

1

**FUNCION RENAL EN RATAS CON CIRROSIS BILIAR PRIMARIA. IMPLICACIONES DEL OXIDO NITRICO Y PROSTAGLANDINAS.**

Criado-Jiménez M., Flores O., Hidalgo F., Sánchez-Rodríguez A., López-Novoa JM.

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Departamento de Fisiología y Farmacología. \*Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

Tanto el óxido nítrico (NO) como las prostaglandinas son reguladores de la función tubular. El objetivo del presente trabajo es estudiar la posible interacción de ambos mediadores en animales no instrumentalizados normales (C) o con retención renal de sodio inducida por ligadura del conducto biliar (LCB).

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas y se trataron durante 5 días con indometacina (INDO: 5mg/Kg/día) y/o L-NAME (4mg/Kg/día). Respecto al grupo C, los animales LCB presentan hipotensión arterial, disminución de la diuresis, natriuresis, kaliuresis y un aumento en la excreción urinaria de nitritos, sin cambios en el filtrado glomerular. El tratamiento con L-NAME en ratas C no modificó la natriuresis, mientras que en los animales LCB indujo una disminución de la natriuresis (de 0.03 ± 0.01 a 0.09 ± 0.04 mEq/día) y de la excreción urinaria de nitritos (de 320.9 ± 18.3 a 161.1 ± 6.1 nmol/24h). El tratamiento con INDO no indujo cambios de la natriuresis en el grupo C ni LCB, sin embargo, en este último se observó un aumento en la excreción urinaria de nitritos. El tratamiento con L-NAME + INDO indujo en ambos grupos una marcada disminución en la natriuresis (C: de 0.18 ± 0.024 a 0.01 ± 0.01; LCB de 0.03 ± 0.01 a 0.006 ± 0.01) y en las LCB una disminución en la excreción urinaria de nitritos (de 320.9 ± 18.3 a 280.3 ± 3.3), todo ello sin cambios en el filtrado glomerular.

Estos resultados sugieren que el aumento de la producción renal de NO juega un papel fundamental en la regulación de la excreción de sodio en animales control y sobre todo en LCB.

2

**COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LA PRAVASTATINA EN LA SINTESIS DE ADN DE CELULAS MESANGIALES PREVIAMENTE SINCRONIZADAS Y EN PROLIFERACION.**

S. Higuero, R. Romero.

Centro de Investigaciones Sanitarias y Centro de Experimentación Animal. Hospital Germans Trias y Pujol, Badalona, España.

El objetivo de nuestro estudio consistió en comparar los efectos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Pravastatina) en la síntesis de ADN estimulada por el suero en cultivos de células mesangiales (CM) que previamente habían sido sincronizadas o no.

Las CMs sincronizadas (Syn) (24h en medio de cultivo suplementado con el 0.5% de suero) y en proliferación (Pro) (24h en medio de cultivo suplementado con el 10% de suero) se estimularon durante 48h con medio de cultivo rico en suero, 20% y 10% respectivamente, para inducir mitogénesis. A la mitad de los cultivos se añadió diferentes concentraciones de Pravastatina (P) (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-9</sup>M). La síntesis de ADN se valoró mediante la incorporación de BrdU.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	Suero	10 <sup>-3</sup> M P	10 <sup>-6</sup> M P	10 <sup>-9</sup> M P
Syn	0.89±0.07	0.26±0.04*	0.37±0.04*	0.49±0.07*
Pro	1.16±0.05	0.68±0.08	0.97±0.08	0.96±0.09†

\* p<0.05 vs medio rico en suero

† p<0.05, CMs sincronizadas vs proliferación

Concluimos que las CMs que no se habían sincronizado requerían dosis más elevadas de Pravastatina que aquellas que habían sido sincronizadas.

3

**LA ANGIOTENSINA II REQUIERE LA PRESENCIA DE PDGF-BB O SUERO PARA INDUCIR LA SINTESIS DE ADN EN CULTIVOS DE CELULAS MESANGIALES.**

S. Higuero, R. Romero. Centro de Experimentación Animal y Centro de Investigaciones Sanitarias, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la angiotensina II (Ang II), sola o combinada con otros factores de crecimiento (PDGF-BB (6 ng/ml), bFGF (6 ng/ml), insulina (5 µg/ml) y suero (10%)), en la síntesis de ADN de cultivos de células mesangiales (CMs) sincronizadas. Las CMs se cultivaron durante 48 horas en medio de quiescencia (0.5% suero) y de proliferación (10% suero) suplementado con los diferentes factores de crecimiento citados anteriormente. Además se añadió Ang II (10<sup>-9</sup>M) a la mitad de los cultivos. La síntesis de ADN se valoró midiendo la incorporación de BrdU.

