

Evaluación morfológica y funcional de la injuria renal inducida por doxorubicina

Lettieri, Carolina N; Stoyanoff, Tania R; Aguirre, María V; Cerdera, Verónica y Brandan Nora C.

INTRODUCCION

Doxorubicina (Adriamicina) es un antibiótico antraciclino citotóxico utilizado en la regresión de enfermedades neoplásicas diseminadas. Se une a los ácidos nucleicos, presumiblemente por una intercalación específica del núcleo antraciclino planar con el ADN de doble hélice y se caracteriza por inhibir el repliegue y la acción de las ADN polimerasas. Esta droga altera también la funcionalidad de las membranas celulares así como de las proteínas plasmáticas. Posee efecto citotóxico sobre células malignas, así como efectos tóxicos colaterales sobre diferentes órganos entre los que se destaca mielosupresión, cardio y nefrotoxicidad^{1,2}.

Se han desarrollado varios estudios de injuria renal inducida por Doxorubicina en modelos experimentales con el fin de elucidar su fisiopatología^{1,2}. En general, muestran un periodo de estabilidad y luego desarrollan proteinuria, hipertensión arterial, elevación de la creatinemia. La biopsia renal evidencia glomérulos esclerosados y acumulación de material amorfo^{3,4}. Estas alteraciones llevan a una disminución progresiva de la función renal^{5,6}. La evolución hacia la fibrosis renal y la atrofia tubular son componentes inevitables de la patogénesis tubulointerstial que acompaña a la toxicidad renal por Doxorubicina, como en la mayoría de las enfermedades renales progresivas⁴.

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo fue evaluar los cambios morfológicos a nivel renal provocados por una única dosis de Doxorubicina (11µg/g) durante 28 días de experiencia y correlacionarlos con las modificaciones de pruebas funcionales en plasma. Esto tiene por finalidad dilucidar los mecanismos etiopatogénicos *in vivo* de esta droga a nivel renal.

Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional del Nordeste. Moreno 1240 (3400).
Corrientes. Argentina. E-mail: nbrandan@med.unne.edu.ar
Mejor Trabajo de Investigación Básica en el II Congreso Facultad de Medicina, diciembre de 2007.

MATERIALES Y METODOS

Animales y administración de las drogas. Se utilizaron ratones adultos isogénicos de la cepa Swiss CF1 (peso aproximado 26 a 28 g) provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNNE. Estos animales han sido fuente de muestras de sangre periférica y riñón. Los mismos fueron mantenidos con dieta estándar y dispusieron de agua libremente.

La Doxorubicina (Adriamicina) se disolvió en solución salina estéril a una concentración de 11µg/g. Los ratones (n=6/lote) recibieron una sola inyección intra-peritoneal de la droga. El grupo control recibió Solución Salina (n=6).

Hematocrito, creatinemia y uremia. De cada lote, se anestesiaron los animales con pentobarbital 3%, y se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción cardíaca con EDTA. El hematocrito se determinó por método standard (microhematocrito). La eutanasia se produjo por dislocación cervical a los 0, 7, 14 y 28 días posteriores al tratamiento. Niveles de creatinina sérica y de uremia se determinaron con métodos colorimétricos (Wiener Lab).

Determinación de la celularidad renal. A cada tiempo experimental se obtuvieron muestras de riñón, las que fueron pasadas por una malla estéril para obtener células renales utilizando buffer fosfato salino (PBS). El recuento de celularidad se determinó en cámara de Neubauer, utilizando diluciones en solución Turk (1/20). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio de células nucleadas por riñón $\times 10^6$ (\pm SD).

Examen histológico de muestras renales. Luego de la obtención del material, su fijación y deshidratación con alcoholes (70°, 80°, 96° y 100°), se realizó la aclaración con líquido intermedio durante 1 a 3 horas para luego realizar la impregnación en parafina. Se confeccionó el taco (en barras de Leuckart) y se realizaron cortes con micrótopo. Las muestras montadas fueron coloreadas con Hematoxilina/Eosina y PAS.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 8% en buffer PBS y se analizaron en el Centro de Microscopía de Barrido Electrónico de la Facultad de Ciencias Agrarias UNNE.

