

## ORIGINALES

# *La síntesis de óxido nítrico está incrementada en el fracaso renal agudo isquémico. Posible papel de la uremia*

J. M. Valdivielso, M. Arévalo\*, L. Rivas-Cabañero y J. M. López-Novoa

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina.

\* Departamento de Histología y Anatomía Humanas, Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

### RESUMEN

*El presente estudio se diseñó para estudiar el papel del óxido nítrico (NO) en el fracaso renal agudo isquémico y su relación con la uremia. Para ello se realizó isquemia bilateral a 16 ratas, isquemia unilateral a otras 24 y 18 se utilizaron como control. Además, a la mitad de las ratas de cada grupo se les trataba con L-NAME (4 mg/k/día) en el agua de bebida. Se estudió su función renal durante 48 horas (24 horas antes de producir la isquemia y 24 horas después) y al finalizar se aislaron sus glomérulos y se midió la producción glomerular de nitritos. Un riñón de cada grupo se utilizó para realizar estudios histológicos de microscopía óptica y electrónica. Solamente los glomérulos de ratas que sufren isquemia bilateral producen cantidades significativamente mayores de nitritos que el resto. Además, esta producción se inhibe por la adición de dos inhibidores de la síntesis de NO (L-NAME y aminoguanidina). Todo esto parece indicar que la uremia que sigue a la isquemia o la combinación isquemia-uremia son las responsables del aumento de síntesis de NO. Las ratas que sufren isquemia bilateral y beben L-NAME muestran un deterioro funcional y estructural mayor que el resto, lo que parece indicar que este NO jugaría un papel protector en la función renal remanente.*

Palabras clave: **Renal. Glomérulo. Óxido nítrico. Isquemia. Uremia.**

### INCREASED NITRIC OXIDE SYNTHESIS IN ISCHEMIC ACUTE RENAL FAILURE. A ROLE FOR UREMIA

### SUMMARY

*The aim of this study was to assess the role of nitric oxide (NO) in ischemic acute renal failure and its relationship with uremia. For this purpose, we utilized 58 Wistar rats: 18 control sham-operated animals, 16 rats with bilateral ischemia*

Recibido: 10-V-96.

En versión definitiva: 23-VII-96.

Aceptado: 23-VII-96.

Correspondencia: Prof. J. M. López-Novoa.  
Departamento de Fisiología y Farmacología.  
Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca.  
Avenida Campo Charro, s/n.  
37007 Salamanca, España.

*and 24 rats with unilateral renal ischemia created by clamping one or both renal arteries. Half of the rats in each group were given L-NAME (4 mg/kg/day) in the drinking water. We studied renal function 24 hours before and 24 hours after inducing renal ischemia. Then, renal glomeruli were isolated and glomerular nitric oxide synthesis was measured as nitrite production. One kidney of each group was used for studies of morphological changes by optical and electron microscopy. The glomeruli from rats with bilateral renal ischemia produced significantly higher amounts of nitrite than all the other groups. This production was abolished by both nitric oxide synthesis inhibitors tested (L-NAME and aminoguanidine), showing that uremia following ischemia is responsible for the increased nitric oxide production. Rats with bilateral ischemia treated with L-NAME, showed more severe functional and structural damage than all the other groups. This result suggest that this increased NO production could play a role in maintaining the renal function after an ischemic renal insult.*

Key words: **Renal. Glomerulus. Nitric oxide. Ischemia. Uremia.**

## INTRODUCCION

El fracaso renal agudo (FRA) isquémico se inicia como consecuencia de un flujo de sangre insuficiente para sostener las demandas metabólicas del riñón. Morfológicamente se evidencia por necrosis celular, obstrucción tubular y cambios en el endotelio glomerular. Funcionalmente el daño se manifiesta por una retención de productos metabólicos de desecho con el desarrollo de uremia y una homeostasis alterada de fluidos y electrólitos. El daño renal isquémico se diferencia del de otros órganos en el hecho de que el riñón es capaz de recuperarse funcional y morfológicamente incluso si el daño inicial era bastante grave. Actualmente se sabe que el daño tisular no concluye en el momento en que se realiza la isquemia, sino que continúa en procesos que se desarrollan en la reperusión<sup>1</sup>. El período de reperusión se caracteriza por un incremento lento y paulatino del flujo sanguíneo renal (FSR) hasta alcanzar valores similares a los basales.

Diversos estudios sobre la evolución de la recuperación del FRA isquémico indicaron que ésta ocurre en una forma bifásica, con una primera fase más asociada con el retorno de la integridad anatómica y funcional del epitelio tubular y una segunda fase marcada por una progresiva vasodilatación renal<sup>2</sup>.

En un principio se especuló que una deficiente producción de óxido nítrico (NO) por el endotelio podría formar parte de los mecanismos de vasoconstricción observados tras la isquemia renal, pero recientes trabajos de nuestro laboratorio<sup>3</sup> demostraron que la síntesis de NO está aumentada en glomérulos de ratas con FRA isquémico y 24 horas de reperusión, pero no en ratas con dos horas de reperusión.

