

Lipoperóxidos y progresión del deterioro renal asociado al envejecimiento

M. González Rubio, P. Ruiz Torres, M. L. Díez Marqués, M. Rodríguez Puyol, D. Rodríguez Puyol*, I. Arribas** y F. J. Lucio

Departamento de Fisiología y Farmacología. Departamento de Medicina. * Sección de Nefrología. ** Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha analizado el posible papel de los metabolitos activos derivados del oxígeno, mediante la valoración de los lipoperóxidos, en la progresión del deterioro renal asociado a la vejez. El estudio se ha realizado en seres humanos varones jóvenes y ancianos y también en ratas Wistar macho de diferentes edades. En todos los casos se evaluó la función renal en relación con la concentración plasmática y la excreción urinaria de lipoperóxidos, medidos como malonildialdehído. El grupo de ancianos presentó proteinuria (sin significación clínica) y una reducción del 50% del aclaramiento de creatinina con respecto a los jóvenes. Por su parte, ratas de dieciocho meses no presentaron proteinuria, pero mostraron una disminución estadísticamente significativa del flujo plasmático renal y de la tasa de filtración glomerular. Las concentraciones plasmáticas de lipoperóxidos y su excreción urinaria disminuyeron en los sujetos de edad avanzada, mientras que no hubo variación significativa en estos parámetros entre ratas jóvenes y viejas. Estos resultados sugieren que no existe una relación entre una producción incrementada de metabolitos activos derivados del oxígeno, a nivel sistémico o renal, y la alteración de la función renal asociada al envejecimiento. Sin embargo, no excluyen necesariamente la presencia de fenómenos locales de peroxidación lipídica a nivel glomerular durante la progresión del daño renal asociado al envejecimiento.

Palabras clave: **Función renal. Envejecimiento. Lipoperóxidos.**

LIPOPEROXIDES AND THE PROGRESSION OF AGE-RELATED RENAL DETERIORATION

SUMMARY

It has been studied the possible role of reactive oxygen species, measured as lipoperoxides, in the progression of age-related renal changes. This study has been performed in male human beings (youths and elders) and also in male Wistar rats. In every case, renal function was studied in relation with the plasma concentration of lipoperoxides (measured as malonyldialdehyde) and their urinary excretion. Elder volunteers showed proteinuria without clinical significance and a 50% reduction in creatinine clearance with re-

Correspondencia: Diego Rodríguez Puyol.
Jefe de la Sección de Nefrología.
Hospital Universitario Príncipe de Asturias.
Ctra. de Alcalá-Meco.
Alcalá de Henares.
28005 Madrid.

spect young volunteers. On the other hand, 18 months old rats had a statistically significant reduction in renal plasma flow and glomerular filtration rate. Proteinuria was not found in any group of rats. Plasma levels of lipoperoxides and their urinary excretion were lower in elders, whereas these parameters did not change significantly in older rats as compared to young ones. These results suggest that there is not any relationship between the age-related renal changes and an increased production (renal or sistemic) of reactive oxygen species. However, these results do not necessarily exclude local phenomena of lipid peroxidation at the glomerular level during the progression of age-related renal damage.

Key words: **Renal function. Aging. Lipoperoxides.**

Introducción

Entre las alteraciones asociadas al proceso biológico del envejecimiento se encuentra el deterioro progresivo de la función y estructuras renales. A partir de los treinta años, la filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal se reducen de forma lineal, de manera que los octogenarios presentan valores que son la mitad o la tercera parte de los correspondientes a adultos jóvenes¹, aumentando de forma significativa el número de glomérulos esclerosados², con la consiguiente reducción de masa renal³. En consecuencia, cuando un anciano contrae una enfermedad renal que reduce aún más el número de nefronas funcionantes, tiene un elevado riesgo de sufrir una insuficiencia renal.

Evidencias recientes sugieren que los metabolitos activos derivados del oxígeno (MADO), compuestos sumamente tóxicos, podrían estar implicados en los efectos patológicos observados en algunos modelos de glomerulonefritis experimental⁴, insuficiencia renal aguda⁵ y nefropatía progresiva⁶. Igualmente, se ha sugerido un papel de los MADO en los mecanismos de progresión del daño renal en ciertos modelos experimentales⁶. La agresión por estos compuestos puede detectarse en función de alguno de los derivados que generan al reaccionar con constituyentes biológicos del individuo. Por ejemplo, los lípidos se transforman en lipoperóxidos y éstos, a su vez, derivan hacia compuestos finales como el malonildialdehído (MDA)⁷.

