cel·lulars modificant la seva composició i alterant l'activitat d'enzims units a elles. A més, altera la funció de les defenses antioxidants ja que inactiva el glutatió. També actua sobre l'enzim glutatió

reductasa, reaccionant i inhibint l'activitat dels grups –SH. S'ha observat una disminució en altres enzims que utilitzen glutatió, com és el cas de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (20). Tot i això, l'efecte nociu del plom depèn en gran mesura dels nivells presents en l'organisme (3). No es coneix quin és el nivell més baix en el qual el plom exerceix el seu efecte advers sobre el ronyó. La majoria dels efectes renals documentats s'ha observat en exposicions agudes a dosis altes i en exposicions cròniques a dosis moderades-altes (nivell de plom en sang >60 µg/dL).

El cadmi també és un potent nefrotòxic. La toxicitat del cadmi ve donada per l'exposició a aquest metall principalment a través del fum del tabac, l'aigua i alguns aliments com cereals i mol·luscs. Es calcula que les concentracions superiors a 200 µg Cd/g de pes produeixen disfunció dels túbuls renals (21). L'absorció del cadmi té lloc a través del transportador de metalls divalents-1 (DMT-1). Aquest, entre altres llocs, es troba en els ronyons, en el túbul proximal de les nefrones. El complex que forma el cadmi juntament amb el transportador s'anomena Cd-MT1 i es filtra fàcilment a través del glomèrul degut al seu baix pes molecular. El Cd-MT1 és reabsorbit pel túbul proximal a través d'endocitosis. En el medi intercel·lular de les cèl·lules tubulars s'emmagatzema el Cd-MT1 i aquest complex és desmantellat en els lisosomes. Després d'això, el cadmi lliure es transporta al citoplasma. L'activació de la proteïna quinasa C augmenta l'expressió de DMT-1 i, en conseqüència, la toxicitat tubular del cadmi. Es produeix una acumulació del cadmi lliure en els mitocondris provocant la inhibició del complex III de la cadena respiratòria. Aquest fet produeix una disfunció mitocondrial i la formació de ROS. Les ROS provoquen l'alliberació de citocrom C, que es troba a l'interior de la mitocòndria, al citoplasma on s'acopla a Apaf-1, un activador d'apoptosi que en presència d'ATP activa la procaspasa-9. Aquesta, a la vegada, activarà altres caspases donant lloc a apoptosi (20).