A la vista de estos resultados anteriores, el objetivo del presente trabajo es ver si es la isquemia en sí o la uremia subsiguiente la que provoca ese aumento de síntesis de NO.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar hembras de unos 250 gramos de peso (Charles River, Barcelona, España).

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales con libre acceso a la comida y a la bebida 4 días antes de comenzar el experimento, con el fin de acostumbrarlas a este nuevo hábitat. Dos días antes (período *basal*) y un día después de inducir la isquemia (período *postoperación*) se recogió diariamente orina libre de comida y heces en probetas graduadas que contenían 1 ml de aceite mineral (para evitar la evaporación) y 100 µl de azida sódica 0,01% (para minimizar la contaminación bacteriana).

Las ratas se anestesiaron con valium (3 mg/kg) y ketamina (4 mg/kg). Se practicó una incisión abdominal central y se bloqueó la circulación de las arterias renales con unas micropinzas durante una hora. Las ratas se mantuvieron mientras tanto a una temperatura constante de 37 °C. Transcurrida la hora de isquemia se retiraron las pinzas y se suturó la herida con seda estéril.

Los animales se dividieron en seis grupos:

– Grupo Sham (n = 8): ratas que recibían el mismo tratamiento quirúrgico que las demás, pero sin provocar la isquemia.

– Grupo Sham-Name (n = 10): ratas como las del grupo anterior, pero que recibían L-NAME (Sigma) en el agua de bebida (4 mg/kg/día).

- Grupo Is Bilat (n = 8): ratas que sufrían una isquemia bilateral durante una hora.
- Grupo Is Bilat-Name (n = 8): ratas como las del grupo anterior, pero con L-NAME en el agua de bebida.
- Grupo Is Unilat (n = 16): ratas que sufrían isquemia unilateral durante una hora.
- Grupo Is Unilat-Name (n = 16): ratas como las del grupo anterior, pero que reciben L-NAME en el agua de bebida.

En los grupos de animales que beben L-NAME, éste se pone en la bebida durante 48 h (24 horas antes de operar y 24 horas después), por lo que la recogida de orina basal terminó de realizarse 24 horas antes de la operación. Diariamente se extrajo una muestra de sangre de la vena caudal para determinar la creatinina plasmática por el método de Jaffé<sup>4</sup>, y se estimó el filtrado glomerular como aclaramiento de creatinina endógena.

El último día, en los grupos que no bebían L-NAME, los animales se anestesiaron con éter etílico y, tras una laparotomía media, se canuló la aorta a nivel de la bifurcación aorto-ilíaca con una cánula Abbocatt-T (18 g 3 51 mm, Abbott Ireland Ltd., Sligo, Irlanda), y los riñones se perfundieron, previa ligadura de la arteria por encima de la salida de las arterias renales, con 100 ml de solución de cloruro sódico isotónico (0,9% de NaCl) a 4 °C. Para facilitar el drenaje sanguíneo se hizo una incisión en la cava. El aislamiento de los glomérulos se realizó por un método de tamizado diferencial previamente descrito<sup>5</sup>.

Los glomérulos se contaron en un microscopio y se resuspendieron en RPMI 1640 (Biowhittaker 12-115B, Walkersville, Maryland 21793, USA) enriquecido con 10% de suero de ternera fetal (Biowhittaker 14-501B, Walkersville, Maryland 21793, USA) y que contenía L-glutamina (1 mM, Merck, Sharp & Dohme, Darmstadt., Alemania Federal), penicilina G sódica (0,66 µg/ml), sulfato de estreptomina (50 µg/ml), fungizona (2,5 µg/ml), selenio (5 ng/ml), transferrina (5 µg/ml), insulina (5 µg/ml) tamponado con HEPES (ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfónico, Flow Laboratories) 20 mM. Finalmente se pusieron en placas de 6 3 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una concentración de 7.000 glomérulos por pocillo y con 1,5 ml de medio de cultivo. Para evitar variaciones en el número de glomérulos entre los pocillos se utilizó en todos los casos la misma pipeta automática y se mantuvo en agitación constante el tubo que contenía los glomérulos mientras se sembraban todos los pocillos. En el grupo de ratas con isquemia unilateral se aislaron por separado los glomérulos del riñón isquémico y del riñón no isquémico.

Algunos de los pocillos se usaron como controles y a otros se les añadió L-NAME o aminoguanidina, ambos antagonistas de síntesis de NO, a una concentración final de 10<sup>-4</sup> M. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la determinación de la síntesis de NO como acumulación de nitritos en el sobrenadante de cultivo por medio del método de Griess<sup>6</sup>.

Algunos animales se utilizaron para realizar estudios histológicos. Se realizaba la extracción de los riñones igual que para aislar glomérulos, pero a partir de aquí el proceso fue distinto, dependiendo de que el animal fuera destinado a estudios de microscopía óptica o electrónica.

### Microscopía óptica

Los animales se anestesiaron con éter y sus riñones se extrajeron y decapsularon cuidadosamente, cortándolos sagitalmente en dos piezas equivalentes que fueron fijadas por inmersión en formaldehído al 10% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los riñones se deshidrataron y se incluyeron en parafina.

