

Evaluación *in vitro* de la nefrotoxicidad por Cisplatino en corteza renal de ratas

Laura Arús, Gilda María Linares,** Rafael Alvarez** y Julia Piedra.**

Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana. *Instituto de Farmacia y Alimentos, Avenida 23, No. 21425 entre 214 y 222, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana. **Instituto de Nefrología, Avenida 26 y Boyeros, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de abril del 2000. Aceptado: 26 de enero del 2001.

Palabras clave: Cisplatino, nefrotoxicidad, estrés oxidativo.

Key words: Cisplatin, nephrotoxicity, oxidative stress, *in vitro*.

RESUMEN. El Cisplatino (cis-diaminodicloro platino II, CDDP) es un potente agente antitumoral empleado en el tratamiento de una variedad de tumores, sin embargo, su toxicidad, fundamentalmente la renal, limita su uso. El mecanismo por el cual se produce la nefrotoxicidad no se conoce totalmente, pero se tienen evidencias de que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en él. Este trabajo se realizó con el objetivo de estudiar las acciones del Cisplatino directamente sobre el riñón y valorar el estado redox renal, en un modelo *in vitro* basado en cortes de corteza renal de riñones de ratas. Se determinaron enzimas indicadoras de citotoxicidad (γ -glutamyltransferasa (γ -GT), N-acetilglucosaminidasa (NAG), aspartatoaminotransferasa (ASAT) y lactatodeshidrogenasa (LDH)), variables convencionales incluidas en los estudios asociados al estrés oxidativo como: concentraciones de glutatión (GSH), malonildialdehído (MDA) y actividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa totales). Los resultados muestran que el Cisplatino provoca daño en la corteza renal, fundamentalmente, en los túbulos proximales, sustentado por el incremento en la actividad de las enzimas indicadoras de citotoxicidad. A su vez, hubo una disminución temprana en las concentraciones de GSH, actividad de peroxidasa total y superóxido dismutasa; así como un incremento de las concentraciones de MDA y actividad de catalasa. Todos estos resultados indican que este fármaco provoca un desajuste en el estado redox de la corteza renal, que bien puede ser el inicio de los eventos involucrados en la nefrotoxicidad de este agente.

ABSTRACT. The cis-diamminedichloro platinum II (CDDP) is a powerful anticancer drug. The precise mechanism of CDDP nephrotoxicity is far too clear, however several works relate it to oxidative stress. To study the action of this drug directly on the kidney and relationship to the redox renal status, the following study *in vitro* was carried out. The model utilized was rat renal cortical slices. Two experimental group were created, the control and the one exposed to Cisplatin, in this last one was dissolved the CDDP (2 mmol/L). Both groups were incubated to 30, 60, 120 y 240 min. Cytotoxicity enzymes marker (γ -glutamyltransferase (γ -GT), N-acetylglucosaminidase (NAG), aspartateaminotransferase (ASAT) y lactatedeshidrogenase (LDH)), glutathione levels, malonildialdehyde levels and the activities antioxidant enzymes (superoxide dismutase, total peroxidase and catalase) were determined. The results showed that the Cisplatin caused an injury in the renal cortex, fundamentally on the proximales tubules suggested by the cytotoxicity enzymes. In turn there was an early decreased glutathione level, total peroxidase and superoxide dismutase activities and increment to malonildialdehyde level and catalase activity. All these results point to the fact that the Cisplatin promotes an alteration on redox renal status, which can begin the events involved in the nephrotoxicity induced by CDDP.

