



Vía de L-arginina-óxido nítrico en la hemodiálisis

P. Gómez-Fernández, G. Velasco, J. Esteban*, V. G. Moreno**, D. A. Guillén**, C. García Barroso** y M. Almaraz

Servicio de Nefrología. Hospital General del SAS. Jerez. *Servicio Central de Investigación. Universidad de Cádiz. **Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.

RESUMEN

El óxido nítrico (ON) deriva de la acción de la óxido nítrico sintasa (ONS). Una de las isoformas de esta enzima, la ONS tipo II puede ser inducida (ONS-i) por diversos estímulos como citoquinas, endotoxinas y bradiquinina entre otros. Durante la hemodiálisis (HD) pueden generarse, dependiendo de las características de la membrana, estos mediadores. La HD puede también inducir cambios en la concentración de sustancias con capacidad de inhibir la ONS como dimetil-L-arginina asimétrica (DAA).

En el presente trabajo se analizan los efectos de la HD con membranas de diferente biocompatibilidad cuprofán (C), poliacrilonitrilo (PAN) y poliacrilonitrilo especial (SPAN) en la actividad celular de la ONS-i, en los niveles de activadores de la ONS como factor de necrosis tumoral (TNF- α) y bradiquinina, y de inhibidores de la ONS como la DAA, y los cambios de nitratos, marcadores de la generación de ON.

La actividad de la ONS-i celular pre-HD fue similar en todas las membranas. Tras la HD se evidenció un aumento significativo de la actividad ONS-i en la membrana de C (31 ± 10 frente a 48 ± 23 fmol⁻¹·10⁶ células, $p < 0,05$) mientras que no se modificó en las membranas de PAN y SPAN (31 ± 9 frente a 31 ± 6 y 44 ± 14 frente a 34 ± 11 fmol⁻¹·10⁶ células, respectivamente). En la HD con C se observó un aumento significativo de TNF α . Esta monoquina descendió tras la HD con PAN y no se modificó en la HD con SPAN. Con ninguna de las membranas se observaron modificaciones significativas de la bradiquinina. Con los tres procedimientos se observó un descenso significativo de los niveles de DAA y nitratos en el transcurso de la HD. No se observó correlación significativa entre las modificaciones de la actividad de la ONS-i celular y las variaciones de TNF α , bradiquinina, DAA, nitratos ni los valores de la presión arterial.

Estos resultados evidencian que durante la HD puede producirse un aumento de la actividad de la ONS-i celular por mecanismos relacionados con la biocompatibilidad de la membrana de diálisis. Por otra parte, la determinación de nitratos no es útil como marcador de la generación de ON durante la HD debido a sus pérdidas transdialíticas.

Palabras clave: **Óxido nítrico. Hemodiálisis. Biocompatibilidad.**

Recibido: 10-IX-99
En versión definitiva: 11-I-00
Aceptado: 13-I-00

Correspondencia: Dr. Pablo Gómez-Fernández
Servicio de Nefrología
Hospital del SAS
Ctra. Circunvalación, s/n
11407 Jerez (Cádiz)

L-ARGININE-NO PATHWAY IN HEMODIALYSIS

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is derived from the metabolism of the amino acid L-arginine by NO synthase (NOS). One of the forms of NOS (i-NOS) can be induced by cytokines, bradykinin and endotoxin. During hemodialysis (HD), blood-dialysis membrane interaction can induce production of these mediators. HD can also induce changes of asymmetrical dimethylarginine (ADA), a potent inhibitor of NOS.

The aim of this study was to investigate the effect of HD, using cuprophane (C), polyacrylonitrile (PAN) and special polyacrylonitrile (SPAN) membranes, on cellular NOS activity, and changes of plasma tumor necrosis factor (TNF- α), bradykinin, ADA and nitrate concentration.

Before HD, cellular i-NOS activity was similar with the three membranes. Cuprophane HD induced a significant increase in i-NOS activity from 31 ± 10 to 48 ± 12 fmol⁻¹10⁶ cells ($p < 0.05$). No changes were found in PAN and SPAN HD. The TNF- α values increased significantly during HD with C (56 ± 6 vs 47 ± 5 pg/ml, $p < 0.05$). No changes of bradykinin concentration were found during HD. A significant decrease of ADA and nitrate levels was observed during HD with three membranes. No significant correlation was found between percentage increase in i-NOS activity and the changes in other parameters.