Los bloques así obtenidos se cortaron con un microtomo de parafina en secciones de 4 µm que se montaron sobre portaobjetos de cristal esmerilado, tras lo cual se efectuó la tinción de los mismos con la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS), protegiendo finalmente las preparaciones con cubreobjetos montados con bálsamo de Canadá.

### Microscopía electrónica

Tras el lavado sanguíneo de los riñones por perfusión vía aórtica con cloruro sódico isotónico se instilaron 300 ml de una solución compuesta por glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,2 M a pH 7,4 a ritmo lento durante 1 hora. A continuación los riñones fueron cuidadosamente extraídos y decapsulados, tallando bloques de corteza renal de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, que fueron depositados en el fijador anteriormente señalado durante una hora a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, los bloques de corteza renal se lavaron varias veces con el tampón cacodilato 0,2 M, deshidratándolos a continuación con cantidades crecientes de etanol y óxido de propileno, embebiéndolos en resina Durcupan e incluyéndolos en cápsulas de gelatina que fueron rellenas con la misma resina y etiquetadas convenientemente.

Las pirámides así formadas pasaron a la estufa a 60 °C para su polimerización y endurecimiento du-

rante 48 horas. Los bloques se cortaron con un ultramicrotomo en secciones semifinas de 1  $\mu$ m, que se tiñeron con azul de toluidina y se utilizaron como cortes de control observándolos al microscopio óptico.

De las zonas seleccionadas en los cortes anteriores se realizaron en las pirámides secciones ultrafinas de 400 nm que se depositaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y nitrato de plomo. Dichas rejillas fueron examinadas con un microscopio electrónico Philips EM 201 a un potencial de aceleración de 60 Kv.

## RESULTADOS

Los valores de creatinina plasmática del grupo Is Bilat (tabla I) indican claramente la existencia de fracaso renal. La inhibición de la síntesis de NO agrava el grado de fracaso renal, incrementando la creatinina en plasma en un 23,5%.

**Tabla I.** Creatinina plasmática (mg/l)

	Basal	Postoperación
Sham .....	8,09 $\pm$ 0,37	7,00 $\pm$ 0,70
Sham-Name .....	9,22 $\pm$ 0,40	10,69 $\pm$ 0,80
Is Bilat .....	8,60 $\pm$ 0,31	28,59 $\pm$ 5,18 <sup>a</sup>
Is Bilat-Name .....	6,96 $\pm$ 1,22	35,32 $\pm$ 3,31 <sup>b</sup>
Is Unilat .....	8,34 $\pm$ 0,38	13,32 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>
Is Unilat-Name .....	7,42 $\pm$ 0,58	15,74 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan en medias  $\pm$  eem.

*Significación estadística:* a:  $p < 0,01$  con respecto al período basal; b:  $p < 0,001$  con respecto al período basal (test de la T de Student para datos pareados).

En el grupo Is Unilat también se produce un incremento en la creatinina en plasma, pero menor que en el grupo Is Bilat, quizás por la presencia del riñón contralateral intacto.

El tratamiento de este grupo con L-NAME agrava el daño, pero en una proporción menor (18%) que en el caso del grupo Is Bilat.

En el grupo Sham no se observan diferencias entre los valores basal y postoperación, y el tratamiento con L-NAME no modificó los niveles de creatinina plasmática.

Los resultados de aclaramiento de creatinina se muestran en la tabla II. La isquemia, tanto uni como bilateral, produjo un descenso significativo en el aclaramiento de creatinina. Este descenso fue más acusado en las ratas con isquemia bilateral que en las ratas con isquemia unilateral, probablemente por la presencia del riñón contralateral intacto.

**Tabla II.** Filtrado glomerular (ml/min)

	Basal	Postoperación
Sham .....	0,61 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,02
Sham-Name .....	0,65 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Is Bilat .....	0,72 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
Is Bilat-Name .....	0,69 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Is Unilat .....	0,68 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
Is Unilat-Name .....	0,66 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan en medias  $\pm$  eem.

*Significación estadística:* a:  $p < 0,01$  con respecto al período basal; b:  $p < 0,001$  con respecto al período basal (test de la T de Student para datos pareados).

El L-NAME produjo un descenso en el aclaramiento de creatinina en todos los grupos. Esta tendencia a disminuir el aclaramiento fue mucho más acusada en las ratas con isquemia bilateral, en las que el FG disminuyó un 78%, que en las Sham y en las isquemias unilaterales, en las que lo hizo un 21 y un 17%, respectivamente.

En los resultados de flujo urinario, que se muestran en la tabla III, podemos apreciar que no se produce ninguna variación significativa entre los períodos de los diferentes grupos excepto en el grupo Is Bilat-NAME, en el que se ve una disminución significativa. Este hecho contrasta con la falta de efecto del L-NAME en los demás grupos y con la tendencia a aumentar el flujo urinario que se observa en el grupo Is Bilat.