INTRODUCCION

El Cisplatino (cis-diaminodicloro platino II, CDDP) es un antitumoral de gran efectividad en el tratamiento de una variedad de tumores sólidos, pero su uso se limita en muchas ocasiones por su toxicidad.¹ Los efectos tóxicos más importantes lo constituyen la ototoxicidad, efectos emetogénicos, mielosupresión y la nefrotoxicidad;² esta última resulta la más trascendental. La toxicidad renal del Cisplatino incluye fallo renal agudo y crónico.³ Sobre el mecanismo de daño renal no se tiene un conocimiento exacto acerca del o los eventos celulares implicados,³ aunque se plantea la participación de las especies reactivas del oxígeno y alteraciones en el metabolismo sulfidrílico.³ Se considera que ellos no son el resultado de una secuencia, sino que se producen por mecanismos independientes.⁴ Otra hipótesis refiere que los conjugados de glutatión, formados a nivel hepático, al llegar a las células tubulares proximales y verse expuestos a la acción de la gamma glutamiltransferasa (γ -GT) se transforman en metabolitos tóxicos, responsables del daño en el riñón.⁵ Las moléculas alquilantes como es la de este fármaco, provocan citotoxicidad por unión covalente con grupos nucleofílicos de macromoléculas de las células tumorales, pero también, resultan equitóxicos para células no tumorales, que presentan elementos bioquí-

micos susceptibles a la acción de estos agentes. De ahí que resulte complejo lograr que solamente se manifieste su efecto deseable y no perjudicial.³ Las defensas antioxidantes, por ejemplo: enzimas y glutatión, etc., también pueden ser blancos de la acción de los agentes alquilantes.⁶ De ahí que este trabajo se propusiera estudiar las acciones del cisplatino directamente sobre el tejido renal y su influencia en el estado redox renal.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas hembras SD sanas, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (La Habana) las cuales se mantuvieron una semana previa al estudio en una habitación con una temperatura promedio de $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$, una humedad relativa de $(70 \pm 4)\%$, bajo ciclos controlados de luz y oscuridad cada 12 h y con suministro de agua y comida *ad libitum*.

Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y a continuación, se extrajeron los riñones rápidamente, los cuales fueron colocados en medio Rinse helado gaseado previamente con oxígeno. Los cortes de corteza renal se realizaron, según Zhang⁷ y se formaron dos grupos: uno control (1) y otro tratado (2), con una réplica de 10 cortes por cada grupo, los cuales se adicionaron a frascos que contenían medio de incubación: con cisplatino 2 mmol/L (grupo tratado) previamente adicionado. Se aplicó al medio oxígeno puro durante 1 min y se incubaron a 37°C , en zaranda a 100 ciclos/min, a diferentes tiempos 30, 60, 120 y 240 min. Posteriormente, se decantó el medio y centrifugó a 3 000 r/min a 4°C por 10 min, en el sobrenadante se determinaron las actividades enzimáticas de: γ -glutamyltransferasa (γ -GT), N-acetilglucosaminidasa (NAG), aspartatoaminotransferasa (ASAT) y lactatodeshidrogenasa (LDH).

Los cortes fueron pesados nuevamente y se homogeneizaron a mano en un mortero con una disolución de cloruro de potasio 150 mmol/L 10% (m/v), los homogenatos se centrifugaron a 1 800 r/min por 5 min y posteriormente, a 4 000 r/min por 15 min a 4°C . En el sobrenadante se determinaron las actividades enzimáticas de SOD, CAT y PX, la concentración de proteínas totales, MDA y GSH.

Procesamiento estadístico

Se utilizó la prueba ANOVA para determinar diferencias entre grupos. Las diferencias significativas se tuvieron en cuenta para una probabilidad $< 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio de incubación

Las actividades de γ -GT, LDH, ASAT y NAG mostraron un aumento significativo en el grupo 2 a partir de los 120 min, siendo muy significativo ($P < 0,01$) a los 240 min para ASAT y γ -GT (Figuras 1-4).

La liberación al medio de incubación de las enzimas contenidas en el tejido, constituye un índice de citotoxicidad, que expresa un daño directo sobre la integridad del tejido renal (corteza), existiendo eventos condicionantes muy relacionados al mecanismo tóxico de este agente.