Los resultados mostraron que la Ang II, por sí misma, no modificaba la síntesis de ADN de los cultivos de CMs (0.24±0.01 vs 0.21±0.01), sin embargo ejercía un efecto sinérgico a la estimulación producida por el PDGF-BB (0.52±0.01 vs 0.57±0.01, p<0.05) y por el suero presente en el medio de proliferación (0.74±0.03 vs 0.81±0.02, p=0.09). El PDGF-BB fue el estimulador de la síntesis de ADN más potente, tanto para las CMs que crecían en medio de quiescencia (0.24±0.01 vs 0.52±0.01, p<0.05) como de proliferación (0.74±0.03 vs 0.86±0.03, p<0.05). El bFGF y la insulina estimularon de forma significativa la incorporación de BrdU en las CMs incubadas en medio de quiescencia (0.24±0.01 vs 0.3±0.01 y 0.31±0.02 respectivamente, p<0.05). Dicha estimulación no se vio alterada por la presencia de Ang II en el medio de cultivo. Concluimos que para estimular la síntesis de ADN, la Ang II requiere de la presencia de PDGF-BB o suero en el medio de cultivo.

4

**EFECTO DE LA CICLOSPORINA A (CsA) EN LA PRODUCCION DE ENDOTELINA (ET-1) Y EXPRESION DE PREPRO-ET-1 EN CELULAS ENDOTELIALES.**

S. López-Ongil, J.A. Ruiz-Ginés, G. Torrecillas, J. Lucio, L. Díez-Marqués, D. Rodríguez-Puyol.

Dpto. Fisiología y Farmacología, UAH. Sección de Nefrología. Hospital Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares. MADRID.

La CsA es un conocido agente inmunosupresor, ampliamente utilizado, pero su mayor inconveniente son sus dos principales efectos secundarios, la nefrotoxicidad y la elevada incidencia de hipertensión. El objetivo en este estudio fue estudiar el mecanismo responsable de esta hipertensión, valorando la capacidad de la CsA para modular la síntesis de ET-1 en células endoteliales de aorta bovina en cultivo (CEAB). La CsA indujo un aumento moderado, pero significativo, de la síntesis en ET-1 inmunoreactiva en CEAB, evidente a altas concentraciones del fármaco de forma tiempo-dependiente (CsA 1µM, 8h: 126±1%, CsA 1µM, 24c: 135±2%. Datos expresados en % de sus respectivos controles. \*p<0.05 vs control). Con objeto de analizar si este aumento era debido a una posible modulación del gen de la preproET-1 por parte de la CsA, se analizó, mediante técnicas de Northern blot, la expresión de dicho gen con distintas dosis y tiempos de CsA, pero no se observó ninguna variación. Teniendo en cuenta que la pro-ET-1 se convierte en ET-1 activa a través del enzima conversor de ET, se analizó la actividad de dicho enzima en CEAB incubadas con CsA 1µM durante 24h, encontrándose un incremento significativo de la misma (136±10% con respecto al control), que se correspondía con el aumento observado en la producción de ET-1. En conclusión, en la estirpe celular utilizada en el presente estudio, la CsA parece estimular la síntesis de ET-1 mediante la modulación del enzima conversor de ET, sin modificar en absoluto la expresión del gen. Este incremento de un péptido vasoconstrictor, junto con los restantes alteraciones que se producen a nivel de la pared vascular, puede estar implicado en la génesis de la hipertensión arterial inducida por la CsA.

1

5

**IMPORTANCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL FENOTIPO DE LAS CELULAS MESANGIALES HUMANAS.**

M.C. Iglesias, G. Torrecillas, I. Trabado, R. J. Bosch, F.J. Lucio, M.P. Ruiz. Dpto Fisiología y Farmacología. Universidad de Alcalá de Henares.

En condiciones fisiopatológicas, la composición de la matriz mesangial sufre importantes modificaciones, que pueden condicionar cambios funcionales en las células residentes glomerulares. Con objeto de estudiar las mismas, se cultivaron células mesangiales humanas (pases 4-8) en dos soportes diferentes, plástico (medio de cultivo estándar) y colágeno I (soporte patológico), analizando la respuesta contráctil y proliferativa celular. El peróxido de hidrógeno indujo una reducción del área de sección celular ( $80 \pm 3\%$  vs  $100\%$  del control,  $p < 0.05$ ) y un incremento de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina ( $162 \pm 8\%$  vs  $100\%$  del control,  $p < 0.05$ ) en las células cultivadas en colágeno, sin observarse modificaciones en los mismos parámetros en células en plástico. Esta ausencia de efecto contráctil no era debida a una hipocontractilidad generalizada dependiente del plástico, ya que las células en este soporte se contraían con otros agonistas. Con respecto a la proliferación celular, se observó tanto un incremento en la celularidad (Plástico:  $201.250 \pm 35.420$ , colágeno:  $472.916 \pm 42.325$ ) como en la incorporación de timidina (Plástico:  $14.605 \pm 1.020$ , colágeno:  $25.573 \pm 1.226$ ) en células cultivadas en colágeno. Estos resultados demuestran un comportamiento diferente de las células en matrices patológicas, lo que podría ser relevante a la hora de explicar la fisiopatología de determinados procesos renales.

6

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RELAJACION DEPENDIENTE DE GMPc EN CELULAS MESANGIALES: PAPEL DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA DE LA CADENA LIGERA DE LA MIOSINA.**

G. Torrecillas, MP Ruiz-Torres, A. Parrado, R.J. Bosch, ML. Díez-Marqués, M. Rodríguez-Puyol. Dpto. Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares.

La relajación celular dependiente de GMPc ha sido ampliamente estudiada, pero los mecanismos íntimos responsables de la misma no han sido totalmente explicados. Los presentes experimentos fueron diseñados para analizar estos mecanismos. Se valoró la contracción celular mediante la cuantificación de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM), en células mesangiales de rata en cultivo (CMR), previamente marcadas y después inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico.

