

Antioxidantes enzimáticos en el tratamiento con gentamicina*

De la Cruz Rodríguez, Lilia C.; Del Sanzio, Elsa E.; Posleman, Sara E.

Instituto de Bioquímica Aplicada. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Diagonal 9 N° 1025 (B° PADILLA), 4000 San Miguel de Tucumán. TEL: 081-345233-FAX: 54-81-216513. Tucumán. República Argentina.

RESUMEN: En la eliminación renal de muchas drogas, el epitelio capilar renal se encuentra expuesto a su acción nefrotóxica, tal es el caso de los aminoglucósidos.

Estudios recientes sugieren que los metabolitos reactivos del oxígeno (ROM) serían mediadores de injuria tisular isquémica. En condiciones fisiológicas los ROM están regulados por enzimas con capacidad antioxidante.

En este trabajo se estudiaron los antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en 31 pacientes tratados con gentamicina (160 mg / 12 hs / 7 días). Los valores fueron tomados sin gentamicina (basal) y al 7° día de tratamiento (GENTA). Los valores obtenidos para GPx fueron: (basal) $\bar{x} = 58,957 \pm 5,811$ U/g Hb, (GENTA) $\bar{x} = 39,178 \pm 5,78$. Para GR (basal) $\bar{x} = 73,080 \pm 5,50$ U/gHb y (GENTA) $\bar{x} = 53,380 \pm 7,0$. La diferencia fue estadísticamente significativa para ambas enzimas $p < 0,001$. El malondialdehído (MDA) fue medido como marcador de lipoperoxidación, observándose valores (basal) $\bar{x} = 1,119 \pm 0,115$ y (GENTA) $\bar{x} = 4,093 \pm 0,395$ $\mu\text{mol/l}$ siendo el aumento con (GENTA) significativo $p < 0,001$. La funcionalidad renal se alteró con (GENTA) con un clearance de creatinina de $\bar{x} = 54,86 \pm 21,35$ ml/min y basal $\bar{x} = 127,60 \pm 13,74$ $p < 0,05$.

De estos resultados se concluye que la gentamicina provoca un aumento de lipoperoxidación acompañado de una disminución de enzimas antioxidantes, lo que llevaría a los cambios funcionales renales observados.

SUMMARY: Kidneys constitute the main excretory way of many antibiotics, not only through filtration but also as a result of tubular transport. Therefore, the wide area of glomerular capillary endothelium is exposed to high concentrations of antimicrobial drugs which cause very important side effects such as nephrotoxicity. It is known that, on small scale, in all cells, lipoperoxidation is produced which consist of the oxidative conversion of unsaturated fatty acids into lipid hydroperoxides. The aim of this work was to study superoxide dismutase (SOD), glutatión peroxidase (GPx) and glutatión reductase (GR) in patients treated with gentamicine via intramuscular. Malondialdehyde (MDA) was measured as indicator of lipoperoxidation. Blood samples from 31 patients suffering from different non-renal pathologies were studied. MDA, SOD, GPx and GR values were monitored before administration of 160 mg of gentamicine every 12 hours during 7 days (basal sample) and on the 7th day. It was found that MDA levels were significantly higher on the 7th day of treatment ($\bar{x} = 4,093 \pm 0,395$ $\mu\text{mol/l}$) than the basal samples ($\bar{x} = 1,119 \pm 0,115$). GPx levels were significantly lower ($\bar{x} = 39,178 \pm 5,78$ U/g Hb) and basal ($\bar{x} = 58,957 \pm 5,811$). GR levels were significantly lower ($\bar{x} = 53,380 \pm 7,0$) and basal ($\bar{x} = 73,080 \pm 5,50$ U/g Hb).

Significant differences in SOD levels between both groups were not found. The renal functionality was modified in patients treated with (GENTA), it was found a clearance of creatinine value $\bar{x} = 54,86 \pm 21,35$ ml/min and basal value $\bar{x} = 127,60 \pm 13,74$ $p < 0,05$. Of these results is concluded that gentamicine would cause a lipoperoxidation increase accompanied of decrease antioxidants enzymes levels, being able to be cause of the observed functional changes.