Estas enzimas se localizan en compartimentos celulares diferentes, la γ -GT en la parte más externa de la membrana de borde de cepillo, la NAG en lisosomas, mientras que la LDH y ASAT en el citosol, aunque

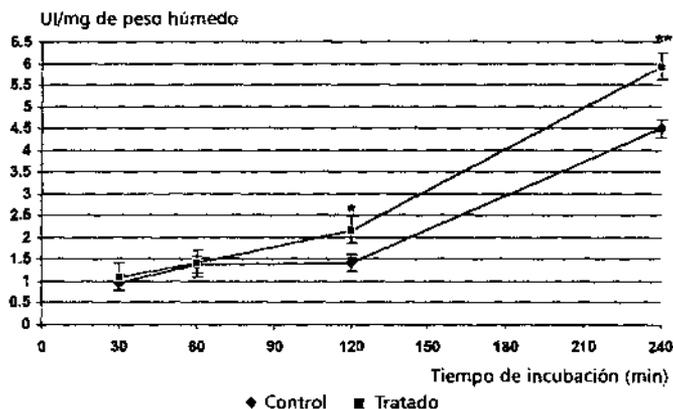


Fig. 1. Actividad enzimática de γ -GT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

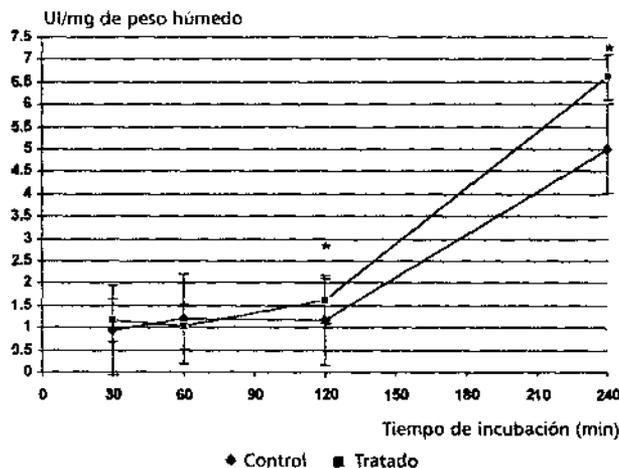


Fig. 2. Actividad enzimática de LDH. ($n = 10$). * $P < 0,05$.

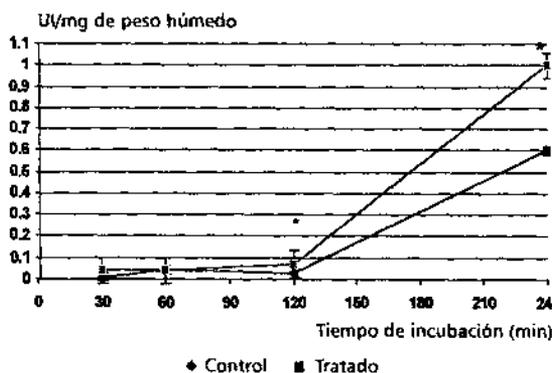


Fig. 3. Actividad enzimática de ASAT. ($n = 10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

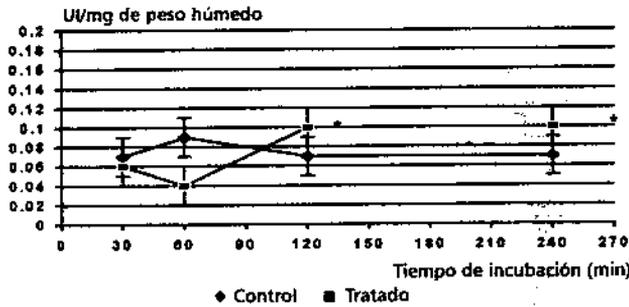


Fig. 4. Actividad enzimática de NAG. ($n = 10$) * $P < 0,05$.

