

METALÓMICA Y METABOLÓMICA EN EL ESTUDIO DEL FRACASO RENAL AGUDO POR FÁRMACOS DE PLATINO, TERAPIAS NEFROPROTECTORAS Y BIOMARCADORES

M^a Milagros Gómez Gómez y Estefanía Moreno Gordaliza

Dpto. Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid

Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: mmgomez@ucm.es y emorenog@ucm.es

Introducción

Los fármacos antitumorales con base de Pt (cisplatino y sus derivados carboplatino y oxaliplatino) son los más utilizados en el tratamiento de tumores sólidos (1). Sin embargo, presentan una gran reactividad con proteínas, coordinándose a través de los grupos dadores (nitrógeno y azufre) presentes en histidina, metionina, cisteína y el grupo N-terminal, lo que se traduce en efectos tóxicos y resistencia al tratamiento (2). Carboplatino y oxaliplatino presentan efectos secundarios menores o más tolerables que cisplatino, y una menor resistencia al tratamiento. No obstante, el cisplatino es una opción irremplazable en multitud de tratamientos quimioterapéuticos, aunque su administración lleva asociada la aparición de fracaso renal agudo (FRA) en el 30 % de los pacientes tratados (3). Este hecho también supone una limitación de la dosis administrable del fármaco y, por lo tanto, de su eficacia y precipita la interrupción del tratamiento cuando aparecen indicios de daño renal, llevando a su sustitución por otras opciones farmacológicas menos eficaces (3).

Fruto de una larga colaboración entre nuestro grupo y el Laboratorio de Fisiopatología renal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (HGUGM), se han realizado estudios multidisciplinares con la combinación de técnicas analíticas y -ómicas y el empleo de modelos animales de fracaso y protección renal por fármacos de platino. Para ello, se han desarrollado métodos basados en espectrometría de masas elemental y molecular acopladas a técnicas de separación cromatográfica y electroforéticas, y métodos de bioimagen en tejido renal (4, 5).

Hemos demostrado que el daño renal causado por cisplatino se encuentra asociado a su acumulación en las células epiteliales del túbulo proximal renal (RPTECs) (6), que desciende desde la corteza a la médula renal externa (7), aunque también se han encontrado indicios de daño a nivel del túbulo distal en la médula (8).

Durante años, se ha dedicado un gran esfuerzo en tratar de desarrollar fármacos que pudieran evitar el FRA producido por cisplatino (9), ya que ello supondría la posibilidad de aumentar la dosis administrable y, por tanto, la eficacia del tratamiento oncológico. Sin embargo, en la actualidad no existe ningún fármaco en clínica que permita abordar este problema sin afectar a la eficacia del antitumoral (9). En colaboración con el HGUGM, hemos demostrado que cilastatina, un inhibidor específico de la dehidropeptidasa renal I (DHP-I) anclada en las balsas de colesterol, permite proteger el riñón del daño causado por cisplatino (10)

(Figura 1). Este hecho se comprobó tanto a nivel de cultivos primarios de RPTECs, como en los riñones de modelos animales de FRA inducido por cisplatino (7, 11), sin afectar al efecto antineoplásico. El mecanismo de la protección frente a la muerte celular por apoptosis está relacionado con la anulación de diversas etapas de la señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis, junto con la disminución de la acumulación intracelular de cisplatino (Figura 1).