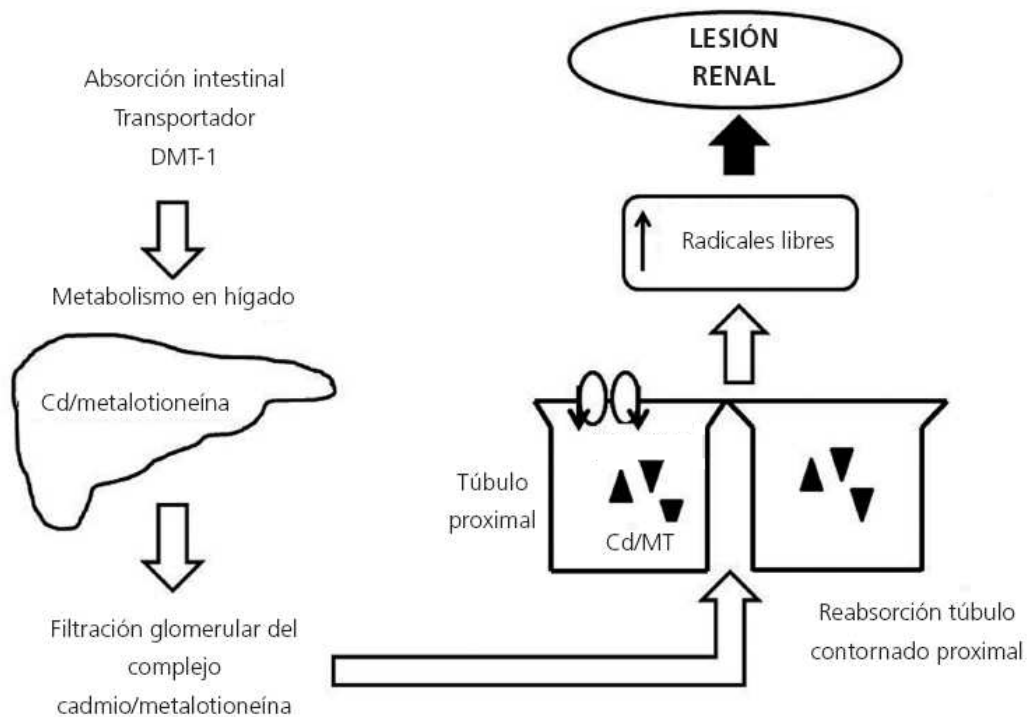


Figura 3: Mecanisme fisiopatològic de la lesió renal per cadmi (20).

L'arsènic també constitueix una causa d'efectes adversos sobre les cèl·lules renals. Gran part de l'arsènic present en l'organisme prové d'aliments. En la majoria dels casos, els composts d'arsènic són transformats i eliminats ràpidament a través de l'orina. L'arsènic s'absorbeix per via intestinal, pulmonar i, en menor quantitat, a través de la pell. En el túbul proximal podem trobar el transportador d'arsènic MRP-2, que afavoreix la introducció del metall en les cèl·lules tubulars on provoca una baixada dels nivells de glutatió, superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa, incrementant l'activitat oxidativa de ROS (20). Es calcula que 0,15 grams d'arsènic és la dosi letal per a una persona d'uns 75 kg de pes. Tot i que no es tenen molt clars els seus mecanismes d'actuació, una de les principals hipòtesis és que degut a la acumulació d'arsènic en els mitocondris. S'inhibeix l'activitat del piruvat deshidrogenasa ocasionant un desacoblament en la fosforilació oxidativa generant ROS, el qual indueix apoptosi pel mecanisme d'activació de caspases explicat anteriorment (22).

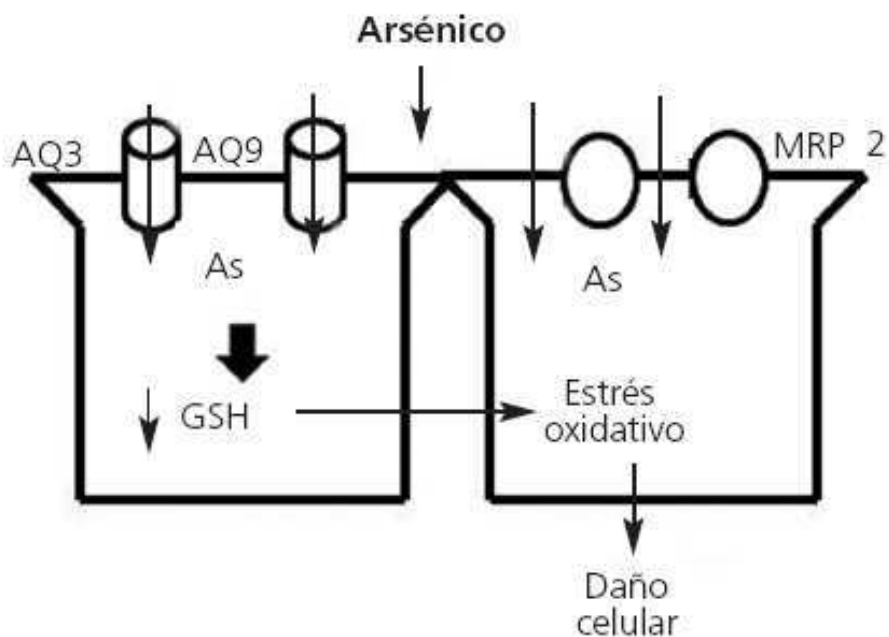


Figura 4: Mecanisme fisiopatològic de la lesió renal per arsènic (20).