Parece cada vez más claro que la progresiva esclerosis glomerular que acompaña al envejecimiento es un fenómeno multifactorial, en el que los MADO podrían jugar algún papel. Su contribución, bien a la instauración, bien a la progresión de los cambios renales típicos del envejecimiento, es hoy un foco de gran interés.

Tratando de estudiar el posible papel de los MADO en la progresión del deterioro renal asociado a la vejez, en el presente trabajo se estudió la función renal en varones ancianos sanos en relación con sus niveles plasmáticos de lipoperóxidos y la excreción urinaria de los mismos. Paralelamente, con objeto de obtener información más completa sobre este problema, se evaluaron los mismos parámetros en un modelo de ratas Wistar de diferentes edades.

Material y métodos

Pacientes y recolección de muestras

Los sujetos elegidos para realizar el presente estudio fueron hombres comprendidos entre los veintiuno y los ochenta y siete años, no fumadores y sanos, que no tomaban medicación alguna. A todos ellos se les realizó un examen médico previo que constó de una exploración clínica (incluyendo medida de la presión arterial) y un análisis rutinario de sangre, descartándose cualquier enfermedad evidente.

Los voluntarios se dividieron en dos grupos de acuerdo con su edad: jóvenes (veintitrés-treinta y cinco años, n = 11) y ancianos (setenta-ochenta y siete años, n = 10). Todos ellos recibieron instrucciones sobre el procedimiento para la recogida de orina de veinticuatro horas. En esta muestra se evaluó la excreción de proteínas y el aclaramiento de creatinina (Ccr). Posteriormente, los pacientes recogieron orina en dos frascos estériles: en uno de ellos se comprobó la ausencia de bacteriuria y en el otro se midieron las concentraciones de lipoperóxidos y de creatinina. En el momento de la entrega de la muestra de orina se procedió a la extracción de sangre. Se recogieron 8 ml: 4 ml sobre EDTA 7,5 %, para la determinación de lipoperóxidos plasmáticos, y los otros 4 ml en seco para el análisis bioquímico.

Las alícuotas de sangre y orina destinadas a la determinación de lipoperóxidos se procesaron de inmediato como se describe posteriormente. Las muestras de sangre para el análisis bioquímico se centrifugaron veinte minutos a 3.000 rpm y el suero o plasma se guardó a -20 °C hasta su análisis. Las otras muestras de orina también fueron guardadas a -20 °C. Las determinaciones bioquímicas que se realizaron fueron concentración de creatinina, ácido úrico y colesterol en suero. Para ello se utilizó un autoanalizador Hitachi 717 (Boehringer-Mannheim). Las proteínas en orina se determinaron por el método del ácido tricloroacético.

Animales de experimentación y recogida de muestras

Se utilizaron ratas macho de raza Wistar procedentes de nuestro animalario, que se mantuvieron con alimenta-

ción estándar y bebida *ad libitum*. Se confeccionaron dos grupos de estudio: uno integrado por ratas de tres meses de edad ($n = 15$) y otro por animales de dieciocho meses ($n = 15$).

Para la obtención de orina se colocaron las ratas en jaulas metabólicas y se procedió a recoger las muestras correspondientes a veinticuatro horas. En estos animales, tras la recogida de orina, se obtuvo sangre (en las mismas condiciones descritas para humanos) mediante punción en la bifurcación aortofemoral. La separación de plasma y las determinaciones bioquímicas en orina y suero se realizaron de modo idéntico al descrito en el apartado anterior.