Un análogo del GMPc, el dibutiril-GMPc (DB-GMPc) bloquea el efecto de la angiotensina II (AII,  $10\text{ nM}$ ) y de un ester de forbol (PMA,  $0.3\text{ }\mu\text{M}$ ) (C:  $100\%$ , AII:  $227 \pm 18\%$  \*, PMA:  $169 \pm 18\%$  \*, DB-AII:  $122 \pm 15\%$  \*, DB-PMA:  $131 \pm 18\%$  \*  $p < 0.05$  vs C). Este efecto en la contracción dependiente de AII y PMA era mimetizado por la somatostatina (ST), un estimulador exógeno de la síntesis de GMPc, y el zaprinast (Z), un bloqueante específico de la fosfodiesterasa de GMPc, potenciaba el efecto inhibitorio de bajas concentraciones de ST. La caliculina A (CAL,  $1\text{ nM}$ ), un inhibidor específico de fosfatasa, abolía completamente el efecto del DB en la reducción de la fosforilación de la CLM en presencia de PMA (C:  $100\%$ , PMA:  $170 \pm 15\%$  \*, DB-PMA:  $135 \pm 16\%$ , CAL-DB-PMA:  $177 \pm 18\%$  \*  $p < 0.05$  vs C) y de AII (C:  $100\%$ , AII:  $222 \pm 16\%$  \*, DB-AII:  $125 \pm 16\%$ , CAL-DB-AII:  $200 \pm 18\%$  \*  $p < 0.05$  vs C). Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo intracelular responsable de la relajación celular, usando GMPc como segundo mensajero intracelular, activando la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.

8

**ACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE AORTA BOVINA (CEAB).**

J.A. Ruiz-Ginés, S. López-Ongil, C. Pérez Caballero, G. Pérez de Lema, D. Rodríguez Puyol. Dept. Fisiología y Farmacología. Univ Alcalá de Henares. #Servicio Nefrología. Hosp. Univ. "Príncipe de Asturias". E-28871 Alcalá de Henares.

Los efectos de los radicales libres (RL) en distintas estirpes celulares son completamente heterogéneos, pudiendo actuar como metabolitos tóxicos y a la vez como moduladores intracelulares de factores de transcripción. Teniendo en cuenta que se ha descrito previamente la capacidad de determinados RL para estimular la proliferación de células de estirpe mesenquimal, el presente estudio se realizó para evaluar este mismo efecto en CEAB (pases 4-6). El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), administrado de forma puntual al principio de las incubaciones, no modificó la capacidad proliferativa de las CEAB, mediada como incorporación de timidina y recuento celular, en los distintos tiempos (0-48 h) y a las distintas dosis ( $1\text{ }\mu\text{M}$  -  $1\text{ mM}$ ) estudiados. Sin embargo, la suplementación de los medios de incubación con glucosa-oxidasa ( $1\text{ mU/ml}$ ), sustancia capaz de generar de forma mantenida  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indujo un estímulo de la proliferación celular a las 4-8 h de incubación, detectable como un incremento en la incorporación de timidina ( $171 \pm 11\%$  con respecto al control) así como un aumento en la celularidad ( $162 \pm 7\%$  con respecto al control). Este efecto desaparecía a las 24 h de incubación y, en ningún caso, se detectó toxicidad celular. Cuando se evaluó la capacidad de la glucosa-oxidasa para fosforilar las proteínas celulares en residuos tirosina, se observó un incremento en la incorporación de fosfatos en proteínas con un peso molecular aparente similar al de las MAP kinasas, lo que podría constituir la base molecular del efecto proliferativo descrito. En conclusión, los presentes resultados demuestran la capacidad de los radicales libres para estimular la proliferación de las CEAB, al menos en determinadas condiciones experimentales, proponiendo una activación de las MAP kinasas como uno de los mecanismos celulares responsables de la proliferación.

7

**LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA II ES INDUCIDA POR LA VITAMINA E EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS.**

G. Pérez de Lema, T. Parra, G. de Arriba, Susana López C. Rodríguez Puyol, I. Arribas. Dept. Fisiología y Farmacología. Univ Alcalá de Henares. #Servicio Clínicos. Hosp. Univ. "Príncipe de Asturias". E-28871 Alcalá de Henares. #Servicio Nefrología. Hosp. General. Univ. Guadalajara

La vitamina E (vit E) es un conocido antioxidante, y como tal produce acciones mediadas por metabolitos activos derivados del oxígeno (MADOs). La ciclooxigenasa II (COX II) es capaz de producir la contracción de la célula mesangial (CM) de una forma dosis dependiente ( $10^{-6}\text{ M}$  reduce el área de sección celular en un 30%), alterando de esta forma la función glomerular. Se ha demostrado que dicho efecto podría estar mediado por MADO, y de forma secundaria una serie de sustancias vasoactivas, pudiéndose esperar que la administración de Vit E modificara la contractilidad mesangial. La preincubación de estas células en cultivo durante 24 h con Vit E previene de forma efectiva la contracción celular inducida por  $\text{C}_6\text{S}_6$ , medida como reducción de área de sección celular.