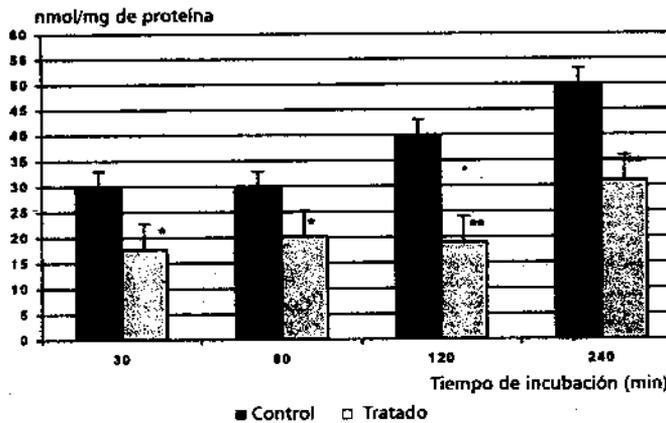


Fig. 5. Concentración de glutatión. ($n = 7$), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

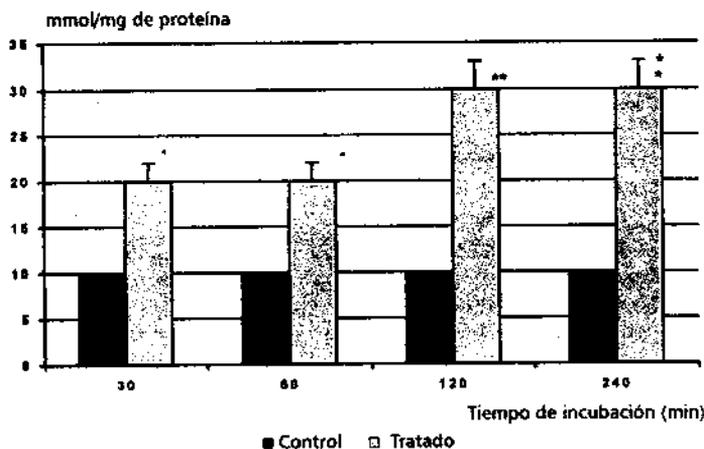


Fig. 6. Concentración malonildialdehído. ($n = 7$), * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

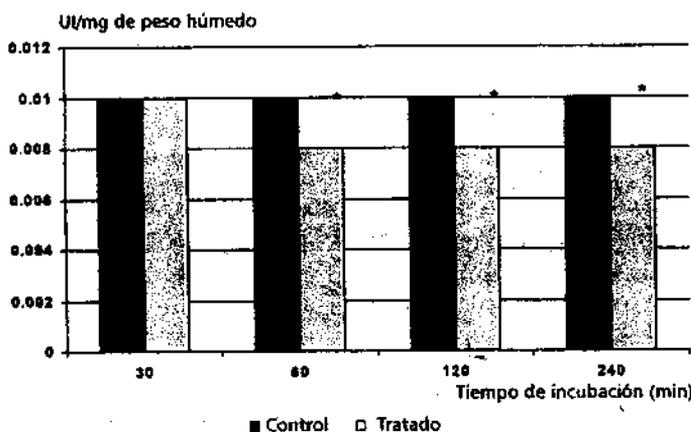


Fig. 7. Actividad enzimática de PX. ($n = 7$), * $p < 0,05$.

también la ASAT está localizada en la mitocondria.⁸ Ello permite referir que el daño provocado fue de grado considerable, más significativo sobre la membrana luminal y mitocondrias; por el aumento tan significativo en las actividades de γ -GT y ASAT a los 240 min. Resultados semejantes fueron reportados por Zhang y col. 1994⁹ en cortes renales tratados con diferentes concentraciones de cisplatino.

Tejido renal

Los resultados mostraron una disminución en las concentraciones de GSH e incremento del MDA (Figuras 5 y 6) durante todos los tiempos para el grupo 2, siendo muy significativos a partir de los 120 min. Las actividades de las enzimas antioxidantes (Figuras 7, 8 y 9) en el grupo 2 mostraron una disminución de las peroxidases, a partir de los 60 min de tratamiento. Asimismo, la actividad de SOD disminuyó a los 120 y 240 min, mientras que la actividad de catalasa aumentó.