Estudio de la función renal en ratas

Se realizó mediante técnicas previamente descritas⁸. Para ello, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso) intraperitoneal. A continuación se practicó una traqueotomía para facilitar la ventilación pulmonar y limpieza de secreciones durante el tiempo en el que las ratas permanecían anestesiadas. Posteriormente se aislaron la arteria y vena femorales para introducir a continuación catéteres PE 50. El catéter de la arteria se conectó a un transductor de presiones que, a su vez, estaba conectado a un registro. La vena femoral se conectó a una bomba de infusión, con la cual se infundió a la rata, a una velocidad constante de 1,2 ml/hora, una solución de cloruro sódico isotónico. Esta solución contenía (carboxil-¹⁴C) inulina y ácido p-amino(³H)-hipúrico (PAH). Con el fin de conseguir una recogida permanente de orina se cateterizó la vejiga. Se realizaron tres períodos de aclaramiento, de veinte minutos cada uno, considerando la media de los tres períodos. Las concentraciones de inulina y PAH en plasma y orina se cuantificaron mediante contador de centelleo.

Cuantificación de malonildialdehído (MDA)

El MDA es un índice de la concentración de lipoperoxidos. Se midió en plasma y orina de humanos y ratas usando el método descrito previamente por Satoh⁹ con ligeras modificaciones.

La sangre se centrifugó a 12.000 x g durante treinta minutos para separar el plasma. A 0,5 ml de este plasma se añadió 1 ml de ácido tricloroacético. Tras treinta minutos, el precipitado se separó por centrifugación a 1.500 x g durante quince minutos y se lavó dos veces con ácido sulfúrico 0,1 M. El precipitado final se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se mezcló con 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico y 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 M. La mezcla se mantuvo a 100 °C en un baño de agua durante treinta minutos. Después se dejó enfriar y el cromógeno rosa producido se extrajo con 2 ml de alcohol n-butílico. La absorbancia del extracto se leyó a 532 nm frente a una curva de calibración generada con 1,1,3,3-tetraetoxipropano que, en medio ácido, libera cantidades equimoleculares

de MDA (uno de los principales productos finales de la peroxidación lipídica). La recuperación de MDA añadido al plasma como 1,1,3,3-tetraetoxipropano, en un rango de 1,5-2,5 $\mu\text{mol/l}$, fue del $97,4 \pm 4,2 \%$.

Las muestras de orina para la determinación de MDA se acidificaron previamente con HCl hasta un pH = 1. Posteriormente, 2 ml de esta orina acidificada se mezclaron con 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico y se incubaron a 100 °C treinta minutos. El cromógeno resultante se precipitó con 1,5 ml de NaOH 5 M y se separó por centrifugación (1.500 x g, diez minutos) y posterior decantación del sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500 μl de ácido sulfúrico 10 M y el MDA se extrajo con 2 ml de alcohol n-butílico. La absorbancia del extracto se midió a 532 nm.

Métodos estadísticos

Todos los valores se expresan como $\bar{X} \pm \text{EEM}$. En todos los casos se comprobó la normalidad de las distribuciones de valores mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Las comparaciones se realizaron mediante la «t» de Student para datos no pareados. Una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

Como se muestra en la tabla I, sólo se detectaron diferencias mínimas en los parámetros de bioquímica sérica de los dos grupos de varones: los ancianos presentaron menos ácido úrico que los voluntarios jóvenes, no observándose cambios significativos de los niveles séricos de creatinina y colesterol entre ambos grupos. Por el contrario, la tasa de filtración glomerular, medida como aclaramiento de creatinina, se redujo en un 50 % aproximadamente en los varones mayores de sesenta y nueve años. Este grupo presentó, además, un aumento estadísticamente significativo de la excreción urinaria diaria de proteínas.

Tabla I. Parámetros más relevantes en suero y orina en individuos sanos de diferentes edades

	Jóvenes	Ancianos
Suero:		
Creatinina (mg/dl).....	1,19 \pm 0,03	1,21 \pm 0,06
Acido úrico (mg/dl).....	6,70 \pm 0,37	5,75 \pm 0,25*
Colesterol (mg/dl).....	229,10 \pm 13,70	225,00 \pm 26,11
Orina:		
Diuresis (ml/min).....	0,93 \pm 0,10	0,90 \pm 0,02
Aclaram. creatinina (ml/min).	105,28 \pm 10,55	57,28 \pm 5,67*
Proteinuria (mg/día).....	0,93 \pm 0,83	63,6 \pm 28,8*

Los datos se expresan como media \pm EEM; * $p < 0,05$ versus jóvenes. Jóvenes: individuos entre veinticinco-treinta y cinco años, $n = 11$. Ancianos: individuos entre setenta-ochenta y siete años, $n = 10$.