**Tabla III.** Flujo urinario ( $\mu$ l/min)

	Basal	Postoperación
Sham .....	8,24 $\pm$ 1,6	6,64 $\pm$ 1,0
Sham-Name .....	8,96 $\pm$ 1,8	9,20 $\pm$ 0,9
Is Bilat .....	6,93 $\pm$ 1,6	8,81 $\pm$ 0,9
Is Bilat-Name .....	7,49 $\pm$ 2,6	2,96 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>
Is Unilat .....	12,36 $\pm$ 1,9	10,12 $\pm$ 1,6
Is Unilat-Name .....	6,42 $\pm$ 1,0	7,00 $\pm$ 1,0

Los resultados se expresan en medias  $\pm$  eem.

*Significación estadística:* a:  $p < 0,01$  con respecto al período basal (test de la T de Student para datos pareados).

En la tabla IV podemos observar los datos de producción glomerular de nitritos. Como podemos observar, los glomérulos de ratas con isquemia bilateral producen basalmente cantidades significativamente mayores de nitritos que los de los demás grupos. Este aumento en la producción de nitritos se inhibe por la adición de los dos inhibidores de la síntesis de NO. Los glomérulos del riñón isquémico de ratas con isquemia unilateral no tienen aumentada la producción de NO.

**Tabla IV.** Producción glomerular de nitritos (pmol/1000 glomérulos)

	Basal	+ L-NAME	+ Aminoguanidina
Sham .....	760 ± 39	899 ± 88	788 ± 61
Is Bilat .....	1.403 ± 93 <sup>abc</sup>	856 ± 119 <sup>e</sup>	813 ± 109 <sup>d</sup>
Riñón is .....	902 ± 47	782 ± 32	707 ± 33 <sup>e</sup>
Riñón no is .....	477 ± 34 <sup>d</sup>	594 ± 17 <sup>d</sup>	617 ± 56 <sup>d</sup>

Los resultados se expresan en picomoles de nitrito por cada mil glomérulos, y son medias ± eem.

*Significación estadística:* a:  $p < 0,01$  con respecto al grupo Sham-basal; b:  $p < 0,05$  con respecto al grupo Sham-NAME; c:  $p < 0,01$  con respecto al grupo Sham-aminoguanidina; d:  $p < 0,01$  con respecto al grupo Is Bilat-basal; e:  $p < 0,05$  con respecto al grupo Is Bilat-basal (análisis de la varianza y test de Scheffé).

No se observaron alteraciones morfológicas, ni por microscopía óptica (fig. 1) ni electrónica (fig. 2), en los riñones de los animales pertenecientes a los gru-

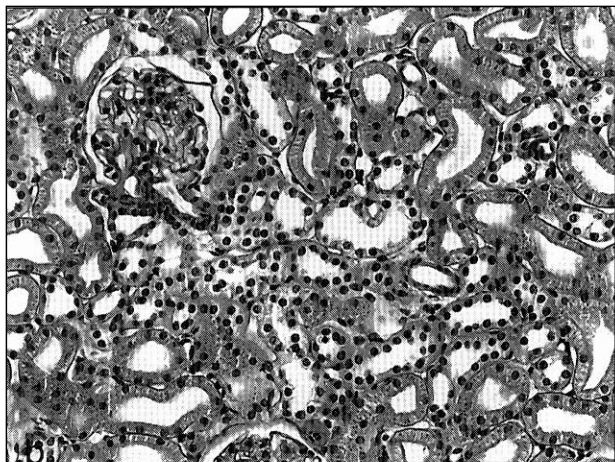
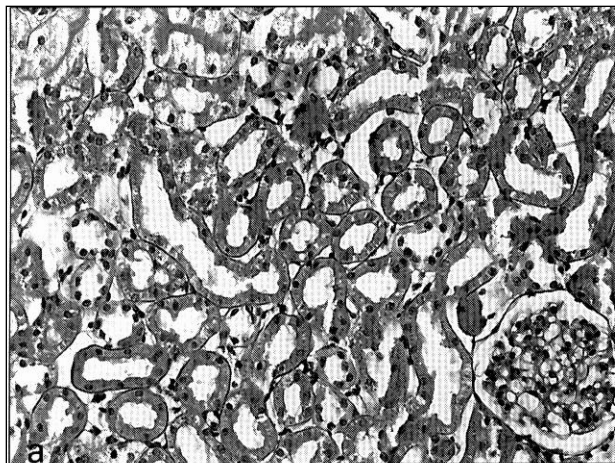


Fig. 1.—Micrografía perteneciente a un riñón de rata pseudo-operada (a) y a un riñón de rata pseudo-operada que ha bebido L-NAME PAS (3 275).