Introducción

Los riñones constituyen la principal vía excretora de muchas drogas, entre ellas los aminoglucósidos, no sólo mediante la filtración sino como resultado del transporte tubular. Por lo tanto la extensa área de superficie del endotelio capilar glomerular y tubular se encuentra expuesta a elevadas concentraciones de esta droga que trae como con-

secuencia efectos secundarios muy importantes como la nefrotoxicidad.

Estudios in vitro del "binding" de la gentamicina a fosfolípidos individuales (1), han demostrado que los fosfolípidos ácidos son los receptores para la unión con esta droga. En pequeña escala, en todas las células se produce lipoperoxidación que consiste en la conversión oxidativa de los ácidos grasos insaturados en hidroperóxidos lipídicos como producto primario.

Estudios recientes sugieren que los metabolitos reactivos del oxígeno (ROM) incluidos los radicales libres, por ejemplo anión superóxido y radical hidroxilo han sido postulados como mediadores importantes de la injuria tisular isquémica y de la

(*) Proyecto subsidiado por el Consejo de Ciencia y Técnica de Tucumán (COCYTUC) y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Univ. Nac. de Tucumán (CIUNT).

fisiopatología de enfermedades renales (2-5). En particular se ha demostrado *in vivo* la generación de peróxido de hidrógeno en dos modelos de falla renal aguda (6,7). El incremento en los niveles de especies oxidantes puede ocasionar un daño celular reversible o irreversible. Muchos de los ROM pueden modificar moléculas esenciales tales como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos llevando a cambios en su función y eventualmente a la muerte celular. Basado en estos conceptos se ha demostrado *in vivo* la peroxidación lipídica como un marcador de injuria por ROM (8,9).

También se demostró recientemente (10,11) aumento de la generación de peróxido de hidrógeno en cortes de riñón de rata, en presencia de endotoxinas y en tratamiento con drogas como la gentamicina.

En condiciones fisiológicas la producción de ROM está balanceada por la actividad de varias enzimas con capacidad antioxidante, entre las que se incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), asociadas a una alta concentración de antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas E y C.

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo de antioxidantes enzimáticos en pacientes tratados con gentamicina y se relacionó con la función renal. Para ello se dosaron antioxidantes individuales tales como enzimas que participan en el metabolismo celular normal, como desactivadores de reacciones en cadena producidas por radicales libres y que provocan cambios estructurales a nivel celular. Entre ellas se estudió la SOD, la GPx y la GR. La medida del MDA fue usada para demostrar lipoperoxidación, que es mediada por radicales libres, los peróxidos lipídicos. Se midió el clearance de creatinina como prueba de funcionalidad renal.

Material y métodos

Pacientes y muestras:

Se estudiaron 31 pacientes tratados con gentamicina. Se incluyeron individuos de ambos sexos cuyas edades oscilaron entre 16 y 62 años que no presentaban patologías renales ni diabetes. La gentamicina fue administrada por vía intramuscular en dosis de 160 mg cada 12 horas durante 7 días.

Muestras: Se tomaron 5 ml de sangre a cada paciente antes de la administración del antibiótico (muestra basal) y al 7º día de tratamiento. Las

muestras se colocaron en tubos tratados con EDTA y se analizaron dentro de las 24 horas de la extracción.

Se centrifugaron 2 ml de sangre total a 2.000g durante 10 minutos, el plasma obtenido se utilizó para el análisis de GR, MDA y creatinina.

El resto se utilizó para el análisis de SOD y GPx. Muestras de orina de 12 horas fueron recolectadas de cada paciente antes y al 7º día de la administración de gentamicina.

Métodos: Se analizó el MDA mediante reacción colorimétrica. El cromógeno fue 1-metil 2 fenilindol (MPI) a pH ácido, la condensación de una molécula de MDA con dos moléculas de MPI produce la formación de un cromóforo con absorbancia a 586 nm (2).

La SOD, GPx y GR se analizaron con reactivos de Randox Laboratories LTD, Ardmore Road, Crumlin Co Antrim, United Kingdom BT 29/49 Y USA.

El dosaje de creatinina se realizó con reactivos Winer lab. Rosario Argentina.

Análisis estadístico: Se utilizó el t-test de Student. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Resultados

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo de factores implicados en la protección antioxidante, en 31 pacientes sometidos a tratamiento con gentamicina.