Fluorescencia. Un riñón de cada animal fue homogenizado con 1.5 ml de PBS y centrifugado a 1000g durante 7 min. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet con 750 μ l de PBS. Luego se incubó por 5 min a 37°C con 1 ml de la mezcla diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (IP). Posteriormente se centrifugó a 700g durante 7 minutos para luego descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 3 ml de PBS. Se dispensó una gota de suero fetal bovino (15 μ l) en portaobjetos y los preparados se fijaron con metanol a 4°C durante 20 min. El montaje se realizó con solución de glicerol y PBS en partes iguales (pH 8).

RESULTADOS

La celularidad en los riñones tratados con Doxorubicina (11 μ g/g) muestra a partir del séptimo día post tratamiento, una disminución estadísticamente significativa del 30.59% ($p < 0.01$). Hallándose un descenso progresivo hasta el final del estudio ($p < 0.01$); con una caída del número total de células del 35.91% (Fig.1A). Inversamente, la apoptosis renal cuantificada por método de fluorescencia muestra un ascenso estadísticamente significativo en todos los días experimentales (Fig.1B).

Al evaluar la relación porcentual de glóbulos rojos y plasma se observó a los 7 días post quimioterapia un aumento del 8% por encima del valor control ($p < 0.01$), descendiendo posteriormente y conservando valores similares al control durante todo el estudio (Fig. 2A). Estos datos se relacionan con las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) a partir de muestras de riñón que evidencian un importante aumento en la cantidad de glóbulos rojos en el intersticio renal observados en el día 7 de la experiencia (Fig. 2B).

La tinción de cortes de riñón con hematoxilina/eosina (H/E) permite evidenciar los cambios ocasionados por Doxorubicina al compararlos con la histología normal (Fig. 4A y B). Las muestras obtenidas a los 28 días luego del tratamiento con Doxorubicina muestran severa injuria glomerular manifestada por oclusión de la luz capilar y acumulación de

material eosinófilo amorfo hialino a nivel mesangial. Se observa presencia de corpúsculos renales remanentes. Por otro lado, los túbulos muestran diferentes anomalías entre las que se destaca tumefacción y atenuación del citoplasma celular. A nivel vascular se observa importante congestión

