



La ciclosporina A produce anión superóxido intracelular en el endotelio

J. Navarro-Antolín y S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Instituto «Reina Sofía» de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN). Madrid.

INTERES BIOMÉDICO DEL ANIÓN SUPERÓXIDO

Muchas enfermedades están asociadas con una sobreproducción de radicales libres del oxígeno generadores de daño celular. Entre estos radicales, el anión superóxido ha recibido especial atención por su participación en patologías con alta prevalencia, como por ejemplo, el daño por reperfusión (tras infarto miocárdico o accidente cerebrovascular) o los procesos inflamatorios como la artritis. La importancia del anión superóxido en términos de utilidad terapéutica queda reflejado en el esfuerzo, culminado ya al menos en animales¹, por encontrar agentes mimetizadores de la actividad superóxido dismutasa (eliminación de anión superóxido) con estabilidad química y biológica *in vivo*.

Para Irwin Fridovich, pionero en el estudio de la superóxido dismutasa, el anión superóxido es la especie reactiva del oxígeno inicial en la formación de lo que denomina «una progenie de especies reactivas»². La importancia de este radical en el conocimiento de la señalización celular queda de manifiesto si recordamos que fue precisamente la inhibición de la acción del entonces llamado factor relajante derivado del endotelio por parte del anión superóxido³⁻⁵ la llave para el descubrimiento de la capacidad que tienen los tejidos de mamífero para sintetizar óxido nítrico (NO)^{6,7}.

El interés del anión superóxido en la patología vascular queda reflejado por la existencia de una disminución del NO libre debido a un aumento del flujo del anión superóxido en la pared vascular de procesos tan frecuentes como aterosclerosis⁸, hipercolesterolemia⁹, hipertensión¹⁰, o diabetes¹¹.

Correspondencia: Dr. J. Navarro-Antolín
Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC
Velázquez, 144
28006 Madrid

LOS MECANISMOS POR LOS QUE LA CsA PRODUCE EFECTOS SECUNDARIOS NO SON CONOCIDOS

Hasta ahora se ha considerado que los efectos tóxicos de los fármacos inmunosupresores inhibidores de la calcineurina, como es la CsA, podían depender también de la inhibición de este enzima. Entre estos efectos tóxicos se encuentra el daño sobre el endotelio vascular, manifestado en ocasiones como hipertensión o como síndromes que recuerdan a la afectación vascular de la anemia hemolítica microangiopática (microangiopatía trombótica). Hasta la fecha no se ha demostrado relación entre la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina y estos efectos secundarios, por lo que se hace necesario estudiar otros mecanismos alternativos que permitan explicarlos.

Cada vez hay más evidencias de la participación del estado redox en el control del tono vascular (así, y en relación al tema tratado aquí, se ha implicado la acción protectora de la superóxido dismutasa en la hipertensión producida por CsA¹² y recientemente se involucra la formación de peroxinitrito (especie reactiva altamente oxidante, que procede de la formación previa y simultánea de NO y anión superóxido) en la etiopatogenia de cuadros relacionados con la microangiopatía trombótica, como la del síndrome hemolítico-urémico¹³. Es decir, el anión superóxido está implicado indirectamente en la hipertensión asociada a la CsA, y el peroxinitrito (procedente de una formación previa de anión superóxido) puede formar parte de la etiopatogenia de un cuadro, como es la microangiopatía trombótica, que tiene como una de sus causas asociadas el tratamiento con CsA.

La acumulación de especies reactivas del nitrógeno procedentes del óxido nítrico, así como el aumento de expresión de su enzima productor y su ARN mensajero por la inducción transcripcional que la CsA realiza sobre el gen que codifica la óxido nítrico sintasa endotelial han sido aportaciones de nuestro grupo¹⁴⁻¹⁷. Ahora nos planteamos si la CsA es capaz de producir anión superóxido, como po-

tencial agente regulador (por sí mismo o por sequestrado de NO) y como paso previo para la formación del radical altamente oxidante peroxinitrito.

DIFICULTAD METODOLÓGICA PARA DETECTAR EL ANIÓN SUPERÓXIDO

La producción espontánea y enzimática de anión superóxido está demostrada. La inestabilidad del anión superóxido en soluciones acuosas es un problema añadido para su detección y cuantificación, que se ha tratado de solucionar aprovechando su reacción con varias moléculas «detectoras». Algunos procedimientos utilizados incluso en publicaciones recientes se han desechado por actuar el propio detector como fuente de anión superóxido. Es el caso de la luminiscencia de la lucigenina, la luminiscencia del luminol o la reducción del nitroazul de tetrazolio².