La Tabla muestra que después de 7 días de tratamiento la media observada para MDA $\bar{x} = 4,093 \pm 0,395$ $\mu\text{mol/l}$ fue altamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al valor basal sin gentamicina de los mismos pacientes $\bar{x} = 1,119 \pm 0,115$. Esta elevación de los valores de MDA estaría indicando un aumento de la peroxidación lipídica, provocada por una mayor producción de peróxidos orgánicos. Estos resultados sugieren la existencia de un daño oxidativo.

Una situación de estrés oxidativo se puede definir por el aumento en la concentración de las especies reactivas o por una disminución de los niveles de antioxidantes tisulares (9,10). En este trabajo se estudiaron antioxidantes tisulares enzimáticos como la GPx, GR y SOD.

La tabla muestra la disminución que sufre la GPx después de 7 días de tratamiento con gentamicina $\bar{x} = 39,178 \pm 5,78$ U / g Hb con respecto a la media basal $\bar{x} = 58,957 \pm 5,811$ de los mismos pacientes. La GPx degrada el peróxido de hidrógeno

Comparación de marcadores antioxidantes antes y después de siete días de tratamiento con gentamicina

MARCADOR	BASAL Media \pm D S	GENTA Media \pm D S
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	1,119 \pm 0,115	4,093 \pm 0,395
GPx U/g Hb	58,957 \pm 5,811	39,178 \pm 5,780
GR U/g Hb	73,080 \pm 5,500	53,380 \pm 7,000
SOD U/g Hb	965,900 \pm 290,000	981,800 \pm 163,400

Abreviaturas. MDA: malondialdehído, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa y SOD: superóxido dismutasa

Basal: muestras sin gentamicina (día 0)

GENTA: muestras con gentamicina (día 7)

Las diferencias fueron estadísticamente significativa $p < 0,001$ para MDA, GPx y GR.

empleando al glutatión reducido (GSH) como dador de hidrógeno.



Los valores de GR fueron significativamente menores en el tratamiento con gentamicina $\bar{x} = 53,380 \pm 7,000$ U/g Hb ($p < 0,001$) con respecto al valor basal $\bar{x} = 73,080 \pm 5,500$. La GR NADPH dependiente reduce el glutatión oxidado (GSSG) formado por acción enzimática de GPx.

La SOD no presentó diferencia estadística significativa (NS), valor basal

$\bar{x} = 965,90 \pm 290,00$ U/gHb y post-gentamicina $981,80 \pm 163,40$.

El clearance de creatinina medido como marcador de funcionalidad renal dio una diferencia estadística significativa, $p < 0,05$, a los 7 días de tratamiento con el aminoglucósido $\bar{x} = 54,86 \pm 21,35$ ml/min, comparado con su valor basal $\bar{x} = 127,6 \pm 13,74$.

Discusión

Muchos trabajos se han realizado en la última década tratando de entender los mecanismos por los cuales se produce la nefrotoxicidad por diferentes drogas, entre ellas los aminoglucósidos. Entre los parámetros establecidos figuran factores hemo-

dinámicos y factores tubulares. Nosotros en un trabajo anterior (12) detectamos pérdida de enzimas de membrana de las células de ribete en cepillo del túbulo proximal renal, por efecto de drogas como la ciclosporina, dando como un primer blanco de acción de esta droga la membrana celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento con gentamicina provoca una mayor lipoperoxidación estudiado por el aumento del nivel de MDA, junto con niveles bajos de GPx y GR. La disminución de los niveles de GPx y GR en los pacientes tratados con aminoglucósidos se interpreta como consumo de estas enzimas por ser antioxidantes primarios cuya función es neutralizar radicales libres, los peróxidos lipídicos formados como reacción intermedia en la acción del aminoglucósido sobre los fosfolípidos ácidos (1) y el peróxido de hidrógeno formado como metabolito intermedio. Estudios radioisotópicos (13) han demostrado que luego de la administración de gentamicina marcada hay una intensa captación por parte de las membranas de las células tubulares seguida de una rápida internalización. Estudiando las modificaciones del binding de gentamicina con enzimas proteolíticas, grupos sulfhidrilicos, así como fosfolípidos individuales, se ha demostrado que los fosfolípidos ácidos son los receptores para la unión con la gentamicina (14).