These findings suggest that HD with bioincompatible membranes can induce activation of cellular i-NOS.

Key words: **Nitric oxide. Hemodialysis. Biocompatibility.**

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (ON) es un producto derivado de la oxidación de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (ONS). Dos de las isoformas de esta enzima (ONS_I o neuronal y ONS_{III} o endotelial) están constantemente expresadas en diversos tejidos (ONS constitutivas, ONS-c). Diversos estímulos promueven la entrada celular de calcio que tras su unión a calmodulina activa la ONS-c produciéndose pequeñas cantidades de ON. La ONS_{II}, calcio-calmodulina independiente e inducible (ONS-i), se expresa en varios tipos celulares como endotelio, macrófagos, neutrófilos y células musculares lisas, entre otras. Tras diversos estímulos como citoquinas y endotoxinas que activan su transcripción, se producen grandes cantidades de ON^{1,2}.

El ON participa en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Interviene en la regulación de la presión arterial, flujo sanguíneo renal y excreción de sodio, inhibe la agregación plaquetaria y modula la respuesta inflamatoria e inmune^{2,3}. Su reacción con anión superóxido produce peroxinitrito, potente tóxico celular⁴.

En la uremia pueden existir alteraciones que repercuten en la vía L-arginina-ON. En la insuficien-

cia renal crónica (IRC) puede haber un déficit de L-arginina, sustrato de la ONS⁵, un aumento de la concentración plasmática de compuestos guanidínicos y derivados metilados de la L-arginina inhibidores de la ONS⁶ y presencia concomitante de otros factores comórbidos que producen disfunción endotelial como hipertensión arterial, dislipemia e hiperhomocisteinemia^{7,8}. Todos ellos pueden causar una disminución de la generación de ON.

La hemodiálisis (HD) también puede promover modificaciones de la vía L-arginina-ON. La producción durante la HD de cantidades variables dependientes, entre otros, de la biocompatibilidad de la membrana, de diversas citoquinas y bradiquinina con capacidad de activar la ONS^{9,10} y la eliminación dialítica de derivados metilados inhibidores de la ONS puede aumentar la generación intradialítica de ON y mejorar la función endotelial^{11,12}. Por otra parte, la producción de radicales libres en la HD causaría una inactivación del ON¹³.

La generación de ON durante la HD puede tener relevancia clínica. Se ha sugerido su participación en la hipotensión intradialítica^{10,14}. Por otra parte, el aumento de ON, en situaciones de incremento de generación de radicales libres como la HD, puede potenciar el daño oxidativo^{4,15}.

Se han utilizado diversos métodos para medir la generación de ON. Algunos son técnicamente muy complejos^{16,17}. Otros, como la determinación de GMP-c, segundo mensajero de la acción del ON, y de los metabolitos del ON, nitritos y nitratos, se afectan por las variaciones de la volemia durante la HD y su eliminación dialítica, respectivamente.

Todos estos hechos hacen que el estudio de la vía L-arginina-ON en la uremia-HD sea complejo. En el presente trabajo, planteamos la hipótesis de que diferencias de biocompatibilidad de membranas de HD pueden condicionar distinta actividad de la ONS-i. Se diseñó un estudio comparativo entre varias membranas en el que se determinó la actividad de la ONS-i celular (monocitos, neutrófilos) y sus posibles activadores, factor de necrosis tumoral (TNF- α) y endotoxinas. Se analizaron también las modificaciones de los factores que pueden incidir en la generación de ON (inhibidores de la ONS como dimetil-L-arginina asimétrica), de los marcadores de la generación de ON (nitratos), y las variaciones de la presión arterial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 6 enfermos (5 hombres y 1 mujer), de una edad de 41 ± 8 años, con IRC en tratamiento con HD durante 23 ± 9 meses. En todos los casos se usaba, como acceso vascular, una fístula radiocefálica, y un filtro de poliacrilonitrilo para la diálisis crónica. Todos los enfermos recibían tratamiento con quelantes del fósforo, eritropoyetina y complejos vitamínicos cuya dosis se mantuvo inalterada. Ninguno recibía tratamiento antihipertensivo ni nitritos, y ninguno fumaba. El estudio se hizo en tres sesiones de HD, de 4 horas de duración, utilizando en cada una de ellas una membrana diferente: cuprofán de $1,8 \text{ m}^2$ (C), poliacrilonitrilo de $1,6 \text{ m}^2$ (PAN) y poliacrilonitrilo especial de $1,6 \text{ m}^2$ (SPAN). La elección del orden de las membranas se hizo aleatoriamente. Tras la elección de la membrana, el enfermo recibía su HD habitual durante dos días, realizándose el estudio de la tercera HD. El intervalo entre los estudios fue de 7 días. El estudio se hizo tras ayuno de 12 horas, siempre a la misma hora en cada enfermo y manteniendo las mismas condiciones de HD (flujo de sangre, flujo de líquido de diálisis, ultrafiltración y heparinización). Se solicitó a los enfermos que dos días antes de cada estudio hiciesen la misma dieta y bebiesen agua comercializada sin nitritos ni nitratos. La composición del líquido de diálisis utilizado en los estudios fue siempre la misma: Na^+ 137 mEq/l, Cl^- 102 mEq/l, K^+ 1,5 mEq/l, HCO_3^- 39 mEq/l, acetato 4 mEq/l, calcio 7 mg/dl, glucosa 1,5 g/l.