Los detectores considerados más específicos para la detección del anión superóxido (ferricitocromo c y los compuestos atrapadores de spin) no son totalmente específicos. Así, otros agentes pueden reducir ferricitocromo c, y otros oxidantes pueden transformar los atrapadores de spin a sus derivados hidroxiperóxidos capaces de dar señal detectable mediante resonancia electrónica paramagnética. Se hace necesario, por tanto, conferir especificidad a la detección mediante los controles adecuados. Recientemente se propone evaluar la producción de anión superóxido mediante la capacidad que tiene este radical de inactivar centros de Fe y S en enzi-

mas del tipo de la aconitasa. No obstante la especie reactiva peroxinitrito también lo hace².

La fluorescencia emitida por la etidina, forma oxidada de la sonda dihidroetidina (permeable a la membrana celular), se está reconociendo como un método con especificidad para la evaluación de la producción de anión superóxido¹⁸. Para sondas permeables del tipo de la dihidroetidina, una preincubación relativamente larga de una hora (que asegura una buena cantidad de la sonda en el compartimento intracelular) y la detección de la fluorescencia mediante un citómetro de flujo, permitiría evaluar la oxidación intracelular acumulada de la sonda, reflejo de la producción de anión superóxido. El resultado citométrico queda expresado en forma de intensidad media de fluorescencia para varios miles de células.

EL ENDOTELIO TRATADO CON CsA ACUMULA INTRACELULARMENTE ANIÓN SUPERÓXIDO

Dada la dificultad de «atrapar» la producción de anión superóxido y la documentada falta de especificidad de los sistemas de detección, se hace necesario comprobar la sensibilidad en cada sistema celular y conferirle especificidad. En el caso de la dihidroetidina, la sensibilidad puede estimarse evaluando la oxidación de la sonda por diferentes concentraciones de un productor conocido de anión superóxido como, por ejemplo, la dimetoxinaftoquinona (DMNQ) (fig. 1A). La especificidad debe ase-

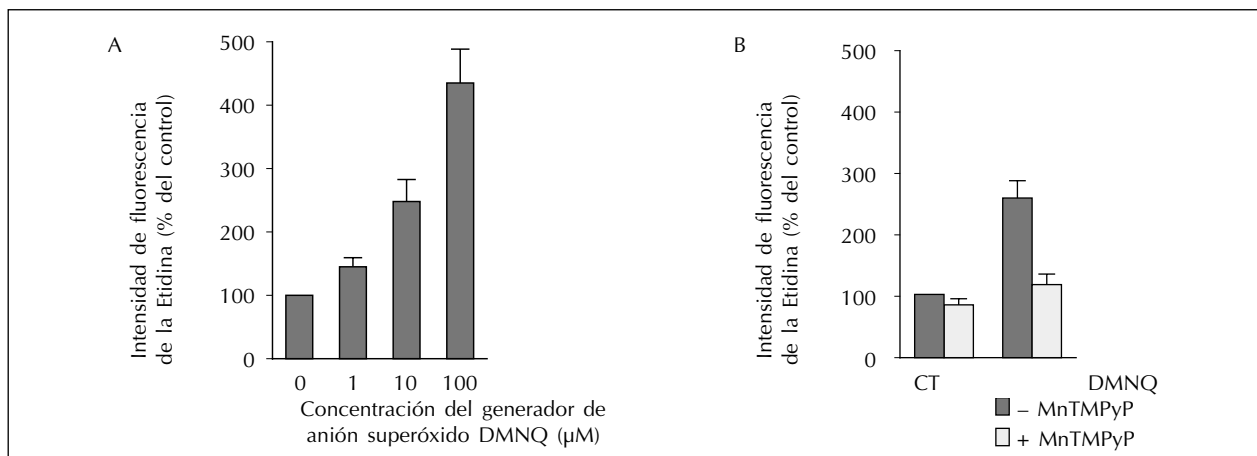


Fig. 1.—La sonda con capacidad fluorescente DHE es capaz de detectar intracelularmente en el endotelio la formación de anión superóxido producido por el compuesto DMNQ. A: La monocapa de BAEC fue preincubada durante 1 hora con DHE y posteriormente se añadió durante 2 horas la dosis indicada del generador de anión superóxido DMNQ. Se evaluó la intensidad de fluorescencia intracelular mediante citometría de flujo. B: Pasada la primera media hora de preincubación con la sonda se añadió 50 μM del mimético lipofílico de la superóxido dismutasa MnTMPyP y luego se añadió DMNQ (10 μM) por dos horas más.

gurarse mediante la inhibición de la oxidación de la sonda por procedimientos que inhiban la acumulación intracelular del anión superóxido, como hacen los análogos lipofílicos de la superóxido dismutasa (fig. 1B) y confirmándose que en el sistema celular considerado la sonda no se oxida por otras especies reactivas, tales como agua oxigenada, óxido nítrico y peroxinitrito (fig. 2).