	Control	Vit E $10^{-4}\text{ M}$	Vit E $10^{-5}\text{ M}$	Vit E $10^{-6}\text{ M}$
Etanol (30 min)	100 %	102 %	105 %	105 %
$\text{C}_6\text{S}_6$ (30 min)	70 %	95 %	87 %	87 %

Este efecto de la vit E podría estar mediado por la síntesis de prostaglandinas, principalmente por prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), un metabolito más importantes de la ciclooxigenasa II (COX II). Northern blot demostró que la Vit E aumentaba significativamente la expresión de COX II (Control:  $100\%$  U.D. COX II/GAPDH; Vit E  $10^{-4}\text{ M}$ :  $63 \pm 5\%$ ; Vit E  $10^{-5}\text{ M}$ :  $274\%$ ; Vit E  $10^{-6}\text{ M}$ :  $85\%$ ). La vit E, a las concentraciones utilizadas en los anteriores experimentos, no aumentaba la síntesis basal de  $\text{PGE}_2$  inmunorreactivo (RIA), un potente vasoconstrictor producido por la vía alternativa de la  $\text{PGE}_2$  (Control:  $3.71\text{ ng/mg}$  proteína; Vit E  $10^{-4}\text{ M}$ :  $3.84\text{ ng/mg}$ ; Vit E  $10^{-5}\text{ M}$ :  $3.48\text{ ng/mg}$ ). Este resultado sugiere que el aumento de la actividad de COX II podría derivar de un incremento de la síntesis de  $\text{PGE}_2$  que es la vía cinéticamente más favorecida. Esto justificaría el efecto preventivo de la vit E sobre la contracción mesangial inducida por  $\text{C}_6\text{S}_6$ , ya que la vasodilatación que produce un aumento de los niveles de  $\text{PGE}_2$ .

#### EFFECTO DE LA INGESTA DE SAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLICOPROTEÍNA-P INDUCIDA POR CICLOSPORINA A, EN LINFOCITOS CIRCULANTES DE RATA.

Andújar M, Ramirez C, Vergara E, Gómez-Morales M, Osuna A\*, Olmo A, Arrebola F, García-Chicano, Del Moral RG. Servicios de Nefrología\* y Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio. Granada, 18012, España.

La glicoproteína P170 (P-gp) es un sistema detoxicante relacionado con la multirresistencia farmacológica de ciertos tumores (MDR) frente a quimioterápicos. La P-gp expete sustancias hidrofóbicas del interior de la célula entre las que se encuentran agentes quimioterápicos e inmunosupresores como la ciclosporina A (CsA). La exposición del parénquima renal a dosis terapéuticas de CsA induce una sobre expresión de P-gp en este tejido que está relacionado con la presencia de depósitos del fármaco. Hemos desarrollamos un modelo de toxicidad crónica in ratas Sprague-Dawley tratadas con 25 mg/Kg/día de CsA durante dos meses, empleando una dieta de mantenimiento estándar y una dieta libre de sodio. Estudiamos el porcentaje de células positivas y el canal medio de fluorescencia en linfocitos circulantes, usando citometría de flujo y una técnica de inmunofluorescencia indirecta (anticuerpo monoclonal JSB1 contra P-gp). Los controles fueron tratados con Propilenglicol (PGL) y suero fisiológico (SC). Fue detectada positividad en los linfocitos de todos los grupos, con un marcado incremento del porcentaje (61.325%) y del canal medio de fluorescencia (15.325) (ANOVA1  $p < 0.001$  y 0.05, respectivamente) en el grupo tratado con CsA y dieta de mantenimiento. La mayoría de los grupos con dieta exenta de sodio presentaron valores más bajos de ambos parámetros que los grupos con dieta estándar. En conclusión, se demuestra que el tratamiento con CsA y dieta de mantenimiento induce incrementos significativos de la expresión de P-gp en los linfocitos circulantes de ratas. Estos resultados sugieren un posible efecto de inducción osmótica de la dieta con un contenido normal de sodio, y un efecto potencialmente beneficioso de la restricción de sal en los pacientes trasplantados.

#### LA INTERACCIÓN ENTRE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) Y ÓXIDO NITRICO (NO), CONDICIONA LA APARICIÓN DE TROMBOSIS GLOMERULAR DURANTE LA ENDOTOXEMIA.

D. del Castillo, J. Guerra, E. Jaimes, G.J. Johnson, L. Rajj. V.A. Medical Center, Minneapolis, U de Minnesota y H.U. Reina Sofía, Córdoba.

El exceso de producción de NO y TNF han sido implicados en las alteraciones tanto sistémicas (shock) como locales (daño endotelial, trombosis vascular) que aparecen durante la endotoxemia (LPS). Sin embargo la inhibición de la síntesis endógena de NO con L-NAME durante LPS produce una trombosis glomerular difusa (JCI-92). El propósito de este estudio fue investigar si el TNF juega un papel central en el desarrollo de la trombosis glomerular en ratas tratadas con LPS en las que la síntesis de NO es inhibida.