Los compuestos alquilantes tienen una gran afinidad por grupos nucleofílicos de biomoléculas, sin embargo, las células presentan mecanismos de defensa, como el glutatión reducido, debido al grupo SH libre del resto cisteína, el cual resulta más biodisponible que los grupos nucleofílicos de las proteínas en general.⁹ Vale añadir que el GSH tiene otras funciones en la célula tales como secuestrar especies reactivas del oxígeno (ERO), cofactor de la glutatiónperoxidasa (GSH-PX), de ahí que una disminución importante en sus concentraciones celulares de lugar a una ruptura del equilibrio entre la formación de especies oxidantes y su inactivación por parte de las defensas antioxidantes, ello favorece un incremento en la generación de ERO y peroxidación lipídica (POL). Otros autores también han encontrado un incremento en la concentración de MDA dependiente de las de cisplatino.¹⁰ Si se tiene en cuenta lo anteriormente referido, debía esperarse que la disminución del GSH preceda al aumento del MDA, sin embargo, ambos efectos fueron simultáneos en el tiempo, de ahí que cabría preguntarse, si el CDDP es capaz de provocar POL por algún, mecanismo independiente a su efecto alquilante.

Zhang en 1993⁷ en un estudio *in vitro* demostró que la disminución en las concentraciones de GSH (15 min), precedía al aumento del MDA en la mitocondria, mientras

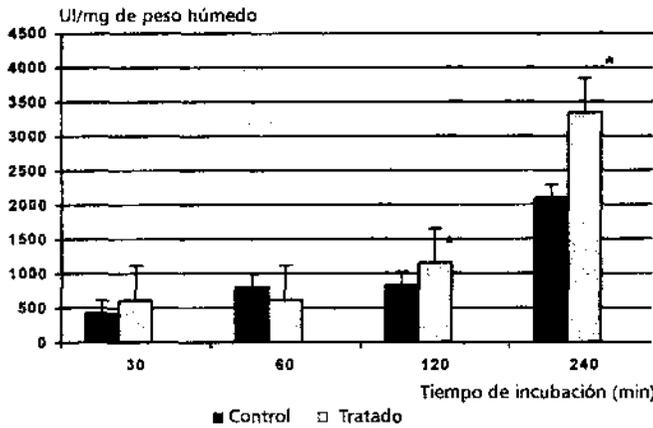


Fig. 8. Actividad enzimática de CAT. (n = 7), *P < 0,05.

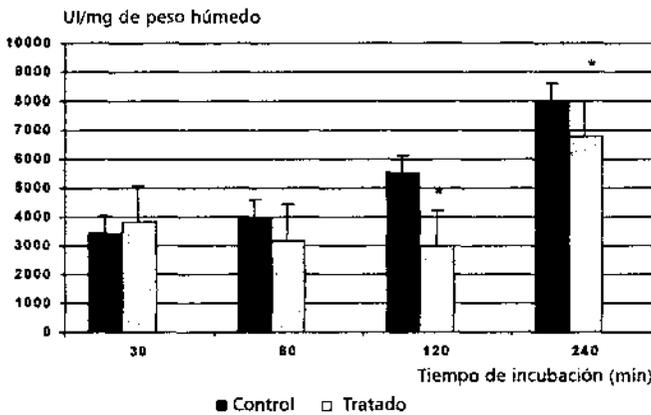


Fig. 9. Actividad enzimática de la SOD. (n = 7), *P < 0,05.

que Kuhlman en 1997¹¹ plantea que las concentraciones de GSH tienen que disminuir, al menos en un 30 % con respecto a las basales, para que ocurra la POL. En el trabajo, la disminución de las concentraciones de glutatión fue de un 59 % a los 30 min, 33 % a los 60 min, 68 % a los 120 min y 30 % a los 240 min. Kruidering¹² y otros investigadores^{7,9} plantean que la acumulación del CDDP en la mitocondria es selectiva con relación a otros organelos, por lo que se puede pensar, que la alquilación a proteínas mitocondriales, es un evento que puede provocar una interferencia en el transporte de electrones, favoreciendo la reducción incompleta del oxígeno molecular a agua¹² y por lo tanto, una explosión en la generación de ERO, que pudieran ser las responsables de la POL (efecto más importante que provoca la generación de radicales).