A parts dels metalls, podem trobar altres tipus de xenobiòtics perjudicials per l'organisme com és el cas de l'etanol. L'administració crònica d'alcohol disminueix la reabsorció tubular i redueix la funció renal. Les anormalitats en els túbuls renals és deguda a la peroxidació lipídica provocada per les ROS (19). A més, causa una disminució significativa dels antioxidants catalasa, superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa. Un altre exemple de xenobiòtics són els hidrocarburs halogenats com el tetraclorur de carboni, utilitzat en la indústria com a desengreixant. Aquest compost, gràcies a la seva solubilitat en lípids, pot creuar fàcilment les membranes. La seva toxicitat es deu a la deshalogenació reductiva que sofreix pel sistema citocrom P450 per formar el radical triclorometil. Aquest radical pot unir-se covalentment a distintes macromolècules cel·lulars o reaccionar amb l'oxigen per formar el radical triclorometilperoxi. Ambdós radicals reaccionaran amb els lípids de membrana.

3.3. Marcadors de dany renal

Són diversos els marcadors que indiquen la presència d'una lesió renal. Una de les maneres de determinar si existeix un dany renal és mitjançant la detecció d'albúmina, relacionada amb un defecte en la barrera glomerular ja que aquesta en condicions normals no deixa passar l'albúmina, i de la proteïna d'unió al retinol, utilitzada per observar danys sobre el túbul proximal. Aquesta, degut al seu baix pes molecular, hauria de ser reabsorbida i, per tant, no s'hauria de trobar en l'orina. El dany renal també pot ser valorat mitjançant components de les cèl·lules renals. Entre aquests, trobem l'enzim lisosomal beta-N-acetil-D-glucosaminidasa (NAG), important en la detecció d'efectes sobre el túbul proximal. La destrucció de teixit renal pot ser quantificada a través de mètodes immunoquímics, mitjançant la mesura de components renals en orina que actuen com a antígens (23). La concentració sèrica de creatinina també és útil per detectar defectes en el filtrat glomerular, ja que aquesta es filtra lliurement a nivell glomerular i posseeix escassa presència tubular. Tot i això, el seu ús està subjecte a limitacions. La creatinina no és un marcador sensible ni precoç ja que l'increment de la concentració sèrica no es detecta fins que el filtrat glomerular disminueix en un 50%. A més, la disminució del filtrat glomerular es dona juntament amb secreció tubular de creatinina, que aconsegueix mantenir els seus valors sèrics. Un altre marcador que podem trobar és una proteïna produïda per totes les cèl·lules nucleades anomenada cistatina c que, en condicions fisiològiques, és filtrada lliurement i és reabsorbida pel túbul proximal. Per tant, un augment de la concentració de cistatina c en l'orina és indicador de lesió tubular renal. En condicions en les quals davalla el filtrat glomerular, la concentració sèrica de cistatina c augmenta. Tot i això, hi ha diversos factors que poden modificar els nivells de cistatina C que s'han de tenir en consideració, tals com el tabaquisme, l'obesitat, la edat o la diabetis (24).

3.4. Estrés oxidatiu i litiasi renal oxalocàlcica

L'anàlisi de càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lar en pacients amb litiasi renal suggereix que el dany induït per ROS es troba involucrat en la patogènesi de la malaltia. Es va veure que les concentracions d'enzims renals (glutamiltanspeptidasa, angiotensina 1 i

galactosidasa) en orina eren més altes del que tocava en condicions de normalitat en pacients amb càlculs renals d'oxalat càlcic (9). A més, es va observar que la presència de 8-hidroxideoxiguanosina, un marcador de dany oxidatiu en el DNA, en orina estava incrementada (9). L'origen patològic principal d'aquests càlculs és una lesió sobre la papil·la renal, la qual serveix de depòsit per a nucleants heterogenis que induiran la formació de cristalls. Els càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lar inicien la seva formació sobre la zona de la papil·la renal on la capa antiadherent de glicosaminoglicans que la recobreix es troba debilitada o danyada degut a l'efecte de les ROS, les quals provoquen la seva fragmentació. Els residus orgànics poden actuar com a nucleants heterogenis per a la hidroxiapatita i aquesta, en contacte amb l'orina, com a nucleant heterogeni dels cristalls d'oxalat càlcic. A més, els productes provinents de la degradació tissular del glomèrul i els túbuls també serviran de nucli per a la formació de càlculs, però en aquest cas no seran de tipus papil·lar, ja que aquests no es troben units a la papil·la sinó a la cavitat renal. Un cop format el nucli, la posterior formació del cristall implica la combinació del procés de creixement cristal·lí. El creixement cristal·lí suposa la incorporació gradual de les unitats que constituïran el cristall sobre les cares dels ja existents. En les dissolucions sobresaturades aquest procés es dona amb facilitat. El resultat serà la formació d'un càlcul renal. Tot i que qualsevol orina es troba sobresaturada respecte al calci i oxalat, les concentracions d'aquestes substàncies no són suficients per induir la formació de cristalls d'oxalat càlcic, ja que es necessitaria una sobresaturació molt elevada. Per tant, es necessita un nucli de diferent composició a la resta del càlcul, el que s'anomena nucleació heterogènia. Aquests càlculs solen ser semiesfèrics d'uns 3 mm de diàmetre amb una superfície convexa i l'altra còncava. Aquesta darrera és la que es troba unida a la papil·la renal (25).