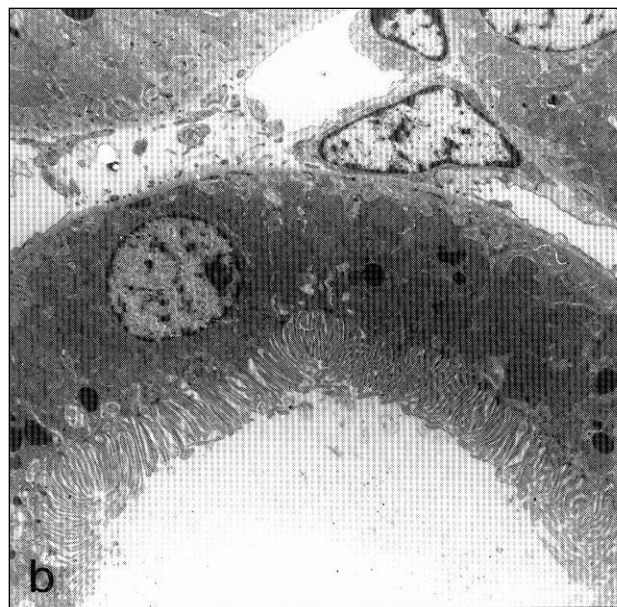
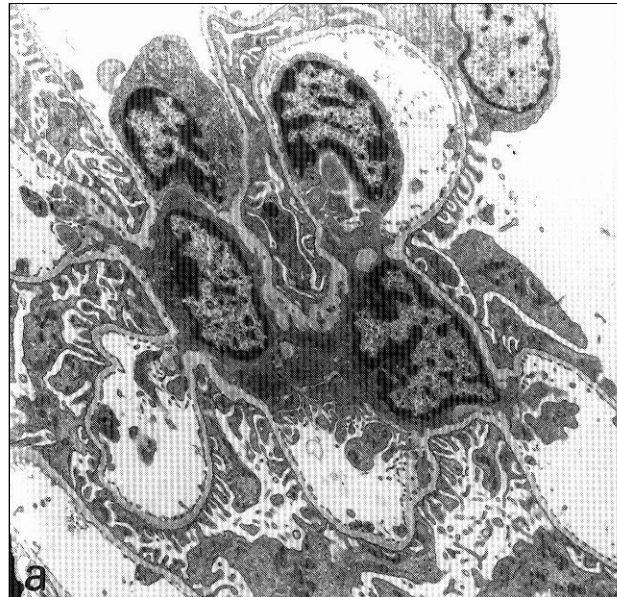


Fig. 2.—Micrografía electrónica de un glomérulo (a) (3 3.900) y de un túbulo de riñón de rata pseudo-operada (b) (3 3.360).

pos de ratas pseudo-operadas y tratadas con L-NAME, ni en los riñones no isquémicos de los animales con isquemia unilateral.

En los riñones de ratas con isquemia bilateral y en los riñones isquémicos de ratas con isquemia unilateral, el grado de daño fue similar. La mayoría de los túbulos presentan signos de alteración, con luces disminuidas y ocupadas por diferentes materiales, o totalmente colapsadas con desaparición del ribete de microvellosidades. Es posible apreciar la presencia

de numerosos cilindros hialinos, pero sólo aparece atrofia total en un pequeño porcentaje de túbulos (fig. 3a).

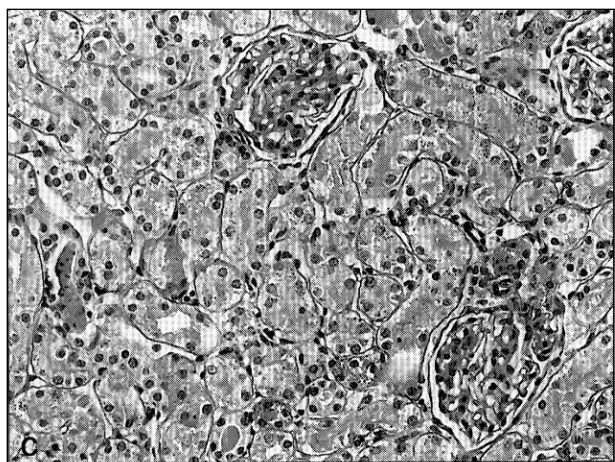
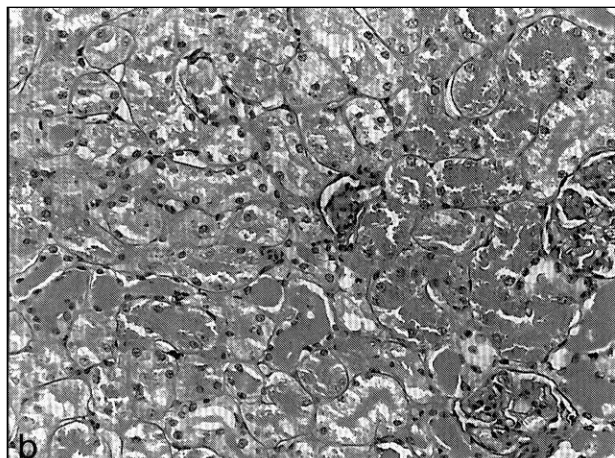
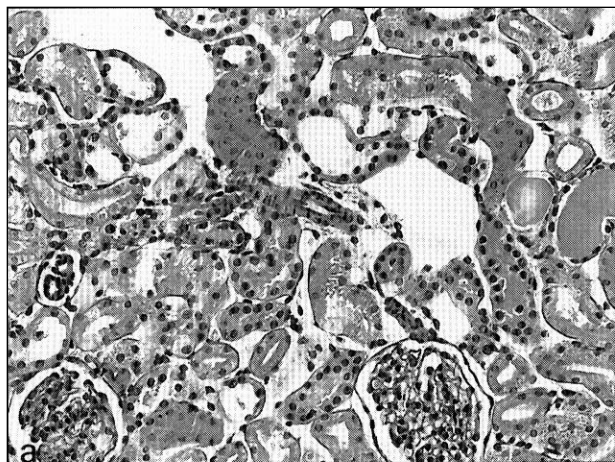


Fig. 3.—Micrografía de riñón de rata con isquemia bilateral (a), con isquemia bilateral que ha bebido L-NAME (b) y con isquemia unilateral (riñón isquémico) que ha bebido L-NAME (c). PAS (3 275).