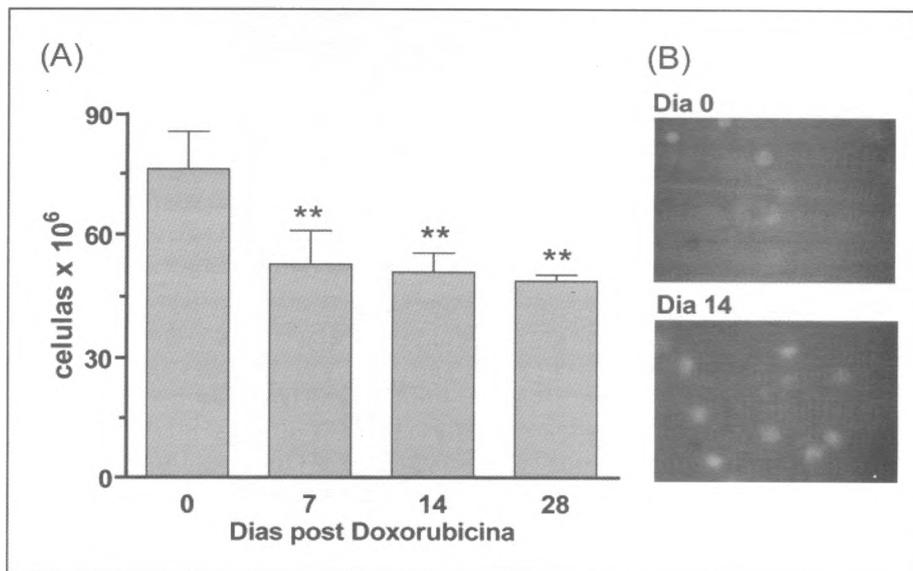


Figura 1: Celularidad y apoptosis en riñón luego de la administración de Doxorubicina (11 μ g/g). (A) Celularidad renal expresada como la media \pm SD de tres experiencias diferentes (6 animales por lote). Los resultados muestran descenso progresivo de la celularidad en todos los tiempos estudiados. **: $p < 0.01$. (B) Figuras representativas del día 0 (control) y del día 14 muestran apoptosis de células renales por Microscopía de Fluorescencia utilizando DAF-IP. Las células apoptóticas se observan con citoplasma verde y con núcleos intensamente teñidos con yoduro de propidio (rojo), consideradas células IP positivas.

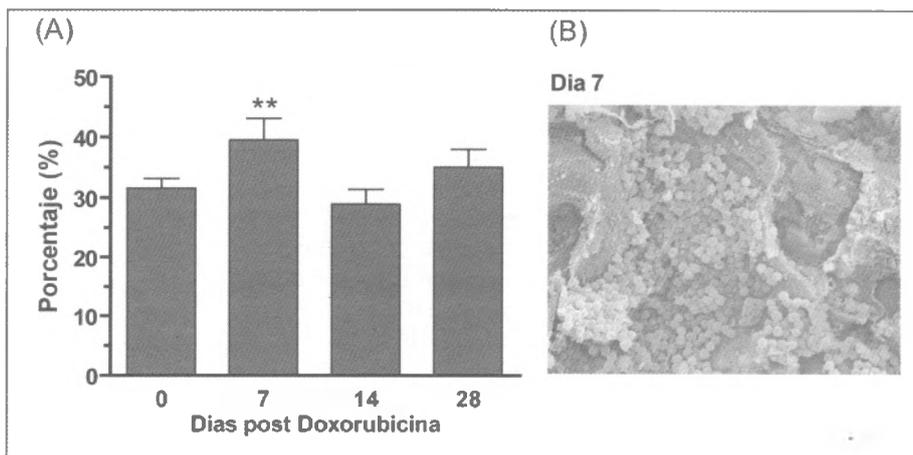


Figura 3: Hematocrito y glóbulos rojos renales luego de la administración de Doxorubicina (11 μ g/g). (A) Hematocrito expresado como la media \pm SD de tres experiencias diferentes (6 animales por lote). Se observó un ascenso significativo al día 7 post tratamiento. **: $p < 0.01$. (B) Imagen obtenida por MEB (1500x) de una muestra de riñón a los 7 días luego de la injuria con doxorubicina donde se encontraron abundantes glóbulos rojos ocupando el espacio intersticial periglomerular.