Figura 5: Càlcul de oxalat càlcic monohidratat papil·lar típic (25).

En la formació dels càlculs renals també influeix la presència d'inhibidors de la cristal·lització. Aquests són substàncies que dificulten o impedeixen el desenvolupament de cristalls. Poden actuar tant a nivell de nucleació com de creixement cristal·lí. Un exemple és el fitat, producte natural present en els aliments rics amb fibra, sent aquest l'inhibidor més efectiu per a la litiasi càlcica. Aquesta potent acció inhibidora és conseqüència de l'afinitat pel calci dels sis grups fosfat que presenta la seva estructura. D'aquesta manera, les molècules de fitat s'adsorbeixen sobre la superfície dels nuclis o dels cristalls càlcics ja formants impedit el seu posterior creixement. La quantitat de fitat que trobem en l'organisme està relacionada amb la ingesta oral a través d'aquests aliments. Així, en un estudi realitzat en 40 pacients que presentaven formació de càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lar, es va veure que aquests presentaven un baix consum d'aliments rics en fitat. Uns 80 mg de fitat pot incrementar entre un 50 i un 100% la capacitat inhibidora de l'orina en les hores següents a la ingesta (11).

Algunes investigacions han demostrat que els cristalls d'oxalat de calci són perjudicials per a les cèl·lules tubulars renals. L'administració d'altres quantitat d'oxalat de sodi en models animals es va associar amb l'aparició de dany renal afavorint la formació de càlculs d'oxalat càlcic (26). La NADPH oxidasa és la major font de ROS en els ronyons, així, l'exposició de les

cèl·lules epitelials renals als cristalls d'oxalat de calci ja formats augmenta l'activitat d'aquest enzim i la producció de superòxid. Així, l'estrès oxidatiu ocasiona danys en les cèl·lules renals afavorint la formació de càlculs i, a més, aquests interaccionen amb les cèl·lules del ronyó augmentant l'efecte nociu. Per tant, l'increment de la disfuncionalitat de les cèl·lules renals propiciarà encara més la formació de càlculs, entrant així en un procés de retroalimentació.