En los cortes de riñones de ratas con isquemia bilateral y tratadas con L-NAME, la práctica totalidad de los túbulos renales aparecen con graves alteraciones estructurales y con las luces colapsadas, citoplasmas celulares vacuolados o con pérdida de los límites celulares o incluso una atrofia celular total. Se observan cilindros hialinos. Los glomérulos aparecen con las asas plegadas y las luces capilares obstruidas (fig. 3b).

En los cortes de riñones isquémicos de ratas con isquemia unilateral y tratados con L-NAME aparecen, en la mayor parte de los túbulos, alteraciones en diversos grados (desde la vacuolización a la atrofia total, esta última en un porcentaje de un 10-20%). Las luces tubulares están, por lo general, colapsadas y en un porcentaje importante se observan materiales heterogéneos en su interior. Algunos glomérulos presentan la zona yuxtaglomerular hiperplasiada y en otros casos es posible observar una disminución por colapso de las luces capilares del ovillo glomerular. No obstante, aparecen glomérulos que no parecen presentar alteraciones al microscopio óptico (fig. 3c).

Al observar mediante microscopia electrónica cortes de ratas con isquemia bilateral y de riñones isquémicos de ratas con isquemia unilateral, raramente se observan túbulos totalmente desestructurados, conservando la mayoría los contornos. Casi todos presentan alteraciones, en mayor o menor grado, que se resumen en una pérdida parcial o total del ribete de microvellosidades apicales con luces ocupadas frecuentemente por materiales heterogéneos. Se aprecia una disminución o desaparición en muchos casos de los laberintos basales con dilataciones en los espacios intercelulares. Los citoplasmas de las células tubulares presentan una gran cantidad de vacuolas vacías o con contenido granular, siendo frecuente observar una gran alteración de organelas en su interior, aunque casi todas las células conservan los núcleos. Los túbulos distales y colectores aparecen frecuentemente repletos en su luz por material electrodensó rico en cuerpos osmiófilos multivesiculares (fig. 4a). En los glomérulos se observan únicamente zonas de fusión pedicular aislada y las asas capilares parecen estar en muchos casos plegadas con luces disminuidas (figura 4b).

En las ratas con isquemia bilateral y tratadas con L-NAME es posible constatar la desestructuración casi total de la mayor parte de los túbulos renales (fig. 5a). Los glomérulos presentan de forma difusa una fusión pedicular con adelgazamiento de las prolongaciones de los pedicelos, que presentan asimismo numerosas vacuolas intracitoplasmáticas

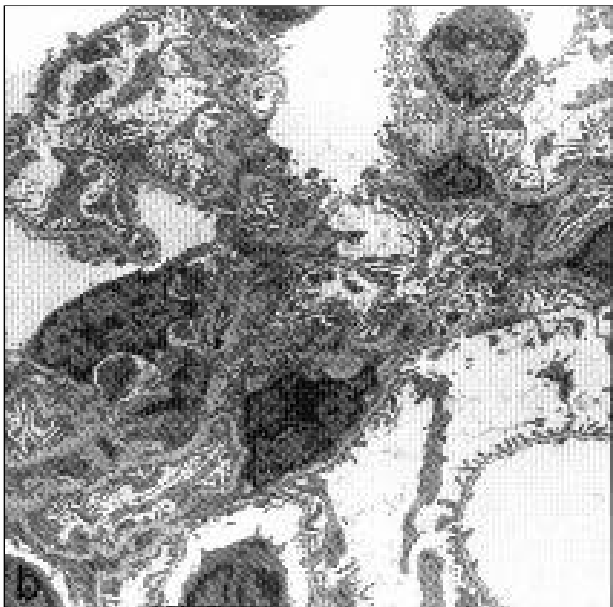
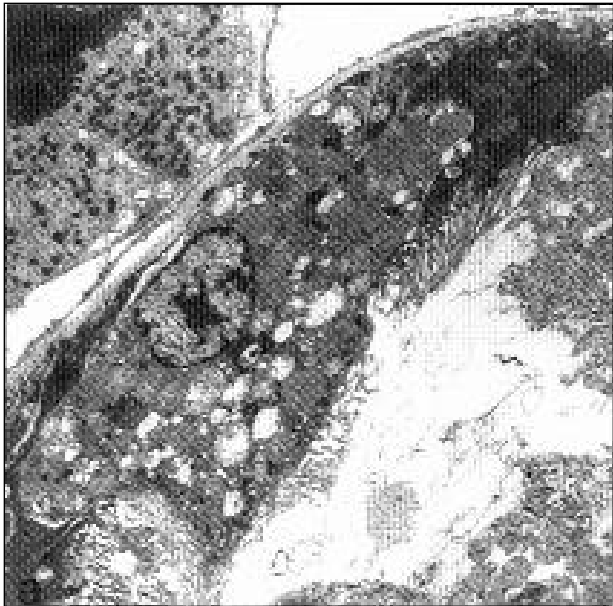


Fig. 4.—Vista de un túbulo (a) y de un glomérulo (b) de riñón de rata con isquemia bilateral (3 3.360).

grandes. El mensajero aparece repleto de restos celulares heterogéneos con vacuolización intramesangial (fig. 5b).