Tres grupos de 6 ratas cada uno se estudiaron bajo el siguiente protocolo: I- LPS (1 mg/Kg de peso ip), II-LPS (1 mg/Kg de peso ip) + L-NAME (0.75 mg/Kg de peso ip) 30 minutos antes y después de LPS, III- LPS+L-NAME+Pentoxifilina (PTFX, 200 mg/Kg de peso ip) 12 horas y 1 hora antes del LPS. Ha sido documentado que PTFX inhibe la síntesis/liberación del TNF tanto "in vivo" como "in vitro". Se analizaron la excreción urinaria de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> (metabolitos de NO nmol/hr/100 gr de peso); TNF en suero (bioensayo con células de la línea I.929) y el porcentaje de glomerulos trombosados (histología de 50 glomerulos por rata).

Resultados en  $\Delta$  % comparado con los valores basales de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> y TNF.

	NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>	TNF	Tromb. Glomerular %
LPS	↑ 40±4*	↑ 20±9*	2±0.1
LPS+L-NAME	↓ 78±6*	↑ 80±25*	60±5@
LPS+L-NAME+PTFX	↓ 61±7*	2±0.5	4±1

$p < 0.05$  vs basal. @ $p < 0.05$  vs todos.

El efecto antitrombotico de la PTFX no es atribuible a su efecto antiplaquetario ya que tanto el número de plaquetas como la respuesta de las mismas al ADP, colágeno y trombina en las ratas tratadas con PTFX no fue diferente de la ratas control.

Estos estudios muestran que el balance entre el efecto protrombotico del TNF y el antitrombotico del NO, condiciona el desarrollo de la trombosis glomerular durante la endotoxemia. Clínicamente mecanismos similares pueden ser operativos en la sepsis y en el síndrome hemolítico urémico.

#### CITRATURIA Y FORMACION DE DEPOSITOS DE OXALATO CALCICO EN TEJIDO RENAL TRAS LA CIRUGIA DE EXCLUSION DEL ILEON TERMINAL: ESTUDIO EXPERIMENTAL.

Font J, Gascón A, Iglesias E, Burdeus R, Monge JM, Ingelmo A. Servicios de Urología y Nefrología. Hospital Obispo Polanco. Teruel.

La cirugía de exclusión del ileon terminal se ha utilizado desde 1963 como terapéutica ante casos de hipercolesterolemia severa. Los efectos secundarios más comunes de esta cirugía incluyen la diarrea crónica y la nefrolitiasis. Se ha observado que en estos pacientes con exclusión del ileon terminal el estado de diarrea crónica unido al paso integro de ácidos y sales biliares al colon, además de condicionar una hiperoxaluria, desencadena otras alteraciones como puede ser la hipocitraturia, que junto a una disminución del volumen urinario incrementan el riesgo de aparición de nefrolitiasis post-quirúrgica. El objetivo del presente estudio se centra en valorar en ratas Wistar las distintas alteraciones renales bioquímicas inducidas por la cirugía de exclusión del ileon terminal y que pueden condicionar una mayor incidencia de nefrolitiasis. Se estudiaron 70 ratas Wistar de ambos sexos y con más de 6 meses de vida. Los animales fueron alimentados con una dieta rica en colesterol durante 6 meses antes de la intervención quirúrgica (resección o bypass del ileon terminal). A 30 ratas se les realizó resección del ileon terminal y a otras 30 ratas bypass del ileon terminal. Estas ratas se sacrificaron, en grupos de 10 animales, a los 30, 90 y 180 días de la exclusión del ileon terminal, manteniendo durante este tiempo la dieta rica en colesterol. Un grupo control de 10 ratas se sacrificaron tras seis meses de dieta normal. Los resultados obtenidos muestran una hiperoxaluria en todos los grupos de animales intervenidos, no encontrando depósitos de oxalato cálcico en el tejido renal. En nuestro estudio la hiperoxaluria no se acompañó de diarrea crónica, dato interesante teniendo en cuenta los mecanismos de reabsorción de oxalato por la mucosa colónica. Sin embargo, los niveles de citraturia en orina de 24 horas se mantuvieron normales durante todo el estudio, probablemente como consecuencia de la ausencia de diarrea. Así mismo, no se han observado alteraciones en los niveles de calcio ni de fósforo durante toda la experiencia.

En conclusión, la hiperoxaluria resultante después de la cirugía de exclusión del ileon terminal en las ratas estudiadas, revaloriza el papel de los ácidos y sales biliares como promotores del aumento de permeabilidad de la mucosa colónica para los oxalatos. La ausencia de diarrea en los animales intervenidos justifica la normocitraturia de nuestro estudio, así como la ausencia de depósitos de oxalato cálcico en el tejido renal.

#### LESIONES HISTOLOGICAS RENALES INDUCIDAS POR LA DIETA HIPERCOLESTEROLEMICA EN RATAS WISTAR: INFLUENCIA DE LA CIRUGIA DE EXCLUSION DEL ILEON TERMINAL.

Font J, Gascón A, Iglesias E, Burdeus R, Yagüe A, Ingelmo A. Servicios de Urología y Nefrología. Hospital Obispo Polanco. Teruel.