La detección mediante citómetro de flujo de la fluorescencia intracelular acumulada en BAEC preincubadas con dihidroetidina y tratadas con CsA pone de manifiesto la oxidación de la sonda a etidina, su forma fluorescente, en un proceso dependiente del tiempo y de la dosis. La acumulación intracelular de anión superóxido en la monocapa de células endoteliales tratada con CsA es inhibible por el agente mimetizador de la superóxido dismutasa MnTMPyP (fig. 3).

EL ANIÓN SUPERÓXIDO COMO BASE DEL DAÑO ENDOTELIAL POR CsA

Demostrada la formación de anión superóxido intracelular en el endotelio tratado con CsA se hace necesario reevaluar cuál es el efecto neto del NO producido por este fármaco. Dependiendo de la intensidad, cinética de producción y accesibilidad entre el anión superóxido y el NO generados, resultará un balance neto de NO libre (NO bioactivo), así como la posibilidad de formación de peroxinitrito.

La formación de peroxinitrito a partir de NO y anión superóxido es una de las reacciones más rápidas de la biología y está casi exclusivamente limitada por la difusión de las dos especies reactivas (fig. 4). Esta alta reactividad entre las dos especies ha producido que en la literatura de los últimos años se proponga la participación del peroxinitrito en sistemas en los que se ha demostrado la producción de NO y de especies reactivas del oxígeno, sin documentarse la difícil demostración de la formación de peroxinitrito.

La demostración de la formación de peroxinitrito conlleva evaluar los posibles efectos producidos por la presencia de esta especie reactiva tan altamente oxidante. Entre estas posibles dianas, Beckman ha propuesto la nitración del aminoácido tirosina que forma parte de la estructura de las proteínas. Para ello están disponibles comercialmente anticuerpos que reconocen la nitrotirosina¹⁸.

Una posible formación de nitrotirosina por CsA podría condicionar cambios funcionales de actividades enzimáticas que contribuyeran a los mecanismos de toxicidad por CsA.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este momento, tras la confirmación de una acumulación de anión superóxido intracelular, nuestros datos sugieren claramente el potencial altamente oxidante que tiene la CsA en el endotelio. La particularidad del endotelio de contar con

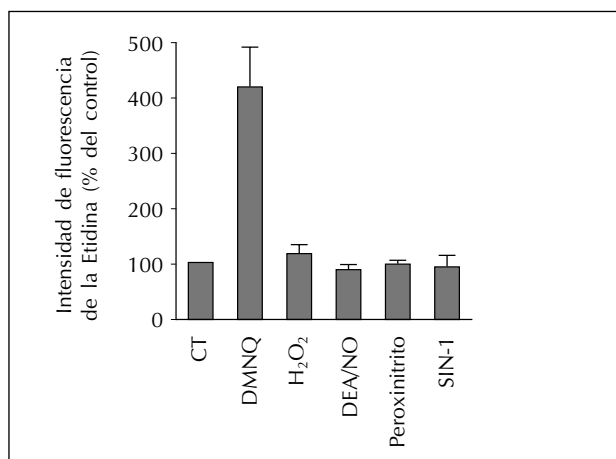


Fig. 2.—La DHE no detecta otras especies reactivas del oxígeno. Las células endoteliales, siguiendo el mismo protocolo que el descrito para la figura 1, se expusieron como se indica a 100 μM DMNQ, 100 μM H₂O₂, 100 μM DEA/NO (generador de NO), 100 μM peroxinitrito o 100 μM SIN-1 (generador de peroxinitrito).

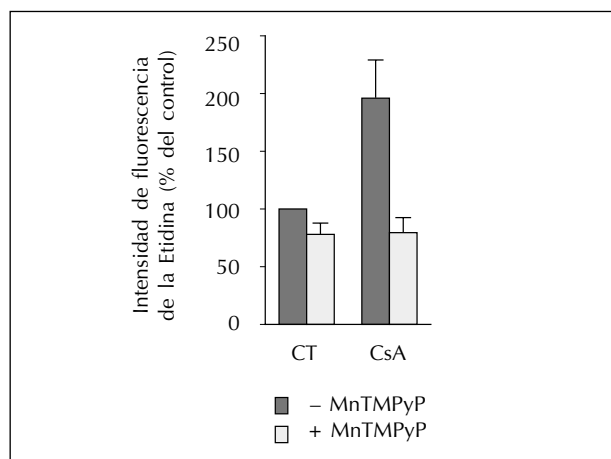


Fig. 3.—La CsA aumenta la acumulación intracelular de anión superóxido en un proceso que es inhibible por un análogo lipofílico de la actividad superóxido dismutasa (MnTMPyP). Las células endoteliales, siguiendo el mismo protocolo que el descrito para la figura 1, se expusieron como se indica a 50 μM MnTMPyP y a continuación se añadió 10 μM CsA.