La figura 1 presenta la concentración plasmática de MDA y su excreción urinaria. Se observó una reducción estadísticamente significativa de ambos parámetros en el grupo de varones de setenta-ocho y nueve años.

La tabla II presenta parámetros de bioquímica sérica y urinaria de rata. Los animales de dieciocho meses presentaron mayores valores de creatinina que los de tres. No se encontraron diferencias con significación estadística en el resto de los parámetros analizados. Por el contrario, los estudios de aclaramiento de inulina y PAH demostraron una reducción importante de la tasa de filtración glomerular y del flujo plasmático renal a los dieciocho meses (fig. 2). No se apreciaron cambios significativos de la fracción de filtración (resultados no mostrados).

Con respecto al MDA, los animales de tres y dieciocho meses no presentaron variaciones significativas ni en la concentración plasmática ni en la excreción urinaria (fig. 3), de este compuesto.

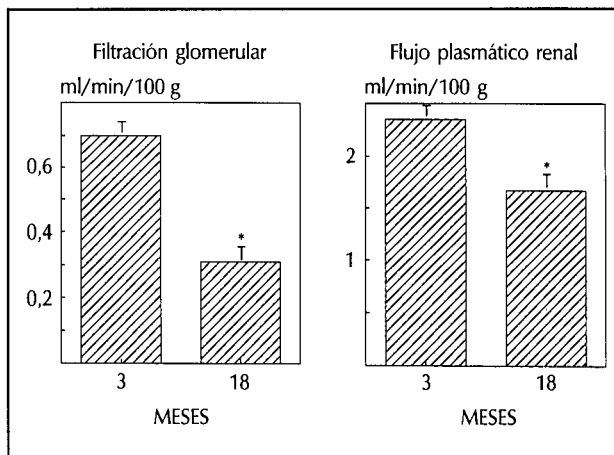


Fig. 2.—Filtración glomerular, medida como aclaramiento de inulina (panel superior), y flujo plasmático renal, medido como aclaramiento de ácido para-aminohipúrico (panel inferior), en ratas Wistar de tres meses (n = 15) y de dieciocho meses (n = 15). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm EEM$. * $p > 0,05$ versus tres meses.

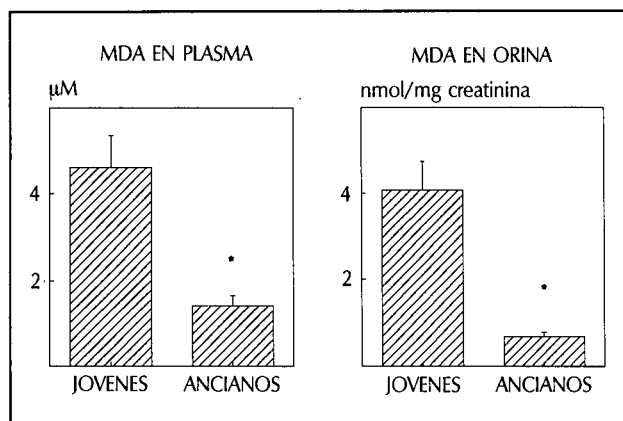


Fig. 1.—Concentración plasmática y excreción urinaria de malondialdehído (MDA) en individuos sanos, jóvenes (n = 11) y ancianos (n = 10). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm EEM$. * $p < 0,5$ versus jóvenes.

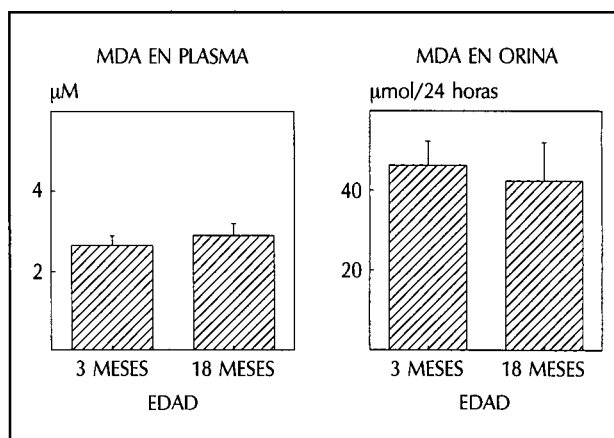


Fig. 3.—Concentración plasmática y excreción urinaria de malondialdehído (MDA) en ratas Wistar de tres meses (n = 15) y de dieciocho meses (n = 15). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm EEM$.