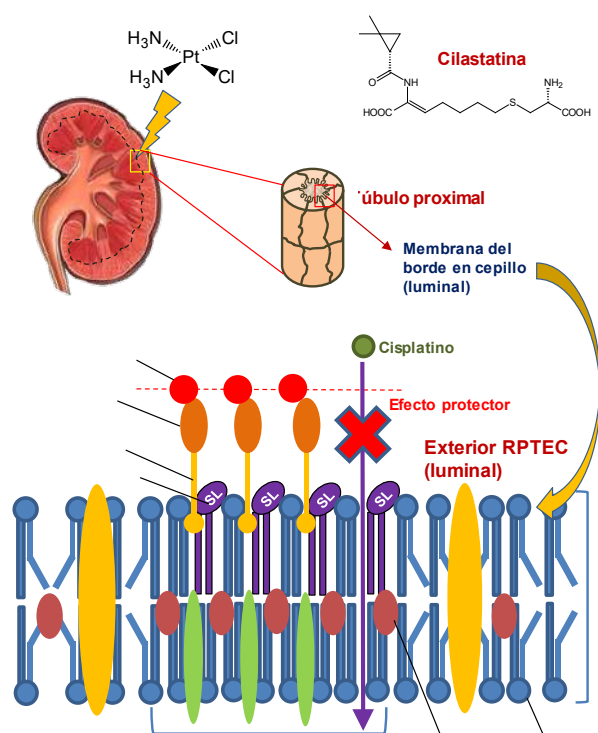


Figura 1. Efecto protector de cilastatina, por su unión a la DHP-I en las balsas de colesterol de las membranas de las RPTECs, sobre la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.

Recientemente, un estudio clínico realizado en el HGUGM en pacientes oncológicos con carcinomatosis peritoneal tratados con quimioterapia hipertérmica intraperitoneal (IPEC) con cisplatino, ha demostrado que cilastatina (administrada como fármaco comercial cilastatina+imipenem) reduce la incidencia de FRA, y por tanto incrementa en un 20% la tasa de supervivencia a la quimioterapia (12). Estos resultados tan prometedores dieron lugar a diversas patentes internacionales (propiedad del HGUGM) sobre el uso de

cilastatina como nefroprotector y a la superación exitosa de los correspondientes ensayos clínicos en fase I y está previsto que cilastatina entre próximamente en ensayos clínicos en fase II.

Dada la importancia del problema asociado al FRA, es necesario poder entender mejor los procesos moleculares asociados al daño renal causado por cisplatino, para poder descubrir nuevas dianas farmacológicas que permitan desarrollar terapias efectivas de protección renal, ya sean específicas o universales. Por otro lado, comprender mejor el efecto protector de cilastatina a nivel molecular podría también servir para la mejora y diseño de terapias nefroprotectoras. Asimismo, la diagnosis del FRA se basa normalmente en la medida de parámetros como la creatinina o el nitrógeno ureico en suero sanguíneo, que resultan elevados cuando ya el daño renal se ha desencadenado (3). Poder contar con nuevos biomarcadores que permitan el diagnóstico más temprano de esta patología es también necesario, además de poder contar con marcadores de la posible nefroprotección farmacológica.

Bioimagen elemental en tejidos por LA-ICP-MS

Aunque el cisplatino produce nefrotoxicidad, se ha observado que el oxaliplatino no la induce, mientras que el carboplatino lo hace sólo en concentraciones muy elevadas (13). Por ello, el estudio de la distribución de los tres fármacos en las diferentes zonas del riñón puede ayudar en la comprensión de los mecanismos de nefrotoxicidad y nefroprotección. La técnica por excelencia para el estudio de distribuciones elementales en muestras biológicas es la ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS. Sin embargo, para poder obtener imágenes cualitativas en tejidos comparables, es necesario emplear una metodología de estandarización que permita normalizar las bioimágenes obtenidas en diferentes sesiones de medida. Con este fin se desarrolló, en colaboración con el instituto BAM y la Universidad Humboldt de Berlín, un método de estandarización interna mediante el enriquecimiento de una tinta comercial con el patrón Ir y la impresión homogénea de dicha disolución sobre la superficie de láminas sagitales de tejido de 4 μm de grosor (para facilitar la completa ablación de la muestra) (14). Así se consiguió la obtención de bioimágenes cualitativas normalizadas con una resolución espacial de 8 μm , que permitió comparar la diferente distribución de los fármacos antitumorales de Pt en el riñón de ratas tratadas con los tres fármacos a dosis en las que aparece el FRA. Se observó que el cisplatino se distribuye principalmente por la zona de la corteza renal (6) (Figura 2); al igual que el carboplatino (14). Mientras que la distribución del oxaliplatino es más o menos homogénea por las zonas cortical y medular (14). Este hecho explicaría la ausencia de nefrotoxicidad en los tratamientos con oxaliplatino. La menor concentración de oxaliplatino encontrada en la corteza pudiera deberse a su expulsión de las células tubulares a través del transportador de la membrana apical

MATE2-K y esto podría explicar su carácter no nefrotóxico. También se observó el desplazamiento de elementos esenciales como Zn y Cu en las zonas de mayor acumulación de Pt (6), lo que se explica por la competencia de las drogas de platino por transportadores celulares, como el transportador CTR1 en el caso del Cu (6).