Estudios experimentales han sugerido un papel importante de las alteraciones del metabolismo lipídico como un factor modulador del daño renal progresivo. La cirugía de exclusión del ileon terminal se ha utilizado como terapéutica para reducir la hipercolesterolemia severa desde 1963. Es conocida la alta incidencia de nefrolitiasis que induce esta cirugía. Sin embargo, no se han realizado estudios experimentales que valoren otras posibles repercusiones sobre la histología renal. El objetivo del presente trabajo es analizar en ratas Wistar los efectos de la dieta hipercolesterolemica y de la cirugía de exclusión del ileon terminal (bypass o resección parcial) sobre la histología renal. Se estudian 70 ratas Wistar de ambos sexos y con más de 6 meses de vida. Los animales fueron alimentados con una dieta rica en colesterol durante 6 meses antes de la intervención quirúrgica (resección o bypass del ileon terminal). A 30 ratas se les realizó resección del ileon terminal y a otras 30 ratas bypass del ileon terminal. Estas ratas se sacrificaron, en grupos de 10 animales, a los 30, 90 y 180 días de la exclusión del ileon terminal, manteniendo durante este tiempo la dieta rica en colesterol. Un grupo de 10 ratas se las sacrificó tras seis meses de dieta normal y sirvió como grupo control. Resultados: la dieta rica en colesterol induce en seis meses un incremento significativo en las cifras de colesterol sérico (68±9 versus 119±14 mg/dl,  $p < 0.05$ ). Todos los animales experimentaron tras la cirugía de exclusión del ileon terminal una reducción importante del colesterol sérico, entre el 15 y el 48%, a pesar de mantener una dieta rica en colesterol. Las lesiones renales fueron nefropatía tubulointersticial, sin datos de glomerulosclerosis, en 8 de los casos estudiados. Estas lesiones fueron focales, bilaterales y no se correlacionaron con el tipo de cirugía ni con el tiempo transcurrido después de la exclusión del ileon terminal. El 14% de las ratas presentaron infiltración lipídica a nivel de la aorta abdominal. En el grupo control no se detectaron lesiones a nivel renal ni en los vasos.

En resumen: las lesiones histológicas renales inducidas por la dieta hipercolesterolemica y tras la exclusión del ileon terminal en nuestro estudio son mínimas, y se corresponden básicamente con nefropatía tubulointersticial. En nuestro estudio estas lesiones no desaparecieron cuando se normalizaron las cifras de colesterol y pueden correlacionarse con unos niveles de colesterol sérico no excesivamente elevados, y un estadio precoz de daño renal.

**LA THAPSIGARGINA INDUCE APOPTOSIS Y EXPRESIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE EN CÉLULAS MESANGIALES EN CULTIVO.**

Rodríguez-López A.M. & López-Novoa J.M.  
 Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. España.

La apoptosis parece ser responsable de la reducción del número de células mesangiales que se ha observado en los procesos de glomerulonefritis y glomerulosclerosis. Las señales dependientes de calcio por una parte y la generación de radicales libres, se han asociado con fenómenos de muerte celular programada en diferentes modelos, pero la relación entre ambas vías precisa de más datos experimentales.

El objetivo de este estudio ha sido determinar si un incremento sostenido en calcio intracelular, inducido por thapsigargina, está asociado con procesos de apoptosis en células mesangiales en cultivo y la posible implicación del óxido nítrico. Para el cultivo de células mesangiales se utilizaron ratas Wistar y tras la caracterización del cultivo las células se incubaron con thapsigargina (10<sup>-6</sup>M) durante 12h en un medio sin factores de crecimiento y en un medio suplementado con 10% de suero de ternera fetal. Los procesos de apoptosis se detectaron por diversas técnicas: tinción con hematoxilina y con iodo de propidio y otras específicas para detectar DNA fragmentado (TUNEL). La producción de nitritos se determinó por el método de Griess y la expresión de iNOS por Western blot.

Nuestros resultados indican un incremento significativo en la frecuencia de células apoptóticas tras el tratamiento con thapsigargina en un medio sin factores de crecimiento (17% de células en apoptosis), este incremento no se detectó cuando utilizamos un medio suplementado con factores de crecimiento y un 10% de suero de ternera fetal (2-3%). Asimismo, se observó un aumento en la producción de óxido nítrico (3.78 ± 1.54 vs 1.76 ± 0.44 µM), que coincide con la expresión de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa. La posible relación entre aumentos sostenidos en calcio intracelular y producción de óxido nítrico y su implicación en procesos de apoptosis precisa más estudios.

**EFFECTOS HEMODINÁMICOS RENALES DE AMINOACIDOS PRECURSORES Y NO PRECURSORES DE ÓXIDO NÍTRICO.**

G. Sllgado Rodríguez, M.L. Alcalá Rueda, G. Velasco, J. Payán, D. Torán, R. Pérez Mijares, M. Ramos, P. Gómez, M. Almaraz. Servicio de Nefrología del Hospital del S.A.S. de Jerez de la Frontera.

**INTRODUCCION Y OBJETIVOS:** Es conocido que la ingesta proteica produce cambios hemodinámicos renales caracterizados por un aumento del flujo plasmático renal (FPR) y del Filtrado glomerular (FG). La administración de aminoácidos promueve una respuesta renal similar. El propósito de este trabajo fue analizar de forma comparativa el efecto de dos soluciones de aminoácidos (AA), una con L-Arginina, precursora de Óxido nítrico (ON), y otra sin L-Arginina, sobre la función renal, sobre la vía del ON y sobre otros factores hormonales: Renina, Aldosterona, Insulina, Glucagón y GH.