Tabla II. Parámetros más relevantes en suero y orina de ratas de diferentes edades

	3 meses	18 meses
Suero:		
Creatinina (mg/dl).....	0,58 ± 0,03	0,80 ± 0,008*
Acido úrico (mg/dl).....	0,75 ± 0,67	1,04 ± 0,10
Colesterol (mg/dl)	66,2 ± 2,5	71,3 ± 6,3
Orina:		
Diuresis (ml/min).....	22,7 ± 5,0	23,6 ± 4,0
Proteinuria (mg/día).....	18,4 ± 8,39	25,07 ± 8,2

Los datos se expresan, para n = 15 en ambos casos, como media ± EEM. * $p < 0,05$ versus tres meses.

Discusión

Los datos de función renal en varones indican una reducción en el aclaramiento de creatinina del grupo de ancianos, un hallazgo confirmado por estudios anteriores². La excreción diaria de proteínas fue mayor también en este grupo que en el de individuos jóvenes, pero ninguno de los ancianos presentó proteinuria con significación clínica. Esta mínima proteinuria no tenía relación con lesiones o infección del tracto urinario, ya que no se observó ni hematuria ni infección urinaria. Estudios previos en poblaciones de individuos sanos mayores de sesenta

y cinco años¹⁰ han demostrado que sólo un reducido grupo de ellos presentan proteinuria clínica y, de hecho, una revisión reciente² no encontró información suficiente para concluir que la permeabilidad glomerular podía modificarse con la edad del hombre.

Los cambios de función renal de los ancianos aparecieron en presencia de cifras normales de colesterol. Como eran, además, individuos normotensos y no fumadores, esta población puede considerarse sin factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Este hecho es importante, dado que algunos de estos factores, particularmente la hipercolesterolemia y la hipertensión, tienen un papel evidente en el mantenimiento y progresión de lesiones renales^{11,12} y, por tanto, la disfunción renal observada podría ser una consecuencia específica de la presencia de tales factores de riesgo y no del fenómeno de envejecimiento.

Tanto los niveles plasmáticos como la excreción urinaria de MDA fueron menores en el grupo de ancianos que en el de jóvenes. Por el contrario, no se observaron cambios en la excreción fraccional de MDA entre ambos grupos (resultados no presentados). La excreción fraccional se calculó para establecer la posible contribución tubular a los cambios en orina. Considerando nuestros resultados, se puede proponer que la principal causa de la menor excreción urinaria de MDA en los ancianos fue la menor concentración plasmática de estos productos, con la consiguiente reducción de la carga filtrada. La contribución tubular a estos cambios fue, por tanto, mínima. Se ha comunicado que el MDA, uno de los productos finales de peroxidación lipídica, aumenta en plasma con la edad¹³, pero no hay referencias en individuos mayores de sesenta y cinco años, como son los integrantes de nuestro grupo de ancianos.

Los datos correspondientes a los estudios en ratas se presentan en las figuras 2 y 3 y en la tabla II. La elección de animales de dieciocho meses viene motivada por el hecho de que, tanto referencias previas¹⁴ como nuestra propia experiencia al respecto, sugieren que es en ese intervalo de edad donde podrían comenzar a aparecer las primeras alteraciones objetivables como glomerulosclerosis. Por tanto, nuestro modelo en rata trata de detectar cuáles son los cambios tempranos de función renal dependientes de la edad.

Las ratas de dieciocho meses presentaron una reducción significativa de la filtración glomerular, con el subsiguiente aumento de la creatinina plasmática y con una disminución paralela del flujo plasmático renal. Estos resultados coinciden con los observados en humanos sanos, si bien no se han realizado mediciones específicas, en este estudio, de este último parámetro. No obstante, descripciones de otros autores¹⁵ indican que individuos de noventa años o más presentan menos del 50 % del valor correspondiente a sujetos de cuarenta-cuarenta y nueve años. El descenso de flujo plasmático renal y de filtrado glomerular en ratas de dieciocho meses no fue debido a una disminución de presión arterial, ya que este pa-

rámetro se mantuvo invariable en los animales de tres y dieciocho meses.