Antes de la HD (pre-HD) y después de la HD (post-HD) se extrajo sangre de la línea arterial para la determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS), bradiquinina, nitratos, TNF α y dimetil-L-arginina asimétrica (DAA). A los diez minutos del comienzo de la HD, se tomó simultáneamente sangre del lado arterial (entrada al dializador) y venoso (salida del dializador) para determinación de nitratos, bradiquinina y DAA. Se tomó también muestra del líquido de diálisis a la entrada al dializador para estudio de nitratos y endotoxinas, y a la salida para estudio de nitratos y DAA. Horariamente se recogió todo el efluente del líquido de diálisis para calcular el aclaramiento de urea y creatinina. Antes y al final de la HD se tomó la presión arterial calculándose la presión arterial media (PAM) como la suma de la presión arterial diastólica y un tercio de la presión de pulso.

La sangre para determinación de TNF α , DAA y nitratos se extrajo en tubos con EDTA. La de bradiquinina en tubos con aprotinina. Todas ellas fueron centrifugadas inmediatamente y almacenadas a -70°C hasta su análisis.

El TNF α se determinó por técnica de enzimoensayo, la DAA por HPLC con detección fluorimétrica usando como método de derivatización el AccQtag[®] Waters (Milgord, Boston) y la bradiquinina por RIA(JCN). Los nitratos se determinaron por electroforesis capilar por técnica modificada de Leone y cols.¹⁸. La muestra de plasma, tras ser desproteinizada con tricloroacético al 10%, era diluida a 1:1 con agua MiliQ⁺, ultrafiltrada con filtro de 0,45 mm y analizada por electroforesis capilar en un sistema Waters Quanta 4.000. Para ello se utilizaron capilares de sílice fundida con un diámetro interno de 75 μm y 60 cm de longitud (ventana de detección a 53 cm). La inyección de las muestras se realizó de forma hidrostática durante 30 segundos y analizadas utilizando un potencial negativo de 7 KV. El electrolito utilizado presentaba la siguiente composición: 1 mM de modificador de flujo (OFM-OH, Waters), 10 mM Na_2SO_4 (Merck, PA), y ajustado a un pH de 9,32 con una disolución de 40 g/l de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Panreac, PA). La determinación de nitratos en líquido de diálisis se hizo sin desproteinizar ni diluir la muestra. La concentración de endotoxinas en el líquido de diálisis se determinó mediante el test de Limulus (LAL cinético cromogénico).

La determinación de la actividad de la ONS celular se hizo midiendo la formación de [³H]citrulina a partir de [³H]arginina. Previamente, las células linfomonocitarias se separaron en Ficoll-Hypaque, se lavaron tres veces en RPMI 1.640 (Biochrom KG, Berlin) y se llevaron a una concentración de $8,5 \times 10^6/\text{ml}$. Posteriormente se contabilizaron sus com-