Estudios recientes (5,15-17) muestran que los ROM per se pueden comprometer la función renal, disminuyendo la filtración glomerular, o bien se acepta que la expresión de injuria renal está deter-

minada no sólo por los ROM sino también cuando el sistema de defensa antioxidante, disminuye o se altera. En nuestro trabajo se observa una alteración de la filtración glomerular por disminución del clearance de creatinina, coincidente con el aumento de MDA y disminución de GPx y GR.

De estos resultados se concluye que la gentamicina provocaría una injuria renal, medida por cambios en la filtración glomerular a través de un mecanismo mediado por radicales libres, los peróxidos lipídicos y otros metabolitos reactivos intermedios formados por acción del aminoglucósido sobre los fosfolípidos de la membrana llevando a la célula renal a cambios estructurales y funcionales importantes que culminarían con la necrosis tubular renal. Consideramos que esclarecer las causas de nefrotoxicidad por drogas reside en la comprensión de las alteraciones subcelulares y bioquímicas que llevan a la alteración de la integridad de la célula tubular renal.

Agradecimientos

Al Consejo de Ciencia y Técnica de Tucumán (COCYTUC) y Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) por los subsidios otorgados.

A Wiener Lab, Rosario, Argentina por la donación de Kits para dosar creatinina.

Al Ing. Miguel Morandini por su colaboración en el estudio estadístico.

Bibliografía

- 1- Sastrasinh, M., Knauss, T.C., Winberg, J.M., Humes, H.D., Identification of the aminoglycoside binding site of renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **222**:350 - 359, 1982.
- 2- Paller, M.S., Hoidal, J.R., Ferris, T.F. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* **74**:1156-1164, 1984.
- 3- Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol* **251**: F 765- F 776, 1986.
- 4-Walker P D, Shah S V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol - induced acute renal failure. *Am J Physiol* **255**: F 438 F 443, 1988.
- 5- Walker P D, Shah S V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin - induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* **81**: 334- 341, 1988.
- 6- Guidet B, Shah S V. Enhanced in vivo H₂ O₂ generation by rats kidney in glycerol - induced renal failure. *Am J Physiol* **257**: F 440 F 445, 1989.

- 7- Guidet B R, Shah S V. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* **256**: 158-164, 1989.
- 8- Demling R H, Lalonde C, Jin L Y, Ryan P, Fox R. Endotoxemia causes in creased lung tissue lipid peroxidations in unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* **60**: 2094-2100, 1986.
- 9- Demling R H, Lalonde C, Seekam P A, Fiore N. Endotoxin causes hydrogen peroxide induced lung lipid peroxidation and prostanoid production. *Arch Surg* **123**: 1337-1341, 1988.
- 10- Walker P and Shah S. Reactive oxygen metabolites in endotoxin - induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* **38**: 1125-1132, 1990.
- 11- Mc Kusber Ch, Rodríguez M L, Lamont Yolán y Fitzgiral P. Estado de antioxidantes totales. *Rev Randox Lab USA* 1995.
- 12- De la Cruz Rodríguez L C, Del Sanzio E E, Posleman S E, Semrik S M y Santos J C. Nefrotoxicidad por ciclosporina evaluado mediante la gamma glutamil transpeptidasa urinaria - *Nefrología Latinoamericana* **3**: 300-305, 1996.
- 13- Silverblat F J, Craig K. Autorradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* **15**: 335, 1979.
- 14- Kanuss T C, Weinberg J M, Humes H D. Alteration in renal cortical phospholipid content induced by gentamicin: time course, specificity and subcellular localization. *Am J Physiol* **244**: 535-536, 1983.
- 15- Yoshioka T and Ichikawa I. Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte - derived reactive oxygen Species. *Am J Physiol* **257**: F 53 - F 59, 1989.
- 16- Johnson R J, Couser W G, Chi E J, Adler S, Klebanoff S J. New mechanism for glomerular injury myeloperoxidase hydrogen peroxide - halide system. *J Clin Invest* **79**: 1379 - 1387, 1987.
- 17- Bird J E, Milhoan K, Wilson C B, Joung S G, Mundy C A, Parthasarathy S, Blantz R C. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat. The relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest* **81**: 1630 - 1638, 1988.