4. CONCLUSIÓ

Després de la recerca bibliogràfica realitzada i seguint l'objectiu marcat al principi del treball, podem concloure que una causa clara de dany renal són les ROS generades com a conseqüència de l'administració en excés de diversos fàrmacs i l'exposició a diferents tipus de xenobiòtics. Molts segueixen el mateix patró d'actuació, la producció de ROS s'incrementa tant que els sistemes antioxidants no són suficients, fent que es perdi l'equilibri formació-eliminació de ROS, a més d'actuar sobre diversos components de membranes i produir l'alliberació de components proapoptòtics. Les lesions ocasionades per les ROS comprometen el correcte funcionament de les cèl·lules renals, veient-se afectats els processos del filtració i reabsorció característics dels ronyons, a més d'originar-se residus orgànics. Podem afirmar que hi ha una estreta relació entre un estat d'estrès oxidatiu i l'aparició d'un tipus concret de litiasi renal, la que es produeix per càlculs d'oxalat càlcic monohidratat papil·lar. Es proporciona una zona de nucleació sobre la papil·la renal sent un dels punts claus, juntament amb un defecte d'inhibidors de cristallització, en el desenvolupament del càlcul. Amb això, veiem que la litiasi renal és una malaltia multifactorial on entren en joc diversos elements com el factor genètic i la dieta, fent que aclarir la seva etiologia resulti una tasca costosa. Són molts els projectes d'investigació duts a terme en aquest camp degut, en part, en l'augment de nefrotòxics. Però, el millor remei és la prevenció evitant consumir de manera prolongada o quantitats molt elevades de cert fàrmacs i reduir al màxim l'exposició a substàncies que puguin resultar nocives per l'organisme.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Guerra JIE. Estrés oxidativo , enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna*. 2001;18 (6): 326–335.
2. Castillo R., Huerta P, Carrasco R, Rodrigo R. Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL*. 2003; 8(1): 43-53
3. Marínez A, Cancela M, Virgolini B. El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. Implicancias terapéuticas. *Acta Toxicol Argent*. 2011; 19(2); 61–79.
4. Martínez-Cayuela M. Xenobiotic toxicity mediated by oxigen free radicals. *Ars Pharmaceutica*. 1998; 39(1):1–13.
5. Pham-huy LA, He H, Pham-huy C. Free Radicals , Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2):89–96.
6. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo J. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Cub Med Mil*. 2001;30(1):36–44.
7. López JM, Rivas L, Eleno N, Rodríguez A. Mecanismos básicos de nefrotoxicidad. *Nefrologia*. 1995; 15(1):44–48
8. Morales J. Drug-induced nephrotoxicity. *Med Clin Condes*. 2010; 21(4):623–628.
9. Khan SR. Reactive Oxygen Species as the Molecular Modulators of Calcium Oxalate Kidney Stone Formation: Evidence from Clinical and Experimental Investigations. *J Urol*. 2013; 189(3):803–811.
10. Martínez R. Revisión del tratamiento farmacológico de la urolitiasis. *FAP*.2012; 10(1):18–24.
11. Sanchis Cortés P. Estudio de los procesos patológicos de cristalización:

- litiasis renal, calcificaciones cardiovasculares y osteoporosis. IUNICS. 2008.
12. Antón Santos Juan M. Manual AMIR. 3a ed. España: Grafinter, 2006;978-84-612-6346-2.
 13. Hemstreet GP. Sistemas renal y urinario. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, 2001.
 14. Tiskow Gregorio. Fisiología renal básica. Sección de fisiología. Universidad Lisandro Alvarado.
 15. Hernández JC, Emiliano M, Puig L. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Mex Patrol Clin. 2011; 58(1):4–15.
 16. Hornedo JP, de Arriba G, Calvino M. La ciclosporina A origina estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en células tubulares renales. Nefrología. 2007; 27(5):565–573.
 17. Gupta A, Biyani M, Khaira A. Vancomycin nephrotoxicity: myths and facts. J Med. 2011; 69(9):379–83.
 18. Dieterich C, Puey A, Lyn S, Swezey R. Gene Expression Analysis Reveals New Possible Mechanisms of Vancomycin-Induced Nephrotoxicity and Identifies Gene Markers Candidates. Toxicological Sciences. 2009; 107(1):258–269.
 19. Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. Int J of Nephrology. 2012; 1-9.
 20. Sabath E, Robles-Osorio ML. Medio ambiente y riñón : nefrotoxicidad por metales pesados. Nefrología. 2012; 32(3):279-286.
 21. Lauwerys RR, Bernard AM, Buchet JP, Roels HA. Assessment of the health impact of environmental exposure to cadmium: contribution of the epidemiologic studies

carried out in Belgium. *Environ Res.* 1993; 62(2):200–206.

22. Nava-Ruíz C, Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién.* 2011; 16 (3):140–147.
23. Hernández FG. The role of biomarkers in human toxicology. *Med legal y toxicología.* Universidad de Granada
24. Seijas M, Baccino C, Nin N, Lorente JA. Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas. *Med Intensiva.* 2014; 38(6):376–385.
25. Pieras E, Pizá P, Ozonas M. Papillary and cavitory monohydrate calcium oxalate lithiasis: Comparative study of etiological factors. *Arch Esp Urol.* 2006; 59(2):147-154.
26. Khan S, Finlayson B, Hackett R. Experimental Calcium Oxalate Nephrolithiasis in the Rat. *Am J Pathol.* 1982; 107(1):59-69.