ponentes linfocitos, monocitos y neutrófilos) en un Technicon H3 RTX™ (Bayer) y se congelaron a -70° C hasta su análisis. La muestra fue sometida a cinco ciclos de sonicación de 5 segundos cada uno al 80% de la potencia. Dicha sonicación se realizó en un tampón de extracción adicionado a la muestra en proporción 4:1. La composición del tampón con un pH de 7,4 fue: trizma 2,5 mM, EDTA dipotásico 1 mM, aprotinina 13,5 UIT/l, ditiotreititol 1 mM, fenil metil sulfonil fluoruro 0,2 mM, tetrahidrobiopterina 1 µM. Posteriormente el sonificado se centrifugó 20' a 4° C y 20.000 g. El sobrenadante se incubó, en tubos duplicados, durante 60' a 37° C en presencia de tampón fosfato 50 mM, Cl2Ca 0,2 mM, Cl2Mg 1 mM, L-arginina 0,05 mM, NADPH 0,1 µM, valina 8 µM [³H]L-arginina 9,3 mCi/l. En otros dos tubos a la solución anterior se añadió EGTA para quelar el calcio e inhibir la actividad NOS constitutiva, calcio dependiente. En otros dos tubos se añadió a todo lo anterior L-NAME 2 µM con lo que se inhibe al 100% la actividad ONS y permite descartar cualquier transformación metabólica de la L-arginina no dependiente de la ONS. Así, mediante los cálculos adecuados se puede diferenciar actividad ONS-c y actividad ONS-i. Tras la incubación, se adicionaron 900 µl de agua a 0° C y 500 µl de resina Dowex50. Una vez precipitada la resina se añadió al sobrenadante líquido de centelleo. La [³H]citruilina se leyó en un contador beta (LKB 1410). La actividad ONS obtenida se dividió por el número de células que contienen ONS (monocitos y neutrófilos), expresándose como fmol·min⁻¹·10⁶ células.

El estudio estadístico se realizó con el programa Rsigma. Las modificaciones de los diversos parámetros en el transcurso de la HD con cada membrana y el análisis comparativo del efecto de la membrana se realizaron por análisis de la varianza con el test de Newman Keuls para comparaciones múltiples. La relación entre los diversos parámetros se analizó por el coeficiente de correlación. Los resultados se expresan como media ± error estándar (x ± ES). Se consideraron significativos valores de p < 0,05.

RESULTADOS

No hubo diferencias en la tasa de ultrafiltración entre las tres HD (C: 693 ± 11; PAN: 621 ± 8; SPAN: 598 ± 9 ml/h). Los aclaramientos de urea y creatinina fueron iguales en las tres membranas. Los niveles de endotoxinas en el líquido de diálisis fueron en todos los casos inferiores a 0,05 UE/ml.

La casi totalidad de la actividad de la ONS celular pre-HD y post-HD fue inducible (ONS-i). La ONS

constitutiva (ONS-c) pre-HD sólo representó el 6 ± 2%, 7 ± 1,5% y 3 ± 1,3% en las membranas de C, PAN y SPAN, respectivamente. Después de la HD, no se produjeron cambios significativos de la ONS-c. La actividad pre-HD de la ONS-i fue similar en las tres membranas. Tras la HD se observó un aumento significativo de la actividad ONS-i en la membrana de C. No se modificó en las HD con PAN y SPAN (tabla I). La variación porcentual (delta) de la actividad de la ONS-i en la HD con cuprofán (71 ± 29%) fue significativamente superior (p < 0,05) a la de las otras dos membranas (PAN: 15 ± 24%; SPAN: -24 ± 7%).

No hubo diferencias en los niveles plasmáticos pre-HD de TNF-α en las tres membranas. Las variaciones del TNF-α con la HD dependieron de la membrana. Mientras que en la HD con C se objetivó un aumento significativo del TNF-α (56 ± 6 frente a 47 ± 5 pg/ml, p < 0,05), en la HD con PAN

Tabla I. Actividades de óxido nítrico sintasa inducible celular (ONS-i) y niveles plasmáticos de mediadores y componentes de la vía L-arginina-óxido nítrico durante la hemodiálisis (HD) (x ± ES)