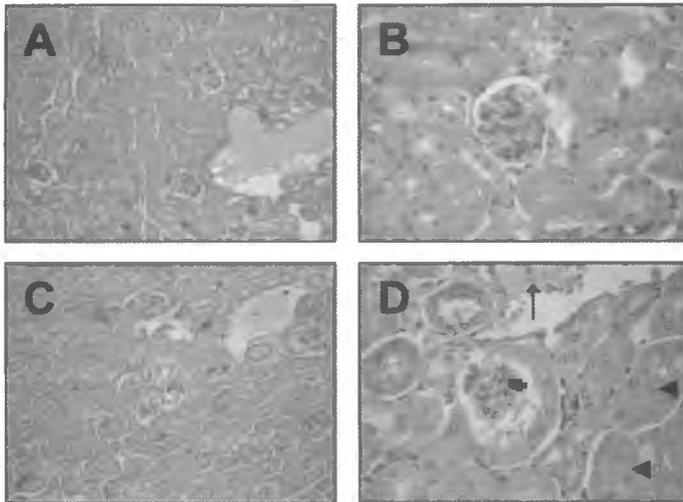


Figura 4: Imágenes de corteza renal observadas por microscopía óptica (H/E). A y B tejido renal normal, C y D tejido renal a 28 días luego del tratamiento con Doxorubicina (11µg/g). En A, visión panorámica del preparado (10x) observándose corpúsculos renales rodeados por túbulos y en el margen inferior derecho la presencia de un vaso sanguíneo. En imagen B (40x) glomérulo renal rodeado por cápsula de Bowman evidenciándose el espacio urinario. Se observa el epitelio cúbico con luz de aspecto regular en túbulos contorneados proximales (TCP). En las imágenes C y D (10x y 40x respectivamente), se aprecia injuria glomerular con oclusión de la luz capilar y acumulación de material eosinófilo amorfo hialino a nivel mesangial (◀). Los TCP muestran tumefacción y atenuación del citoplasma celular (◄). Se observa la presencia de abundantes hematíes intraluminales (↑).

evidenciada por la presencia de abundantes hematíes intraluminales (Fig. 4C y D).

Por medio de la técnica de PAS se agrega a las características anteriormente mencionadas con H/E en tejido renal normal la presencia del ribete en cepillo muy desarrollado en la superficie luminal y el claro límite exterior del ovillo capilar (Fig 5A y B). Por su parte, luego de aplicar la técnica de PAS a muestras de riñón de animales tratados (Fig. 5C y D), puede evidenciarse a los 28 días post-injuria una importante involución, atrofia y degeneración glomerular a nivel glomerular provocado por Doxorubicina. A esto se agrega la presencia de depósitos de sustancia PAS-positiva y una cápsula de Bowman engrosada mostrando un anormal epitelio cúbico. A nivel tubular, se observa importante tumefacción y degeneración, con disminución evidente del ribete en cepillo. El PAS confirma el infiltrado intersticial y la congestión capilar observada en los preparados con H/E.

Al observar la histoarquitectura del riñón mediante MEB luego del tratamiento con Doxorubicina pueden evidenciarse en forma tridimensional los cambios morfológicos que ocurren en los diferentes segmentos del nefrón. Los túbulos renales muestran importante desorganización de

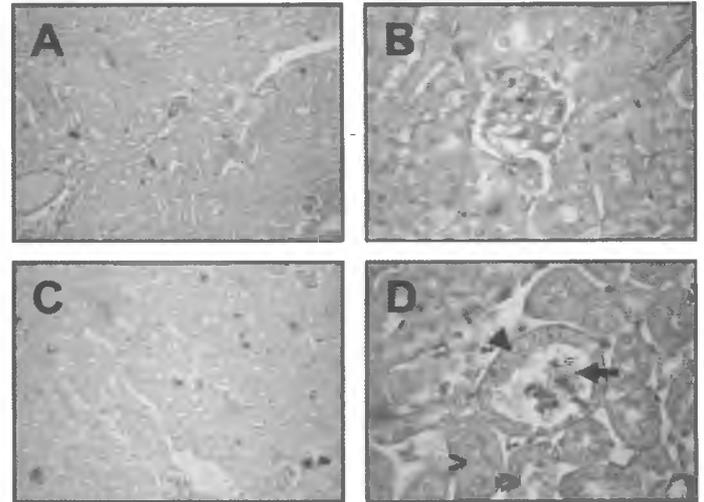


Figura 5: Imágenes de corteza renal observadas por microscopía óptica (PAS). A y B tejido renal normal, C y D tejido renal a 28 días luego del tratamiento con Doxorubicina (11µg/g). La imagen A muestra una panorámica a 10x de la corteza renal normal. En B, un glomérulo renal rodeado de túbulos contorneados (40x) evidenciando un ribete en cepillo muy desarrollado y el claro límite exterior del ovillo capilar. Las imágenes C y D (10x y 40x respectivamente) evidencian involución, atrofia y degeneración glomerular, con depósitos de sustancia PAS-positiva (◀) y cápsula de Bowman engrosada mostrando un epitelio cúbico (▲). Los túbulos contorneados se muestran tumefactos con disminución de su ribete en cepillo (>).