Si existe una explosión en la generación de las especies reactivas del oxígeno, debe esperarse una respuesta de las enzimas antioxidantes, sin embargo, el comportamiento de ellas no resulta del todo claro. Primeramente, el aumento en la activi-

dad de catalasa, bien puede explicarse por un incremento en las concentraciones de peróxido, siendo oportuno destacar que el incremento se aprecia a los 120 min. Resultados similares han sido reportados para esta enzima por otros autores.¹³ Por su parte, la disminución en la actividad de las peroxidases puede explicarse atendiendo a que:

- el Cisplatino provoca inhibición selectiva en la actividad de la GSH-PX, enzima que por excelencia inactiva peróxidos orgánicos e inorgánicos. Esta inhibición puede deberse a un ataque a los grupos SH⁻ esenciales y no esenciales de la enzima y(o) por disminución del cofactor (GSH).¹⁴
- un incremento en los peróxidos orgánicos podría inactivar la enzima.^{13,14}

Los resultados de este trabajo son compatibles, con esos hechos.

La actividad de la enzima SOD mostró una disminución. Radhika,¹³ realizó un estudio de nefrotoxicidad *in vivo* a una dosis de 16 mg/kg de peso corporal y también encontró una disminución en ella, posiblemente debido a una unión directa

del Cisplatino a sus grupos SH⁻, un incremento de los peróxidos y(o) una disminución del GSH. Cuando administró un compuesto nefroprotector, se restauró la actividad de la enzima, sugiriendo que no había degradación de la enzima platinada y que la inactivación es reversible. Por otra parte, Kuhlman 1997,¹¹ refiere que el CDDP provoca una disfunción en la mitocondria como consecuencia de la disminución del glutatión. Además, de que la magnitud y la aparición del daño es dependiente de la concentración.

Según estudios realizados por este autor en mitocondrias expuestas a CDDP a concentraciones en el orden de los micromoles, la disfunción en el organelo es precedida por una disminución en la síntesis de proteínas en las concentraciones de GSH y una pérdida de la función lisosomal; sin embargo, al utilizar concentraciones en el orden de los milimoles, la disfunción se manifestó inmediatamente.

En el trabajo se emplearon concentraciones en el orden de los milimoles (2 mmol/L) por lo que hubo una disminución en las concentraciones de GSH, un incremento del MDA desde los 30 min, un aumento en la liberación de las enzimas al medio de incubación a los 120 min, muy significativo para la ASAT (enzima mitocondrial) a los 240 min. De ahí que la disminución de la actividad de SOD, bien puede ser consecuencia de una disfunción temprana en dicho organelo. Zhang 1993,⁶ determinó la actividad de la ASAT, en mitocondrias aisladas de cortes tratados con cisplatino a 2 mmol/L (120 min), la actividad disminuyó significativamente en el tejido y se incremento en el medio de incubación.

De acuerdo con los resultados y atendiendo a los reportes encontrados en estudios similares a este trabajo, se concluye que las acciones alquilantes directas del cisplatino sobre el tejido renal, son las responsables del desajuste en el estado redox, revelado por la disminución del glutatión y las variaciones en la actividad de enzimas antioxidantes, fundamentalmente de las mitocondrias, este efecto da lugar al desencadenamiento de mediadores de lesión (la peroxidación lipídica y generación de especies reactivas del oxígeno), que son los responsables de los cambios en la actividad metabólica de las células, expresado por las enzimas indicadoras de citotoxicidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lagomasino de modo especial. Al Dr. Hilario Gómez Barry y a la Licenciada Tamara Roussó. Al Laboratorio Clínico del Instituto de Nefrología, así como a todas las personas que colaboraron de una u otra forma en la realización de este trabajo, muchas gracias.