	Pre-HD	10'arteria	10'vena	post-HD
<i>ONS-i</i>				
*fmol ⁻¹ ·10 ⁶ células				
C	31 ± 10	-	-	48 ± 12*
PAN	31 ± 9	-	-	31 ± 6
SPAN	44 ± 14	-	-	34 ± 11
<i>TNF-α:</i>				
(pg/ml)				
C	47 ± 5	-	-	56 ± 6*
PAN	50 ± 6	-	-	33 ± 3*
SPAN	45 ± 3	-	-	47 ± 2
<i>Bradiquinina:</i>				
(fmol/ml)				
C	656 ± 18	644 ± 30	580 ± 25	568 ± 72
PAN	613 ± 20	570 ± 13	523 ± 32	663 ± 32
SPAN	600 ± 35	571 ± 72	544 ± 57	537 ± 51
<i>Dimetil-L-arginina:</i>				
(µMol/l)				
C	5,8 ± 0,3	6,2 ± 0,7	2,3 ± 1,0#	0,9 ± 0,3**
PAN	5,0 ± 1,1	5,1 ± 1,4	2,8 ± 0,7#	2,4 ± 0,6**
SPAN	4,9 ± 1,2	3,1 ± 0,6	1,2 ± 0,2#	1,5 ± 0,5**
<i>Nitratos:</i>				
(µMol/l)				
C	152 ± 31	180 ± 31	78 ± 13#	57 ± 11**
PAN	206 ± 37	184 ± 34	90 ± 15#	73 ± 9**
SPAN	203 ± 40	168 ± 38	73 ± 17#	58 ± 8**

C: cuprofán; PAN: poliácilonitrilo; SPAN: poliácilonitrilo especial.

* p < 0,05 frente a pre-HD; # p < 0,01 frente a 10'arteria; ** p < 0,01 frente a pre-HD.

descendió (33 ± 3 frente a 50 ± 6 pg/ml, $p < 0,05$) y no se modificó en la HD con SPAN (47 ± 2 frente a 45 ± 3 pg/ml). Con ninguna de las membranas se constató generación intradiálisis precoz ni tardía de bradiquinina (tabla I). En la HD con PAN, a los 10', se observó un aumento de los niveles plasmáticos de bradiquinina en el lado venoso (salida del dializador) respecto al lado arterial (entrada), y un aumento al final de la HD. La magnitud de estos incrementos, sin embargo, no alcanzó significación estadística.

Los niveles plasmáticos preHD de DAA fueron similares con las tres membranas. Con todos los procedimientos tras la HD se objetivó un descenso significativo y de cuantía similar de la DAA (tabla I). La diferencia significativa de la concentración de DAA a la entrada y a la salida del filtro evidenció que este descenso de la DAA es atribuible a pérdidas a través del dializador.

Con los tres procedimientos se observó una disminución significativa de los niveles plasmáticos de nitratos en el transcurso de la HD (tabla I) y un importante descenso tras su paso por el dializador (fig. 1). La diferencia arteriovenosa (concentración a la entrada-concentración a la salida) a los 10' fue igual en las tres membranas (C: 101 ± 27 ; PAN: 95 ± 33 ; SPAN: 94 ± 34 $\mu\text{mol/l}$), hecho que implica a la membrana de diálisis como responsable del descenso de los nitratos. Sin embargo, la diferencia entre la concentración de nitratos a la salida y entrada del líquido de diálisis tomada en el mismo momento fue muy inferior a la diferencia arteriovenosa (C: 18 ± 5 ; PAN: 29 ± 4 ; SPAN: 30 ± 4) lo que sugiere la existencia de adsorción a la membrana. La variación porcentual (Δ) de nitratos al final de la HD fue menor en la membrana de C ($-51 \pm 16\%$) que en

PAN ($-61 \pm 6\%$) y SPAN ($-63 \pm 9\%$) sin alcanzar significación estadística.

Ninguno de los enfermos estudiados tenía historia de hipotensión intradiálisis. La PAM pre y post-HD fue igual en los tres procedimientos. En todos ellos, la PAM descendió de forma no significativa y en igual cuantía (C: 86 ± 4 frente a 92 ± 3 mmHg; PAN: 89 ± 2 frente a 93 ± 2 mmHg; SPAN: 89 ± 2 frente a 91 ± 4 mmHg).

No se observó correlación entre las variaciones intradiálisis de la actividad ONS-i celular y las variaciones de TNF- α , bradiquinina, DAA, nitratos ni PAM.