**MATERIAL Y METODOS:** El estudio se realizó en doce sujetos sanos. Siete de ellos recibieron perfusión de dos soluciones isosmolares de aminoácidos, una con 6.36 g/l de L-Arginina (AE+L-ARG) y otra sin L-Arginina (AE) en dos fases. El grupo control se hizo con cinco sujetos a los que se les administró una solución salina de osmolaridad y cantidad similar a las de AA. El diseño fue a doble ciego cruzado. Se calculó el FG a partir del aclaramiento de Creatinina y el FPR mediante el aclaramiento de Paraaminohipurato. A partir de estos y de la Presión arterial media se determinaron la Fracción de Filtración y la Resistencia vascular renal. Además se estudiaron las variaciones e influencia de las diferentes hormonas sobre la hemodinámica renal. Así mismo se determinaron los niveles plasmáticos y urinarios de aminoácidos.

**RESULTADOS:** La ingesta de sodio y proteica fue similar en ambas fases. Tras la infusión de la solución de AE aumentaron los niveles plasmáticos de aminoácidos (2550 ± 418 vs 1879 ± 279 µmol/l, p < 0.05). Con la solución de AE+L-Arginina solamente se observó un aumento de los niveles plasmáticos de este aminoácido (109 ± 8 vs 82 ± 9 µmol/l, p < 0.05). La carga filtrada de AA aumentó significativamente con las dos soluciones. No obstante la reabsorción tubular de AA también experimentó un incremento paralelo significativo, por lo que la excreción urinaria de estos no se modificó. Los valores urinarios de GMPc no experimentaron modificaciones significativas con la solución de AE (16775 ± 8000 vs 20087 ± 5189 pmol/100 ml FG). Los valores de los parámetros hemodinámicos y niveles hormonales se expresan en las siguientes tablas: X ± (ES).

PARAMETRO	AMINOACIDOS ESENCIALES		AMINOACIDOS ESENCIALES + L-ARGININA	
	Pre	Post	Pre	Post
FG (ml/min/1.73 m2)	102 (6)	118 (6)	103 (6)	121 (6)*
FPR (ml/min/1.73 m2)	831 (33)	837 (91)	745 (69)	710 (78)
FE (%)	12 (1)	15 (2)	14 (1)	18 (2)
RVR (mmHg/ml)	0.070 (0.01)	0.067 (0.01)	0.073 (0.01)	0.079 (0.01)

FG: filtrado glomerular; FPR: flujo plasmático renal; FE: fracción de filtración; RVR: resistencia vascular renal; \* p < 0.05 vs pre.

HORMONA	AMINOACIDOS ESENCIALES		AMINOACIDOS ESENCIALES + L-ARGININA	
	Pre	Post	Pre	Post
RENINA (ng/ml/h)	0.83 (0.18)	0.62 (0.15)	1.35 (0.35)	0.73 (0.23)*
ALDOSTERONA (pg/ml)	74 (7)	82 (6)	104 (9)	84 (5)*
INSULINA (µl/ml)	15 (2)	15 (1)	15 (2)	17 (3)
GLUCAGON (pg/ml)	151 (74)	126 (23)	207 (77)	150 (35)
GH (µl/ml)	1.5 (0.8)	1.0 (0.2)	0.8 (0.3)	1.3 (0.5)

GH: hormona del crecimiento; \* p < 0.05 vs pre.

**CONCLUSIONES:** 1) La administración de una infusión isosmolar e isovolúmica de aminoácidos que no generen expansión de volumen y con elevaciones moderadas de la aminoacidemia produce un aumento del FG sin cambios del FPR por mecanismos no bien definidos. 2) La administración de L-Arginina promueve un descenso de la Actividad de Renina plasmática y de la concentración de Aldosterona.

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS CON Y SIN L-ARGININA SOBRE EL MANEJO RENAL SEGMENTARIO DE SODIO.**

M.L. Alcalá Rueda, G. Sllgado, G. Velasco, J. Payán, M. Ramos, R. Pérez Mijares, D. Torán, E. Gómez, M. Almaraz. Servicio de Nefrología del Hospital del S.A.S. de Jerez de la Frontera.

**INTRODUCCION Y OBJETIVOS:** El efecto de la administración de aminoácidos (AA) sobre la natriuresis ha sido poco estudiado, se han propuesto como posibles mecanismos alteraciones intrínsecas renales (manejo tubular y balance túbulo glomerular). Trabajos recientes han demostrado que el óxido nítrico (ON) interviene en el manejo renal de sodio. El propósito de nuestro trabajo fue analizar de forma comparativa el efecto de dos soluciones de AA, una con L-Arginina, precursora del ON y otra sin L-Arginina, sobre el manejo renal de sodio.

**MATERIAL Y METODOS:** Se escogieron siete sujetos sanos (36 ± 3 años) que recibieron dos soluciones de AA, una con L-Arginina (6.36 g/l) y otra sin L-Arginina en dos fases, sirviendo como control cinco sujetos sanos (37 ± 3 años) a quienes se les infundió una solución salina similar en osmolaridad y cantidad a la de aminoácidos. El diseño fue realizado a doble ciego cruzado. El manejo renal de sodio fue determinado mediante el aclaramiento de litio. Todos los parámetros fueron corregidos a 100 ml de Filtrado glomerular (FG). Como parámetro de generación endógena de ON se utilizó el GMPc. Se estudiaron las modificaciones de aquellos factores hormonales (Factor natriurético atrial(FNA), Aldosterona, renina, dopamina, insulina) con posible influencia en el manejo renal segmentario de sodio.