BIBLIOGRAFIA

- Aladren M.J. Cisplatino: Mecanismos de Afectación Renal. *Nefrología*, XIII, 183, 1993.
- Se-Young Choung and Jae-Myeong Kong. Portative Effects of Vitamin C on Cisplatin Nephrotoxicity. *Arch. Pharm. Res.*, 17, 11, 1994.
- Casaret and Doull'S. Toxicology: The Basic Science of Poison, McGraw Hill Co., Inc., USA, 1996.
- Gemba M., Sugihara K., Modificación de Cisplatin Toxicity by Antioxidants. *Japan J. Pharmacol.*, 40, 353 1986.
- Hanigan M., and Gallagher J., Inhibition of Gamma-Glutamil transpeptidase Activity by Acivicin *In vivo* protects the Kidney from Cisplatin-Induced Toxicity, *Res. Nov.* 15, 54 5925, 1994.
- Bernstein E. et al., Modulation of Cisplatin Toxicity by Glutathione. *International J. of Oncology*, 7, 353, 1995.
- Zhang J.G., and Lindup W.E., Role of Mitochondria in Cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochemical Pharmacology*, 45, 2215, 1993.
- Jung K., Urinary Enzymes in Clinical and Experimental Medicine. Springer-Verlag Press, 1992.
- Zhang J.G., and Lindup W.E., Cisplatin nephrotoxicity: Decreases in Mitochondrial protein sulphhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochemical Pharmacology*, 47, 1127, 1994.
- Sugihara K., Nakano S., Gemba M., Effect of Cisplatin on *In Vitro* production of Lipid Peroxides in Rat Kidney Cortex. *Japan J. Pharmacol.*, 44, 1987.
- Kuhlmann, Burkhardt G. and Kohler H. Insights into Potential Cellular Mechanism of Cisplatin Nephrotoxicity and their Clinical Application. *Nephrol. Dial.*, 12, 2478, 1997.
- Kruidering M., Van de Watwr B., De Heer E., Mulder G.J. and Nagelkerke F., Cisplatin-Induced in porcine Proximal Tubular Cells: Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Complexes I to IV of the respiratory Chain. *The J. Pharm. and Exp. Therapeutics*, 280, 638, 1997.
- Somani S.M., Ravi R., Rybak L.P., Diethylthiocarbamate Protection Against Cisplatin Nephrotoxicity: Antioxidant System. *Drug and Chemical Toxicology*, 18, 151, 1995.
- Ravi R., Somani S.M., Rybak L.P., Mechanism of Cisplatin Ototoxicity: Antioxidant System. *Pharmacology and Toxicology*, 76, 386, 1995.

ACTIVIDADES CIENTIFICAS

MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

I CONFERENCIA INTERNACIONAL AZUCARERA CUBANA "CENTROAZUCAR 2001"

Del 6 al 9 de noviembre del 2001.
Universidad Central de Las Villas, Santa Clara.

TEMATICAS: *Tecnología azucarera. Maquinaria azucarera. Control azucarero. Energética azucarera. Diversificación. Agricultura cañera. Biotecnología de la caña de azúcar. Economía y organización de la producción azucarera. Automatización y NTIC. Universidad y agroindustria azucarera.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 250,00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Dr. Ing. Ángel M. Rubio González.

TELEFONO: (53) (422) 81415. FAX: (53) (422) 81608. E-MAIL: arubio@uclv.etcscu

II CONFERENCIA CIENTIFICA INTERNACIONAL MEDIO AMBIENTE SIGLO XXI

Del 20 al 24 de noviembre del 2001.
Universidad Central de Las Villas, Santa Clara.

TEMATICAS: *Energía y medio ambiente.
Gestión ambiental.
Educación ambiental.
Agricultura orgánica.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 200,00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Dr. Andrés Olivera Ranero.

TELEFONO: (53) (422) 81630/ 81194. FAX: (53) (422) 22113/ 81608.

E-MAIL: candidoq@uclv.etcscu