Las alteraciones de función renal no se asocian a un aumento de la excreción urinaria de proteínas (tabla II), lo que indica que la permeabilidad para proteínas de la barrera glomerular no se encuentra todavía alterada en ratas de dieciocho meses. De hecho, el comienzo de la proteinuria en ratas Wistar macho se sitúa a los veinticuatro meses¹⁶.

Los niveles plasmáticos y la excreción urinaria de MDA fueron similares en los dos grupos de animales estudiados. Estos resultados no coinciden exactamente con los hallazgos en humanos, ya que en éstos los valores de MDA se encontraban disminuidos. No obstante, podría ocurrir que las ratas Wistar de dieciocho meses no fueran superponibles, desde el punto de vista de la edad, con los ancianos estudiados, o incluso que existieran diferencias interespecíficas. Lo que sí es importante, y en esto coinciden tanto humanos como ratas, es la ausencia de un incremento en los niveles sistémicos o urinarios de lipoperoxidos, lo que no apoya la hipótesis de que los MADO jugarían algún papel en la génesis o progresión del daño renal asociado al envejecimiento. No obstante, estos resultados tampoco permiten excluir la presencia de fenómenos locales (a nivel renal) de peroxidación lipídica que pudieran estar en relación con los cambios de función renal comentados.

En definitiva, nuestros datos indican que existe una reducción de la filtración glomerular en varones mayores de sesenta y nueve años. Según nuestro modelo de rata, se confirma una pérdida de función renal con la edad, que afecta al flujo plasmático renal y a la filtración glomerular. La presencia de proteinuria sería posterior a la instauración de los mencionados cambios. Por último, no se confirma qué fenómenos de peroxidación lipídica intervengan en la génesis de tales cambios.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha realizado con fondos procedentes de una ayuda de la CICYT SAL 89-0875. M. González Rubio es becaria de la Comunidad de Madrid; P. Ruiz Torres es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia. Querriamos dar las gracias al personal médico de la Residencia de Ancianos de la CAM de Alcalá de Henares y a los integrantes de la misma por colaborar voluntariamente en el estudio.

Bibliografía

1. Anderson A y Brenner BM: Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med*, 80:435-442, 1986.
2. Lindeman RD: Overview: Renal physiology and pathophysiology of aging. *Am J Kidney Dis*, 16:275-282, 1990.
3. Goyal VK: Changes with age in the human kidney. *Exp Gerontol*, 17:321-331, 1982.
4. Laurent B y Ardillou R: Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol*, 20:F765-F776, 1986.

5. Zager RA: Hypoperfusion-induced acute renal failure in the rat: An evaluation of oxidant tissue injury. *Circ Res*, 62:430-435, 1988.
6. Nath KA, Croatt AJ y Hostetter TH: Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol*, 258:F1354-F1362, 1990.
7. Gutteridge JM y Halliwell B: The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*, 15:129-134, 1990.
8. Olivera A, Gutkowska J, Rodríguez Puyol D y cols.: Atrial natriuretic peptide in rats with experimental cirrhosis of the liver without ascitis. *Endocrinology*, 122:840-846, 1988.
9. Satoh K: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*, 90:37-43, 1978.
10. Van Zonneveld RJ: Some data on the genito-urinary system as found in old-age surveys in the Netherlands. *Gerontol Clin*, 1:167-173, 1959.
11. Moorhead JF: Lipids and progressive kidney disease. *Kidney Int*, 39 (suppl.):S35-S40, 1990.
12. Baldwin DS y Neugarten J: Blood pressure control and progression of renal insufficiency. En Mitch WE, Brenner BM y Stein JH (eds.). *The progressive nature of renal disease*. New York, Churchill-Livingstone, pp. 81-88, 1986.
13. Knight JA, Smith SE, Kinder VE y Anstäl HB: Reference intervals for plasma lipoperoxides: Age-, sex-, and specimen-related variations. *Clin Chem*, 33:2289-2291, 1987.
14. Dodane V, Chevalier J, Bariety J y cols.: Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest*, 64:377-391, 1991.
15. Davies DF y Shock NW: Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest*, 29:496-507, 1950.