En los riñones isquémicos de ratas con isquemia unilateral tratadas con L-NAME, la práctica totalidad de los túbulos se ven alterados en mayor o menor grado, desde una ligera vacuolización a una desestructuración completa en un pequeño porcentaje. En los glomérulos se ven zonas de fusión pedicular.

## DISCUSION

En resultados previos de nuestro laboratorio mostramos que en un modelo de isquemia/reperfusión renal con una hora de isquemia y 24 horas de reperfusión se observaba un aumento de la síntesis glomerular de NO, paralelo al de creatinina plasmática. En el mismo modelo de isquemia, pero con sólo dos horas de reperfusión, no se observaba este aumento<sup>3</sup>.

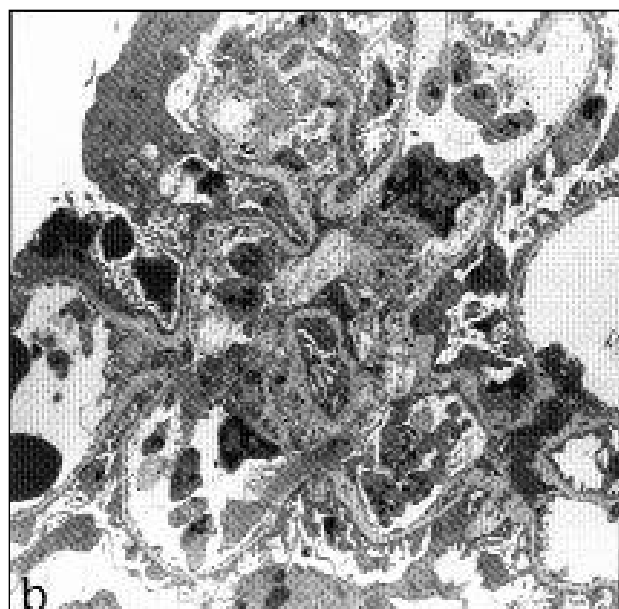
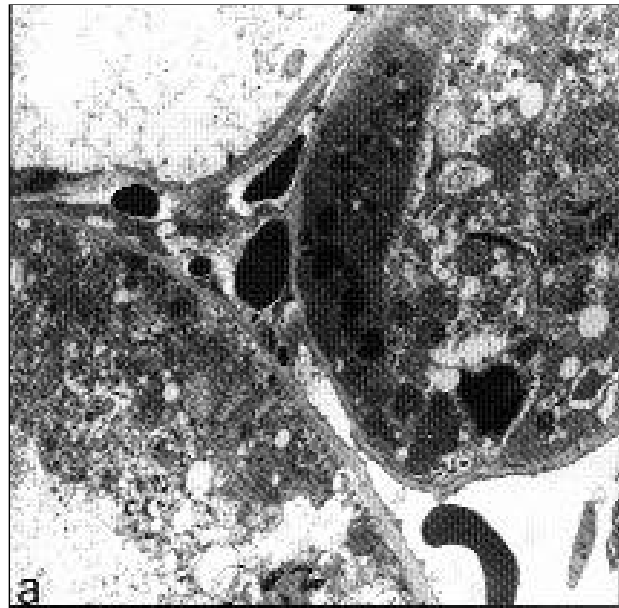


Fig. 5.—Vista de un túbulo (a) y de un glomérulo (b) de riñón de rata con isquemia bilateral que ha bebido L-NAME (3 3360).

Este aumento de la síntesis de NO podría deberse no a la isquemia en sí, sino a la uremia que la acompaña, ya que con la reperfusión de 2 horas no hay aumento en los niveles circulantes de creatinina debido a la corta duración de la insuficiencia renal; sin embargo, otra razón podría ser la duración de la reperfusión, que es distinta en cada caso. Para contestar a esa pregunta planeamos realizar un modelo de isquemia bilateral que conlleva uremia, valorada por el aumento de creatinina plasmática, y otro de isquemia unilateral en el cual el riñón contralateral funcionando evita la uremia. Nos encontramos que los glomérulos de riñones con isquemia bilateral producen más NO que los controles, mientras que los glomérulos de los riñones isquémicos de las ratas con isquemia unilateral no lo hacen. La isquemia es igual para los dos tipos de riñones, pero mientras que en el caso de la Is Bilat se produce un aumento de creatinina en plasma, en la Is Unilat no es tan acusado. Además de la creatinina, en el FRA se acumulan una serie de productos nitrogenados que pueden actuar como inhibidores de la síntesis de NO<sup>7,8</sup>. Esta inhibición podría dar lugar a una activación de la síntesis de NO por un mecanismo de retroalimentación ya descrito<sup>9</sup>.