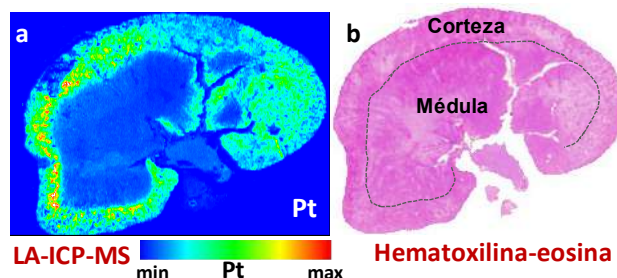


Figura 2. A) Imagen LA-ICP-MS de la distribución de Pt en riñón de rata tratada con 5 mg kg^{-1} de cisplatino. B) Tinción con hematoxilina-eosina de una sección adyacente de riñón.

Por otro lado, la coadministración a las ratas de cilastatina junto con cisplatino resultó en una disminución del Pt acumulado en la corteza (6), lo que se relaciona con la nefroprotección ejercida.

La obtención de bioimágenes elementales cuantitativas mediante LA-ICP-MS supone un reto que se abordó adaptando la metodología anterior para el análisis por dilución isotópica (LA-ICP-IDMS) aplicando el trazador (^{194}Pt) en la tinta de impresión (15). El error obtenido en la determinación de Pt fue del 10 % y el LOD de 50 fg. Se obtuvo una concentración de cisplatino en el riñón de 28.5 mg kg^{-1} , similar a la obtenida previamente por el grupo mediante la mineralización de riñones procedentes del mismo tipo de tratamientos (16). Se observó que a pesar de las mayores dosis de carboplatino administradas, su ratio de acumulación en el riñón es muy inferior al observado para cisplatino y oxaliplatino. La gran ventaja que presenta esta metodología, además de su relativa sencillez y bajo coste, es que se puede adaptar a cualquier elemento, ya que la tinta se puede enriquecer con los patrones y trazadores adecuados en cada caso, y a cualquier tipo de muestra biológica, lo que abre un gran abanico de posibilidades dentro de la Química Analítica.

Lipidómica en tejidos por MALDI-Imagen y LC-MS

En los últimos años, las técnicas de análisis masivo – ómicas basadas en espectrometría de masas, especialmente la metabolómica (tanto “no dirigida” como “dirigida”), junto con el empleo de herramientas quimiométricas, se perfilan como métodos muy útiles para la comprensión de los procesos moleculares asociados a las patologías renales y para el descubrimiento de biomarcadores diagnósticos (17). En colaboración con el HGUGM y la Universidad Humboldt de Berlín, hemos realizado estudios lipidómicos de nefrotoxicidad por cisplatino, mediante

el análisis MALDI-MS-Imagen de riñones de ratas (18). Los mapas de la distribución lipídica renal, con una resolución espacial de 100 μm , permiten, diferenciar lípidos que pudieran estar alterados en corteza o médula (Figura 3). Además, hemos desarrollado un método de estandarización basado en el empleo de patrones internos lipídicos impresos sobre el tejido, para la comparación de imágenes lipídicas en riñones analizados en diferentes sesiones (19).