**RESULTADOS:** La ingesta de sodio y proteica fue similar en ambas fases del estudio. Después de la infusión de la solución de L-Arginina se objetivó un incremento significativo de la concentración plasmática de la misma (10918 vs 8219 µmol/L, p<0.05). La actividad renina plasmática y la concentración de aldosterona disminuyeron significativamente tras la infusión de L-Arginina. No se observaron modificaciones significativas del resto de las hormonas estudiadas. La excreción urinaria de GMPc tras infusión de la solución de AE (16775 ± 8000 vs 20087 ± 5189 pmol/100 ml FG) y de AE+L-Arginina (18057 ± 7075 vs 17251 ± 6429 pmol/100 ml FG) no experimentó modificaciones significativas. Con ambas soluciones de AA se objetivó un aumento de la carga filtrada de aminoácidos que se acompañó de una elevación paralela de su reabsorción tubular por lo que la excreción urinaria de AA no se modificó con ninguna de las soluciones (AE: 1715 vs 1514; AE+L-Arginina: 1214 vs 1013 µmol/min). Los parámetros del manejo renal segmentario de sodio se exponen en la siguiente tabla: X ± (ES).

PARAMETRO	CONTROLES		AA ESENCIALES		AA ESENCIALES + L-ARGININA	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Aclaramiento de Na+ (ml/min/1.73 m2)	2.1 (0.3)	2.1 (0.2)	2.2 (0.3)	2.7 (0.2)*	1.7 (0.4)	2.5 (0.3)*
Excreción fraccionada Na+ (%)	2.0 (0.3)	2.2 (0.2)	2.2 (0.3)	2.3 (0.2)	1.7 (0.4)	2.5 (0.3)**
Reabsorción fraccionada distal de Na+ (%)	92.9 (0.9)	92.7 (0.5)	92.6 (0.7)	91.6 (0.7)	94.5 (0.9)	93.3 (0.9)*
Natriuresis (µmol/min)	283 (42)	282 (21)	313 (13)	373 (50)*	211 (34)	156 (42)*

\* p < 0.05 vs. pre. \*\* p < 0.01 vs. pre.

**CONCLUSIONES:** 1) La administración de una solución isosmolar e isovolúmica de aminoácidos esenciales induce una respuesta natriúrica paralela al aumento del FG. 2) Si la solución de AA administrada contiene L-Arginina el efecto natriurético es mayor y en él participa además un componente tubular sin evidencia de generación endógena de ON.

**REINFUSION DE LÍQUIDO ASCÍTICO CONCENTRADO EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA: EFICACIA DE UN MÉTODO SIMPLIFICADO.**

Albalade M, López García MD, Vázquez A, de Sequera P, Marriott E, Ortiz A, Casado S, Caramelo C. Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

**OBJETIVO:** Valorar un nuevo método de reinfusión de líquido ascítico, utilizando una membrana de cuprofan y practicado en una Unidad de Diálisis. **PACIENTES Y METODOS:** Se realizaron 31 reinfusiones en 17 pacientes con cirrosis y ascitis refractaria y masiva. Se monitorizaron, previamente al procedimiento y a las 24 hs, constantes clínicas, hemograma, NUS, Cl<sub>O<sub>2</sub></sub>, Na<sub>O<sub>2</sub></sub>, K<sub>O<sub>2</sub></sub>, proteínas plasmáticas y t<sup>10</sup> de Quick. En 10 de estos pacientes se realizó un seguimiento de seis días. En el líquido ascítico se analizaron: leucocitos, albúmina, proteínas plasmáticas, complemento y se practicó cultivo. **Técnica de reinfusión:** Se usó una bomba Roller (Hospal), con un dializador de cuprofan (1,6 m<sup>2</sup>). Se realizó una paracentesis (aguja 14 G), drenándose el líquido a bolsas de hemoterapia a un flujo de 200 mL/min, hasta completar 5 litros; el drenaje continuó libremente hasta la evacuación completa. Los 5 L se concentraron mediante circulación en circuito cerrado con el dializador, reinfundiéndose el concentrado por una vena periférica.

**RESULTADOS:** No ocurrieron cambios significativos en ninguno de los parámetros clínicos ni bioquímicos medidos en los tiempos analizados, incluso en procedimientos repetidos (2 a 9 veces). No se produjeron complicaciones relevantes relacionadas con el método. La media de líquido ascítico drenado fue de 8.6 litros y la del reinfundido de 359.8 mL. El tiempo total empleado fue de 248 min. El líquido infundido contenía 4,7 gr/dL de albúmina, y como ventaja potencial añadida, una cantidad significativa de globulinas y complemento. El coste medio de los materiales utilizados fue 8.440 pesetas, cifra significativamente menor que el coste equivalente de las infusiones de albúmina actualmente en uso (39000 pesetas) y que un tratamiento diurético hospitalario. **CONCLUSIONES:** Presentamos una técnica con eficacia equivalente y ventajas significativas en costo y duración para el tratamiento de la ascitis refractaria.