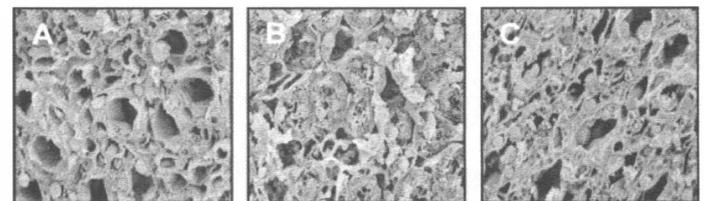


Figura 6: Túbulos contorneados renales obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (1400x). En A, túbulos renal normales; en B y C a los 14 y 28 días, respectivamente, luego de la administración de Doxorubicina (11µg/g), donde puede observarse distorsión de la histoarquitectura normal de los túbulos

su estructura normal a partir del día 14 post-Doxorubicina (Fig. 6). Esta desorganización se ve acentuada hacia el día 28 de la experiencia.

A nivel glomerular, la acción nefrotóxica de Doxorubicina se manifiesta a partir de los 7 días post injuria, evolucionando de forma que determina hacia el día 28 una intensa distorsión acompañada de depósitos de material, disminución pronunciada del espacio de Bowman y pérdida de la estructura de la cápsula de Bowman (Fig. 7).

Hacia el final de la experiencia las pruebas funcionales bioquímicas evidencian un ascenso estadísticamente signifi-

cativo ($p < 0.01$) en sus valores. En el día 28, la creatininemia se incrementó un 91,5% por encima del control, evidenciando una disminución del filtrado glomerular.

En tanto, la uremia experimentó un ascenso continuo y progresivo a partir de los 7 días post Doxorubicina, registrándose a este tiempo, una media de 42,5 mg/dl ($p < 0.01$). El incremento registró su máximo ascenso hacia el final de la experiencia, en un 64,83% por encima del control ($p < 0.01$)

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran una correlación directa entre la disminución de la celularidad renal y el aumento de la apoptosis, proponiendo que este proceso de muerte celular se halla implicado en la nefrotoxicidad de Doxorubicina. La visualización estructural con microscopía óptica (tinción con H/E y PAS), en concordancia con previos estudios²⁻⁵, demuestra claramente la injuria glomerular y tubulointersticial como causa importante de pérdida en la función renal que eventualmente progresaría hacia una insuficiencia renal crónica, inducida por una única dosis de Doxorubicina. Esta disfunción renal se pone de manifiesto por medio de la observación del aumento progresivo de la uremia a medida que avanzan las alteraciones estructurales. Además, los valores hallados de creatininemia indican una importante disminución del filtrado glomerular, reforzando de esta manera los hallazgos anatomopatológicos.

Por otro lado, el aumento significativo del hematocrito al séptimo día, podría revelar tanto una respuesta a la hipoxia tisular^{1,3} como a alteraciones hemodinámicas, en relación con las alteraciones observadas por MEB.

En conclusión, este estudio básico aporta nuevos conocimientos aplicables en el área clínica, acerca de los mecanismos de injuria renal por Doxorubicina, que se encontrarían implicados en los procesos de nefrosis en los pacientes bajo tratamiento con esta droga.

BIBLIOGRAFIA

1. Lukas KK, Wang Y, Gassmann M, Tay Y y Harris DC. HIF-1 expression follows microvascular loss in advanced murine Adriamycin Nephrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288:198–206, 2005.
2. Javaid B, Olson JL y Meyer TW. Glomerular Injury and Tubular Loss in Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol.* 12:1391–1400, 2001.
3. Fine LG, Bandyopadhyay D y Norman JT. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int.* 57:22–26, 2000.