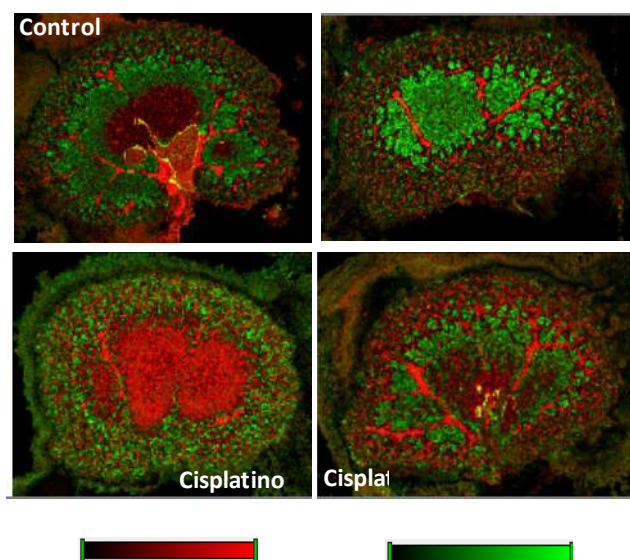


Figura 3. Imágenes MALDI-IMS superpuestas para el ácido fosfatídico (36:1) y fosfatidilinositol (34:0) en secciones de riñón de ratas control o tratadas con cisplatino y/o cilastatina. Adaptado de Ref. (20).

Los estudios realizados en los modos de ionización negativo y positivo muestran que ambos son complementarios y aportan imágenes útiles de los 76 lípidos que se ven alterados por el cisplatino, principalmente fosfolípidos, sulfátidos y cardiolipinas. Estos pudieran estar relacionadas con procesos topográficos, de señalización y estructurales en los tejidos dañados. Además, se demostró que la coadministración de cilastatina con cisplatino normaliza significativamente su distribución lipídica renal, y reduce la peroxidación lipídica (20). Este hecho se relaciona con el daño renal que sufre principalmente la corteza, donde el daño estructural en las células de los túbulos proximales pudiera originar la liberación de ciertos fosfolípidos de membrana y su migración a la médula a través de los túbulos renales. También se observa cierto daño en los túbulos renales distales, lo que podría explicar la disminución del nivel de ciertos fosfolípidos en la médula. Este estudio ha supuesto un avance en la comprensión de los daños en la estructura mitocondrial y en la membrana celular en relación con la apoptosis renal y el efecto nefroprotector de cilastatina.

Los buenos resultados obtenidos en los estudios anteriores nos han permitido avanzar hacia la aplicación de métodos de lipidómica dirigida mediante análisis LC-

Qtrap-MS/MS, más accesibles en los laboratorios de análisis. Tras la extracción de los lípidos de las cortezas y médulas renales, se analizaron 108 especies (21), que incluyen fosfolípidos, ésteres de colesterol y esfingolípidos. Se han observado alteraciones en los niveles de unos 60 lípidos en ambas estructuras renales asociadas al FRA por cisplatino. Por otro lado, la administración de cilastatina revierte la situación parcial o totalmente para muchos de los lípidos.

Los resultados obtenidos mediante MALDI-IMS y LC-MS/MS, junto con el análisis multivariante de componentes principales (PCA) (Figura 4) o análisis discriminante (PLS-DA o OPLS-DA), nos han permitido identificar posibles biomarcadores lipídicos de FRA en riñón, así como biomarcadores de protección con cilastatina.

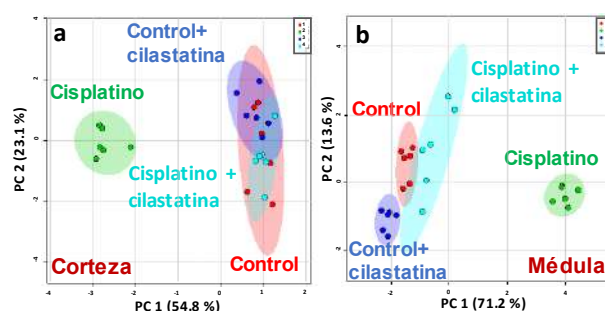


Figura 4. Análisis de componentes principales en base a lípidos de corteza (a) y médula (b) renal en ratas control o tratadas con cisplatino y/o cilastatina. Adaptado de Ref. (20).