DISCUSIÓN

El estudio de la vía de L-arginina-ON en los enfermos urémicos es complejo debido a que en la uremia pueden existir, además de alteraciones cuantitativas del substrato L-arginina, un exceso de factores estimulantes e inhibidores de dicho sistema. La HD, induciendo modificaciones de todos ellos, aumenta la complejidad¹¹. Estas dificultades han propiciado que gran parte de la investigación de esta vía metabólica se haya realizado en estudios *ex vivo* o *in vitro* en los que se analiza el efecto del plasma de sujetos sanos o urémicos, antes y después de su contacto con membranas de HD, sobre la ONS en cultivos de células endoteliales^{11,19}.

En el presente trabajo estudiamos *in vivo* el efecto de la HD sobre la actividad de la ONS-i de células periféricas y otros componentes de la vía L-arginina-ON. Nuestros resultados demuestran que durante la HD se produce un aumento de la actividad de la ONS-i de células periféricas cuando se utilizan membranas no biocompatibles. Esto no parece atribuible a disminución durante la HD de la DAA ya que este inhibidor de la ONS descendía en todas las HD independientemente de la membrana usada.

Los elementos implicados en este hecho no están aclarados. La ONS-i es inducible por diferentes estímulos. Las endotoxinas pueden promover inducción de la ONS de monocitos-macrófagos¹. En nuestro estudio, el test de *Límulus* negativo asegura la pureza del líquido de diálisis y excluye la participación de lipopolisacáridos bacterianos en la activación de la ONS. Algunos estudios implican a los componentes del líquido de diálisis como el acetato en las alteraciones del sistema L-arginina-ON durante la HD^{20,21}. Aunque el líquido de diálisis usado en nuestro estudio contenía una pequeña concentración de acetato de 4 mmol/l, no se pueden atribuir los cambios observados por nosotros al tampón

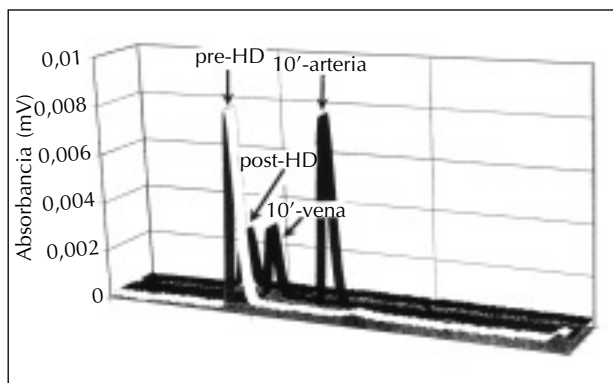


Fig. 1.—Electroferograma de nitratos plasmáticos durante la hemodiálisis en uno de los enfermos (se indican los momentos y el lugar de la extracción).

usado en el líquido de diálisis. Todos nuestros enfermos se dializaban con un líquido de diálisis de idéntica composición. Sin embargo, solamente observamos modificaciones de la actividad de la ONS-i en la membrana de cuprofán.

La bradiquinina puede participar en la vía L-arginina-ON. Actuando en receptores de activación de las células endoteliales activa la ONS-c endotelial¹¹. Nuestros datos no revelan ninguna relación entre las modificaciones dialíticas de la bradiquinina y de la actividad de la ONS-i de las células periféricas.

Hay evidencias experimentales que sugieren la participación de la membrana de diálisis en la vía L-arginina-ON a través de las citoquinas. Recientemente se demostró, en un estudio *in vitro*, que la coincubación de células endoteliales y sangre de donantes sanos expuesta a membranas de cuprofán promovía la expresión de ONS-i endotelial y un aumento de su actividad juntamente con liberación de IL-1 β y TNF- α por las células linfomonocitarias. La sangre expuesta a membranas de polimetilmetacrilato no producía modificaciones de estos parámetros¹⁹. Las citoquinas IL-1 β y TNF- α inducen la ONS en células musculares vasculares, células endoteliales, macrófagos y neutrófilos²²⁻²⁵. Durante la HD se puede producir un aumento de citoquinas atribuible a la activación del complemento, acetato, endotoxinas del líquido de diálisis e interacciones entre las células y la membrana de diálisis²⁶. El aumento observado por nosotros de los niveles de TNF- α en la HD con cuprofán, a diferencia de lo observado en las otras membranas, señala la importancia de la biocompatibilidad en la generación intradialítica de esta monoquina. Aunque hay paralelismo entre los resultados *in vitro*¹⁹ y nuestros hallazgos *in vivo* en los que constatamos un aumento de la actividad ONS-i y TNF- α solamente en la membrana de cuprofán, la ausencia de correlación entre las modificaciones de la actividad ONS-i y las de TNF- α no nos permite atribuir las modificaciones de ONS-i a esta monoquina. Desconocemos la posible implicación de la IL-1 β no determinada en el presente trabajo.