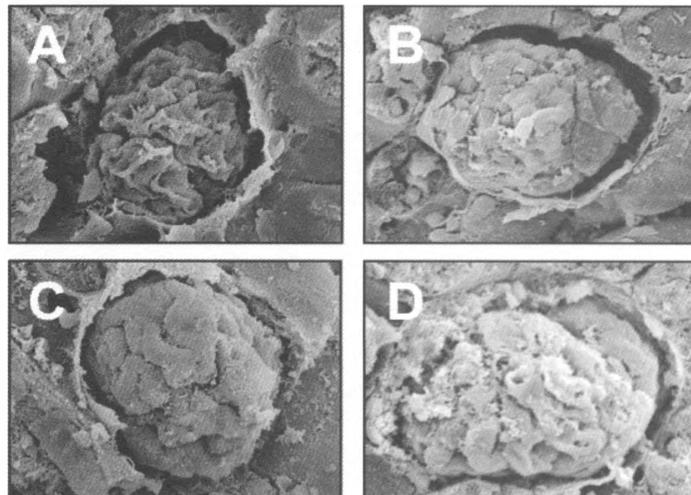


Figura 7: Glomérulos renales obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) 1400x. A, glomérulo renal normal. B, C y D, glomérulos post tratamiento con Doxorubicina (11ug/g). En imagen A se observa glomérulo normal con ovillo conservado y espacio de Bowman netamente visible. En imagen B, correspondiente a 7 días post tratamiento, se observan modificaciones en el ovillo notándose un edema pronunciado. Esto es más evidente a los 14 días post quimioterapia (imagen C) donde se observa además, una disminución pronunciada del espacio de Bowman. A los 28 días del estudio (imagen D) se agregan a las anteriores modificaciones: depósito de material y pérdida de la estructura de la cápsula de Bowman.

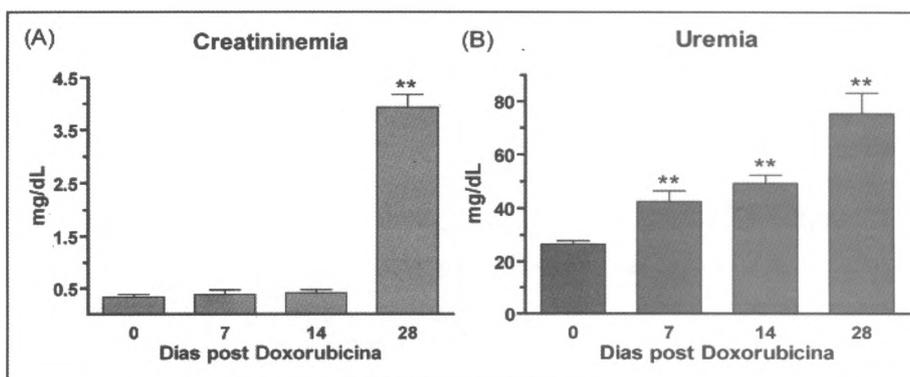


Figura 8. Pruebas bioquímicas funcionales renales. (A) Creatininemia y (B) Uremia luego del tratamiento con Doxorubicina (11ug/g). Los resultados son expresados como la media \pm SD de tres experiencias diferentes ($n = 6$ /lote), $**p < 0.01$.

4. Fine LG, Orphanides C y Norman JT. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl.* 65:74–78, 1998.
5. Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, Mecca G y Remuzzi G. Adriamycin induced glomerulosclerosis in the rat. *Am J Kidney Dis.* 7:12–19, 1986.
6. Scholey JW, Miller PL, Rennke HG y Meyer TW. Effect of converting enzyme inhibition on the course of adriamycin-induced nephropathy. *Kidney Int.* 36:816–822, 1989.