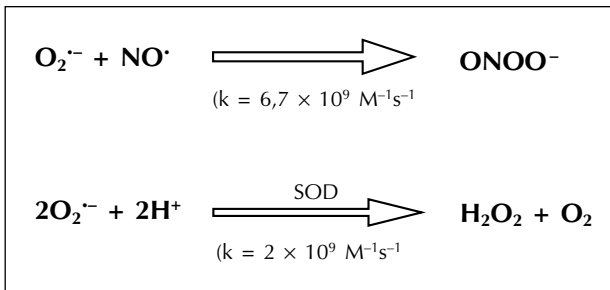


Fig. 4.—Velocidad de reacción del NO con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) y con la superóxido dismutasa (SOD). A partir de la formación de anión superóxido, la velocidad de formación de peroxinitrito (ONOO^-) al reaccionar con el NO^{\cdot} es tres veces mayor que la reacción de anión superóxido con la superóxido dismutasa²⁰.

una isoforma de la NOS, que como hemos demostrado recientemente puede ser regulada a nivel de la transcripción por la CsA (al contrario de lo que se ha demostrado con sus otras isoformas), lo convierten en una diana para los efectos secundarios del fármaco, ya que concentraciones nanomolares¹⁹ de anión superóxido y NO coincidentes y mantenidas en el tiempo pueden dar lugar a la formación de peroxinitrito y otros derivados altamente oxidantes que provoquen daño endotelial.

En el futuro, un intento de diseccionar los mecanismos por los que la CsA produce el anión superóxido, así como la demostración de la formación de peroxinitrito/nitrotirosina y sus implicaciones funcionales en el contexto del paciente inmunosuprimido permitirá el desarrollo de nuevas moléculas con mejor resultado terapéutico además de contribuir a esclarecer otros posibles mecanismos de acción de la CsA, que pudieran estar modificando desde rutas de señalización intracelular hasta la expresión de genes.

Agradecimientos y observaciones

Agradecemos al Dr. Diego Rodríguez-Puyol la donación de la Ciclosporina A. Agradecemos al Dr. Pedro Lastres su ayuda y continuo estímulo en el citómetro de flujo.

Javier Navarro Antolín es becario del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (BEFI 98/9070). Los estudios comentados en este trabajo han sido financiados en parte por la Sociedad Española de Nefrología (AYUDA 2/98), el Plan Nacional de I+D (CICYT SAF 97-0035) y la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.4/0032/1998).

BIBLIOGRAFÍA

1. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, MacArthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, Riley DP: A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286: 304-306, 1999.
2. Fridovich I: Superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot -}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272: 18515-18517, 1997.
3. Wei EP, Kontos HA, Christman CW, DeWitt DS, Povlishock JT: Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ Res* 57: 781-787, 1985.
4. Crygowski RJ, Palmer RM, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 544-456, 1986.
5. Rubanyi GM, Vanhoutte PM: Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H822-827, 1986.
6. Ignarro LJ: Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65: 1-21, 1989.
7. Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan KD: Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: some cautionary findings. In: Rubanyi GM, Vanhoutte VM (ed). *Endothelium-derived relaxings factors*. Karger, Basel, pp. 8-21, 1990.
8. Keaney JF Jr, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA: Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 95: 2520-2529, 1995.
9. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993.
10. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95: 588-593, 1997.
11. Graier WF, Posch K, Wascher TC, Kostner GM: Role of superoxide anions in changes of endothelial vasoactive response during acute hyperglycemia. *Horm Metab Res* 29: 622-626, 1997.
12. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX: Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* 23: 957-961, 1994.
13. Andreoli SP: The pathophysiology of the hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8: 459-564, 1999.
14. López-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Lamas S: Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 271: H1072-1078, 1996.
15. López-Ongil S, Hernández-Perera O, Navarro-Antolín J, Pérez de Lema G, Rodríguez-Puyol M, Lamas S, Rodríguez-Puyol D: Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 124: 447-454, 1998.
16. Navarro-Antolín J, Hernández-Perera O, López-Ongil S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Lamas S: CsA and FK506 up-regulate eNOS expression: role of reactive oxygen species and AP-1. *Kidney Int Suppl* 68: S20-S24, 1998.
17. Navarro-Antolín J, Rey-Campos J, Lamas S: Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A.

- A role for activator protein-1. *J Biol Chem* 275, 2000 (en prensa).
18. Viera L, Ye YZ, Estévez AG, Beckman JS: Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol* 301: 373-381, 1999.
 19. Pryor WA, Squadrito GL: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-722, 1995.
 20. Fridovich I: Superoxide dismutase, regularities and irregularities. *Harvey Lect* 79: 51-75, 1985.