El aumento de la actividad ONS-i de las células periféricas no se acompañó de un incremento paralelo de los niveles plasmático de nitrato, metabolito de ON usado como marcador de su formación. Mediante la determinación directa de ON por nitrosensores o indirecta por metabolitos intermedios como nitrosilhemoglobina se demostró una producción precoz de ON durante la HD^{16,17}. Dado que la inducción de la ONS-i requiere varias horas, esta elevación precoz de ON se atribuye a la activación de ONS-c endotelial, constantemente expresada, por turbulencias y fuerzas de cizallamiento que aconte-

cen en el acceso vascular, y por la heparina¹⁶. En otros estudios *in vitro* y *ex vivo* se comprobó que la HD inducía un aumento de la expresión y actividad de la ONS-i endotelial^{11,19}. En el presente trabajo objetivamos un aumento de la actividad del ONS-i de células periféricas en la HD con membranas no biocompatibles y una disminución de los niveles plasmáticos de nitratos tras su paso por el dializador. Así, las variaciones cuantitativas de los nitratos plasmáticos durante la HD deben reflejar el balance entre su producción secundaria a la síntesis de ON por ONS-c y ONS-i y su eliminación dialítica.

Los estudios *in vivo* que analizan las variaciones de nitritos y nitratos en la HD aportan datos diferentes. En algunos se ha demostrado aumento de su concentración sólo en enfermos con hipotensión dialítica¹⁴. En otros, se observó un descenso progresivo de sus niveles plasmáticos²⁷. Diferentes características de los enfermos, de las técnicas de HD y de determinación de nitritos o nitratos pueden ser la causa de estas discrepancias. La electroforesis capilar usada por nosotros es una técnica muy sensible y validada¹⁸. Dado que en sangre total los nitritos, habitualmente en muy bajas concentraciones, son rápidamente transformados a nitratos, la ausencia de aquéllos en nuestro estudio, puede ser debido a una insuficiente celeridad en la separación del plasma. La importante disminución observada por nosotros de la concentración de nitratos tras su paso por el dializador señala su eliminación transdialítica. La diferencia arteriovenosa de la concentración de nitratos fue mucho mayor que la cuantificada en el líquido de diálisis lo que suscita la posibilidad de que, además de eliminación en el líquido de diálisis, exista adsorción a la membrana. Así la eliminación de nitratos durante la HD dificulta su uso como marcadores de la generación de ON durante la misma. Hay que recordar que los nitratos, metabolito inactivo de ON, no reflejan la actividad biológica de éste. El ON se transforma en nitrato independientemente de que active su enzima diana, la guanidilciclase. Puede suceder que disminuyan los niveles de nitratos mientras que aumenta la actividad biológica del ON y viceversa²⁸. No obstante, en nuestro estudio, hay datos que puede sugerir generación de nitratos durante la HD. La disminución porcentual (Δ) de nitratos al final de la HD fue inferior a la HD con cuprofán, membrana en la que incrementa la actividad de la ONS-i.

La generación de ON secundario al aumento de la actividad de la ONS-i de células periféricas durante la HD con membranas no biocompatibles puede tener relevancia clínica. Su excesiva producción durante la HD puede promover inestabilidad hemodinámica e hipotensión intradialítica en enfer-