Por otra parte, es bien sabido que en fenómenos de isquemia-reperfusión se produce un aumento en las concentraciones de calcio libre citosólico<sup>10</sup>. Este aumento también favorecería el aumento de la síntesis de NO<sup>11</sup>.

Al incubar los glomérulos en presencia de L-NAME y de aminoguanidina, los dos compuestos son capaces de inhibir el aumento de síntesis de NO observado en ratas con IB. Mientras el L-NAME inhibe todas las isoformas de la NOs, hay datos contradictorios sobre la especificidad de la aminoguanidina, pues algún trabajo dice que inhibe específicamente a la forma inducible de la NOs<sup>12</sup> y otros estudios sugieren que esto puede no ser totalmente cierto<sup>13</sup>, por lo que no podemos decir qué isoforma de la NOs está implicada en este aumento.

Los estudios *in vivo* parecen indicar que el NO tendría un papel protector para la función renal remanente en un riñón isquémico. La inhibición de la síntesis de NO afecta en mayor medida a la función renal de las ratas con isquemia bilateral que a las ratas con isquemia unilateral o a las pseudo-operadas. Este descenso en el aclaramiento de creatinina es, además, más drástico en las ratas con Is Bilat, en las que el aclaramiento de creatinina es muy pequeño.

Los estudios histológicos confirman la hipótesis de que el NO tiene un papel protector, pues el daño renal se agrava al tratar a las ratas del grupo Is Bilat con L-NAME.

La inhibición de la síntesis de NO puede producir un agravamiento de la función renal de varias formas. Por una parte, estamos inhibiendo un relajante mesangial<sup>14</sup> y, por tanto, las células mesangiales se contraerán y descenderá el Kf y, por tanto, el FG. Además, el NO es un potente antiagregante<sup>15</sup>. Su inhibición provocaría un descenso en el FSR que desembocaría en un descenso del FG y un aumento del tiempo de isquemia (o por lo menos de hipoperfusión) que agravaría el daño.

Por otra parte, un descenso en el FG y en el flujo tubular implicaría una disminución en el arrastre de los desechos celulares que obstruyen la luz tubular y, por tanto, un aumento de la presión hidrostática en la cápsula de Bowman. Este aumento propiciaría también un descenso en el FG.

Como conclusión, podemos decir que en el fracaso renal agudo isquémico se produce un aumento en la síntesis glomerular de NO y que este aumento jugaría un papel protector de la función renal remanente frente a las sustancias vasoactivas que se producen en la isquemia. Este incremento de la síntesis de NO no parece estar mediado solamente por la isquemia en sí, pudiendo jugar la uremia un papel importante en él.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con ayudas de la Junta de Castilla y León y de la DGICYT (SAFT 95-0533 y PB94-1388). José Manuel Valdivielso es becario de investigación del Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica.

## Bibliografía

1. Maesen JG: Reperfusion injury in the kidney. En: Doi DJ, ed: *Pathophysiology of reperfusion injury*. Boca Ratón, Florida: CRC Press 80-100, 1993.
2. Finn WF y Chevalier RL: Recovery from post-ischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 16: 113-123, 1979.
3. Rivas-Cabañero L, Valdivielso JM y López-Novoa JM: Increased glomerular nitric oxide synthesis in ischemic acute renal failure in the rat. *Renal Failure* 17: 479-481, 1995.
4. Bonsnes RW y Tauski HA: The colorimetric determination of creatinine of the Jaffé reaction. *J Biol Chem* 158: 158-181, 1945.
5. Olivera A y López-Novoa JM: Adenosine stimulates Ca<sup>2+</sup> fluxes and increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in cultured rat mesangial cells. *Biochem J* 282: 871-876, 1992.
6. Griess P: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH, Weselky und Benedikt Veber einige Azoverbindungen Ber Deutch. *Chem Ges* 12: 426-429, 1879.
7. Brenner BM, Yu ASL: Uremic syndrome revisited: a pathogenic role for retained endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Current Opinion of Nephrology and Hypertension* 1: 3-7, 1992.



8. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J y Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572-575, 1992.
9. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY y Moncada S: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108: 833-837, 1993.
10. Wilson DR, Arnold PE, Burke TJ y Schrier RW: Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 25: 519-526, 1984.
11. Marsden PA, Brock TA y Ballermann BJ: Glomerular endothelial cells response to calcium-mobilizing agonist with release of EDRF. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 258: F1295-F1303, 1990.
12. Griffiths MSD, Messents M, McAllister RJ y Evans TM: Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110: 963-968, 1993.
13. Laszlo F, Evans SM y Wittle BJ: Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur J Pharmacol* 272: 169-175, 1995.
14. Shultz PJ, Schorer AE y Raj L: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 258: F162-F167, 1990.
15. Leffer AM y Leffer DJ: Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 71-90, 1993.