Biomarcadores de FRA en fluidos biológicos

Nuestra hipótesis es que el FRA asociado a cisplatino podría producir alteraciones metabólicas en el riñón, más allá de los lípidos, a nivel de diversos tipos de rutas metabólicas, y que el tratamiento con cilastatina podría revertir algunos de esos cambios, proporcionando información adicional sobre los procesos de daño y protección renal. La detección de este tipo de alteraciones, además de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en el FRA, puede también permitir el descubrimiento de nuevos biomarcadores diagnósticos, siendo de especial interés en biofluidos de obtención poco invasiva (suero u orinas) en pacientes. Estos estudios los estamos realizando actualmente, en colaboración con el HGUGM y el CEMBIO (Universidad CEU San Pablo), en modelos de ratas tratadas con los fármacos, mediante metabolómica “no dirigida” con el empleo de técnicas analíticas complementarias de MS (LC-qTOF, GC-TOF o GC-Q y CE-TOF), que permitirán maximizar la información metabolómica cuantitativa y cualitativa; previa extracción/derivatización de los metabolitos.

Sobre los datos metabolómicos generados, se realizarán análisis univariante y multivariante y se calcularán las áreas bajo las curvas ROC para validar los biomarcadores encontrados, que se cuantificarán y validarán mediante LC-QqQ.

Referencias

1. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.*, 2019, 11, 97.
2. Esteban-Fernández D., Moreno-Gordaliza E., Cañas B., Palacios M.A., Gómez-Gómez M.M. Analytical methodologies for metallomics studies of antimoral Pt-Containing drugs. *Metallomics*, 2008, 2, 19-38.
3. Miller, R. P.; Tadagavadi, R. K.; Ramesh, G.; Reeves, W. B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, 2010, 2490-2518.
4. Moreno-Gordaliza E. et al. LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27, 1474-1483.
5. Moraleja, I. et al. A shotgun approach for the identification of platinum-protein complexes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407, 2393-2403.
6. Moreno-Gordaliza, E. et al. Elemental Bioimaging in Kidney by LA-ICP-MS as a Tool to Study Nephrotoxicity and Renal Protective Strategies in Cisplatin Therapies. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 7933-7940.
7. Lazaro A, et al. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2010, 334, 419-429.
8. van Angelen AA, Glaudemans B, van der Kemp AW, Hoenderop JG, Bindels RJ. Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrol Dial Transplant.*, 2013, 28, 879-889.
9. Yang, Y.; et al. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury. *Pharmacol. Ther.*, 2016, 163, 58-73.
10. Humanes B, et al. Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrol Dial Transplant.* 2017, 32, 1645-1655.
11. Lazaro A, et al. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int.*, 2012, 82, 652-663.
12. Zaballos, M.; et al. Effect of Cilastatin on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Patients Undergoing Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 1239.
13. Rabik C.A., Dolan M.E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.*, 2007, 33, 9-23.
14. Moraleja, I. et al.. Printing internal standards for LA-ICP-MS bioimages standarisation. Comparison of the different nephrotoxic behaviour of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 408, 2309-2318.
15. Moraleja I., et al. An approach for quantification of Pt distribution in tissues by LA-ICP-MS. Imaging using Isotope Dilution Analysis. *Talanta*, 2018, 178, 166-171.
16. Esteban-Fernández D., Verdaguer J.M., Ramírez-Camacho R., Palacios M.A., Gómez-Gómez M.M. Accumulation, fractionation and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32, 140-146.
17. Zhao, Y.-Y.; Lin, R.-C., Metabolomics in Nephrotoxicity. *Adv. Clin. Chem.*, 2014, 65, 69-89.
18. Moreno-Gordaliza, E.; et al. MALDI-LTQ-Orbitrap mass spectrometry imaging for lipidomic analysis in kidney under cisplatin chemotherapy. *Talanta* 2017, 164, 16-26.
19. Aboulmagd S., et al. Dual internal standards with metals and molecules for MALDI Imaging of kidney lipids. *Anal. Chem.*, 2017, 89, 12727-1273.
20. Moreno-Gordaliza E., et al., Lipid imaging for visualizing cilastatin amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity. *J. Lipid Res.* 2018, 59, 1561-1574.
21. Moreno-Gordaliza E., Marazuela M.D., Pastor O., Lázaro A, Gómez-Gómez M. M. Lipidomics reveals cisplatin-induced renal lipid alterations during acute kidney injury and their attenuation by cilastatin. *Int. J. Mol. Sci* 2021.