mos con otros defectos vasoreguladores. Estimulando la generación de citoquinas potencia el efecto «inflamatorio» de la hemodiálisis²⁹. Finalmente, la producción de ON en presencia de aumento de generación de radicales libres, como ocurre en la HD con cuprofán, genera peroxinitrito aumentando el estrés oxidativo de la HD^{4,13,15}. Se añaden así nuevos argumentos que aconsejan el uso de membranas biocompatibles en HD.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moncada S, Higgs A: The arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 319: 2002-2012, 1993.
2. Kone BC: Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 30: 311-333, 1997.
3. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
4. Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S: The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad Res Commun* 17: 9-20, 1992.
5. Reyes AA, Karl IE, Klahr S: Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol* 267: F331-F346, 1994.
6. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E: Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 11: 2449-2452, 1996.
7. Panza JA, Quyyumi AA, Bruns JE, Epstein SE: Abnormal endothelium-dependent relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.
8. Upchurch GR, Welch JN, Loscalzo H: Homocysteine, EDRF and endothelial function. *J Nutr* 126 (Supl.): 1290S-1294S, 1997.
9. Luger A, Kovarik J, Stummvoll HK, Urbanska A, Luger TA: Blood-membrane interaction in hemodialysis leads to increased cytokine production. *Kidney Int* 32: 84-88, 1997.
10. Beasley D, Brenner BM: Role of nitric oxide in hemodialysis hypotension. *Kidney Int* 42 (Supl. 38): S96-S100, 1992.
11. Arese M, Strasly M, Ruva C, Costamagna C, Ghigo D, MacAllister R, Verzetti G, Tetta C, Bosia A, Bussolino F: Regulation of nitric oxide synthesis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 10: 1386-1397, 1995.
12. Hand MF, Hayner WG, Webb DJ: Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int* 53: 1068-1077, 1998.
13. Cristol JP, Maggi MF, Bosc JY, Badiou S, Delage M, Vernet MH, Michel F, Castel J, Canaud B, Descomps B: Oxidative stress and chronic renal insufficiency: what can be a prophylactic approach? *C R Sciences Soc Biol Fil* 191: 603-616, 1997.
14. Yokokawa K, Mankus R, Saklayan MG, Kohno M, Yasunari K, Minami M, Kano H, Horio T, Takeda T, Mandel AK: Increased nitric oxide production in patients with hypotension during hemodialysis. *Ann Intern Med* 123: 35-37, 1995.
15. Westhuyzen J, Adams CE, Fleming SJ: Evidence for oxidative stress during *in vitro* dialysis. *Nephron* 70: 49-54, 1995.
16. Rysz J, Luciak M, Kedziora J, Blaszczyk J, Sibinska E: Nitric oxide release in the peripheral blood during hemodialysis. *Kidney Int* 51: 294-300, 1997.
17. Roccatello D, Mengozzi G, Alfieri V, Pignone E, Menegatti E, Cavalli G, Cesano G, Rossi D, Fromica M, Inconis T, Martina G, Paradisi L, Sena LM, Piccoli G: Early increase in blood nitric oxide detected by electron paramagnetic resonance as nitrosylhaemoglobin in haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 12: 292-297, 1997.
18. Leone AM, Francis PL, Rhodes P, Moncada S: A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 951-957, 1994.
19. Amore A, Bonaudo R, Ghigo D, Arese M, Costamagna C, Cirina O, Gianoglio B, Perugini L, Coppo R: Enhanced production of nitric oxide by blood-dialysis membrane interaction. *J Am Soc Nephrol* 6: 1278-1283, 1995.
20. Amore A, Cirina P, Mitola S, Peruzzi L, Bonaudo R, Gianoglio B, Coppo R: Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 8: 1431-1436, 1997.
21. Noris M, Todeschini M, Casiraghi F, Roccatelli D, Martina G, Minetti L, Imberti B, Gaspari F, Atti M, Remuzzi G: Effect of acetate, bicarbonate dialysis and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis: implications for dialysis hypotension. *Am J Kidney Dis* 32: 115-124, 1998.
22. Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM: Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitric production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 87: 602-608, 1991.
23. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141: 2407-2412, 1988.
24. Yui Y, Hattori R, Kosugs K, Eizawa H, Hiki K, Ohkawa S, Ohnishi K, Terao S, Kawai C: Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorpho-nuclear neutrophils. *J Biol Chem* 266: 3369-3371, 1991.
25. Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA: Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am J Physiol (Cell Physiol)* 261: C634-C641, 1991.
26. Descamps-Latscha B, Herbelin A: Long-term dialysis and cellular immunity: a critical survey. *Kidney Int* 43 (Supl. 41): S135-S142, 1993.
27. Martensson L, Hegbrant J, Thysell H: Generation of nitrate during dialysis as measure of nitric oxide synthesis. *Artif Organs* 21: 163-167, 1997.
28. Baylis C, Vallance P: Measurement of nitrate levels in plasma and urine-what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 59-62, 1998.
29. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain B: Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eu J Immunol* 25: 947-951, 1995.